

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah *True Experimental Post Test Only Control Group Design*. Uji antimikroba secara *in vitro* dengan menggunakan *tube dilution test* untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.) sebagai antimikroba terhadap *Salmonella* Typhi. *Tube dilution test* meliputi 2 tahap, yaitu tahap pengujian bahan di media cair dengan tujuan untuk mencari Kadar Hambat Minimal (KHM), kemudian dilanjutkan dengan tahap penggoresan pada media NAP yang ditujukan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari ekstrak daun ceremai tersebut terhadap bakteri *Salmonella* Typhi.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan di dalam penelitian ini adalah bakteri *Salmonella* Typhi yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sampel diperoleh dari satu spesimen feses pasien yang terinfeksi *Salmonella* Typhi di Rumah Sakit Saiful Anwar, Malang. Berdasarkan hasil penelitian, spesimen feses tersebut diketahui resisten terhadap antibiotik kloramfenikol yang telah dikonsumsi oleh pasien.

Jumlah pengulangan yang digunakan dapat diketahui dengan rumus sebagai berikut:

$$p(n-1) \geq 15$$

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \text{ (Notobroto, 2005)}$$

Keterangan :

n: jumlah pengulangan yang diperlukan

p: jumlah perlakuan (dosis)

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 3 kali. Pada penelitian ini pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kekeruhan yang dapat diamati pada tabung dan jumlah koloni bakteri *Salmonella* Typhi yang tumbuh pada medium NAP.

4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun ceremai yang dibuat dengan konsentrasi 0%, 16%, 18%, 20%, 22%, 24%, dan 26% berdasarkan eksplorasi awal atau penelitian pendahuluan.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.) didapatkan dari tanaman ceremai yang tumbuh di pekarangan rumah di Permata Jingga No. 434, Malang. Pembuatan bubuk daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.) dilakukan di

Balai Materia Medica, Batu dan proses ekstraksi daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.) dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Uji efektivitas daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.) terhadap *Salmonella* Typhi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juni sampai bulan Agustus 2013.

4.5 Instrumen penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

- Alat :

1. Mikroskop binokuler
2. Kertas penghisap
3. Spirtus
4. Gelas penutup
5. Gelas objek
6. Ose

- Bahan :

1. Isolat bakteri *Salmonella* Typhi
2. Kristal violet
3. Lugol
4. Alkohol 95%
5. Minyak emersi
6. Safranin
7. Aquades

4.5.2 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi Daun Ceremai :

- Alat :

1. Tabung Erlenmeyer
2. Neraca analitik
3. Gelas ukur
4. Kertas saring
5. Inkubator
6. Blender
7. Pisau
8. *Evaporator set*
9. Gelas ekstraksi

- Bahan :

1. Daun ceremai
2. Ethanol 96%
3. Aquades

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Tabung

1. Tabung reaksi
2. Pipet seril ukuran 1mL dan 10mL
3. Karet penghisap
4. Inkubator
5. Ekstrak daun ceremai
6. Vortex
7. Perbenihan cair standar
8. Bunsen

9. Korek api
10. Gelas objek
11. Plate kosong dan steril
12. Alat penjepit (skalpel) steril
13. Kertas
14. *Colony counter*

4.6 Definisi Operasional

Di dalam penelitian ini ada beberapa hal yang perlu diketahui yaitu :

1. Isolat bakteri *Salmonella* Typhi yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *Salmonella* Typhi berasal dari satu spesimen feses pasien yang terinfeksi *Salmonella* Typhi di Rumah Sakit Saiful Anwar, Malang.
2. Ekstrak daun ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.) adalah hasil proses ekstraksi daun ceremai 100 gram dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak yang didapat memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%.
3. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak daun ceremai yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella* Typhi. Hal ini ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada larutan yang berisi ekstrak daun ceremai dan suspensi bakteri tersebut dalam tabung setelah diinkubasikan 18-24 jam.
4. Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi minimal ekstrak daun ceremai yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri *Salmonella* Typhi. Hal ini ditandai dengan jumlah koloni pada NAP

yang telah dilakukan *streaking* (penggoresan) dengan satu ose larutan ekstrak etanol daun ceremai yang telah diberi bakteri uji tersebut, dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% *original inoculum*.

5. Kontrol positif/kontrol bakteri adalah konsentrasi 0% yang berasal dari larutan bakteri uji yang telah distandardisasi dengan standar McFarland 0,5 sebanyak 2 ml.
6. Kontrol negatif/kontrol bahan adalah konsentrasi 100% yang merupakan bahan digunakan untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan bakteri karena bahan yang digunakan harus steril. Kontrol negatif dibuat dengan cara mencampurkan antara ekstrak daun ceremai sebanyak 1 ml dengan aquades sebanyak 1 ml.
7. *Original inoculum* adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi, dan digunakan untuk mencari kategori KBM.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Identifikasi bakteri *Salmonella Typhi*

Sebelum digunakan untuk penelitian, isolat *Salmonella Typhi* yang diperoleh diidentifikasi ulang dengan pewarnaan Gram (didapatkan bentuk batang Gram negatif), inokulasi pada BSA (*Bismuth Sulfite Agar*), uji *Microbact* 12E dan inokulasi pada TSIA (*Tripel Sugar Iron agar*) (Brooks et al, 2005).

4.7.1.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan Gram :

1. Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak. Kemudian biarkan dingin.
2. Buat sediaan bakteri diatas gelas obyek dengan ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis) dan dibiarkan kering diudara. Kemudian difiksasi diatas lampu bunsen.
3. Sediaan dituangi dengan Kristal Violet. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
4. Kemudian sediaan dituangi dengan Lugol. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
5. Sediaan dituangi dengan alcohol 96%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air.
6. Sediaan dituangi dengan Safranin. Setelah setengah menit, sediaan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan obyektif perbesaran 100x. Hasil yang tampak bakteri *Salmonella Typhi* berbentuk batang berwarna merah (Dzen dkk., 2003).

4.7.1.2 Penanaman Bakteri pada Medium BSA

Penanaman bakteri pada *Bismuth Sulfite Agar* (BSA) merupakan media selektif terhadap pertumbuhan *Salmonella Typhi*, prosedurnya yaitu :

1. Menyiapkan medium BSA sehari sebelum digunakan dan menyimpannya di tempat yang gelap pada suhu ruangan.
2. Mengambil bakteri dari perbenihan cair sebanyak 1 ose.
3. Menggoreskan bakteri tersebut pada medium BSA.

4. Menginkubasikan biakan bakteri dalam medium BSA tersebut selama 18-24 jam dengan suhu 37°C dan amati hasilnya.
5. Menentukan hasil positif yaitu apabila ditemukan morfologi koloni bakteri *Salmonella Typhi* yang berbentuk bulat kecil, permukaan cembung, tepi rata, tidak berbau, dan didapatkan koloni khas berwarna hitam (*black jet colony*) (BD, 2011).

4.7.1.3 Identifikasi dengan *Triple Sugar Iron Agar*

1. Koloni *Salmonella Typhi* diambil dari biakan MacConkey, kemudian diinokulasikan pada (*Triple Sugar Iron*) TSI agar.
2. Inkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam serta tidak boleh lebih dari 24 jam.
3. Hasil reaksinya adalah terdapat warna merah pada bagian yang miring (*slant*) dan warna kuning pada pangkal tabung (*butt*). Warna merah tersebut menunjukkan reaksi basa. Warna kuning menunjukkan reaksi asam dan terjadi fermentasi dextrosa. Adanya produksi H₂S ditunjukkan dengan warna hitam pada bekas garis. Tidak ada gas yang diproduksi (BD, 2011).

4.7.1.4 Identifikasi dengan *Microbact 12E*

1. Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan dalam 3-6 ml larutan NaCl 9% dan dilakukan *vortex* hingga homogen.
2. Larutan bakteri yang homogen diteteskan ke dalam tiap sumur *Microbact* sebanyak 4 tetes.

3. Tambahkan 2 tetes mineral oil pada sumur yang berwarna hitam.
4. *Microbact* dinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
5. *Microbact* yang telah diinkubasi kemudian ditambahkan dengan *reagent* pada sumur nomor 7, 8, 10, dan 12. Pada sumur nomor 7, ditambahkan dengan *reagent* Nitrat A dan B sebanyak 2 tetes dan hasil dibaca setelah 2 menit. Pada sumur nomor 8, ditambahkan dengan *reagent* indol sebanyak 2 tetes dan hasil dibaca setelah 2 menit. Pada sumur nomor 10, ditambahkan dengan *reagent* VP I dan VP II masing-masing sebanyak 1 tetes kemudian hasil dibaca setelah 15 sampai 30 menit. Pada sumur nomor 12, ditambahkan dengan *reagent* TDA sebanyak 1 tetes dan hasilnya segera dibaca.
6. Evaluasi hasil dapat dilihat pada sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna.
7. Angka-angka oktal didapatkan dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktal).
8. Nama bakteri dilihat dengan *software microbact system* dikomputer berdasarkan angka oktal yang didapat (Oxoid, 2013).

4.7.1.5 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

1. Koloni *Salmonella Typhi* diambil dengan karakteristik sama dari media *Nutrient Agar Plate* dengan menggunakan ose.

2. Memasukkan koloni *Salmonella Typhi* tersebut ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth*, kemudian tabung reaksi diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. Melakukan pengukuran konsentrasi bakteri dengan menggunakan spektrofotometri pada tabung reaksi di atas dengan panjang gelombang 540 nm untuk mengetahui OD (Optical Density) dari suspensi.
4. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri (sesuai standar McFarland 0,5) sebesar 10^8 /mL yang setara dengan OD=0,1 dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan:

N_1 = Hasil spektrofotometri

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengencer

N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^8)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10mL)

Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume bakteri (V_1) yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml. Dari konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml dilakukan pengenceran dengan menambahkan 1 ml perbenihan (10^8 CFU/ml) ke dalam 9 ml MH *broth* untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10^7 CFU/ml. Kemudian dilakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1 ml perbenihan cair (10^7) untuk ditambahkan pada 9 ml MH *broth* sehingga akhirnya didapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu sebesar 10^6 CFU/ml. Kini suspensi bakteri telah siap digunakan untuk penelitian (Sutton, 2001).

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Daun Ceremai

4.7.2.1 Proses Ekstraksi

Daun ceremai dipilih yang segar, tidak kering, bukan daun pucuk dan dibersihkan. Daun yang dibutuhkan lebih kurang sebanyak 100 gram diiris tipis lalu dikeringkan dibawah sinar matahari dengan tujuan menguapkan kandungan air dalam daun sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak maksimum, sedangkan zat aktif yang terkandung dalam daun akan menguap pada suhu lebih tinggi, sehingga diperkirakan tidak ikut menguap bersama pengeringan tersebut. Daun yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender. Setelah halus, ditimbang lalu dibungkus menggunakan kertas saring. Kertas saring yang berisi daun ceremai dimasukkan ke dalam tabung ekstraksi. Tuang etanol ke dalam tabung ekstraksi sehingga daun ceremai terendam etanol 96%. Supaya etanol tercampur rata ke dalam bubuk ekstrak, sebaiknya larutan daun ceremai diaduk selama 15 menit. Diamkan larutan tersebut selama kurang lebih 12 jam. Setelah 12 jam, keluarkan etanol yang telah berisi zat aktif, kemudian ganti dengan satu liter etanol yang baru. Aduk selama 15 menit dan diamkan selama 12 jam. Ulangi langkah tersebut beberapa kali sampai air ekstrak jernih. Lalu hasil ekstraksi dievaporasi (Singh, 2008).

4.7.2.2 Proses Evaporasi

Evaporator setdipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30° - 40° terhadap meja percobaan dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator*, dan tabung pendingin. Kemudian tabung pendingin dihubungkan

dengan pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin dengan melalui pipa plastik. Tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan(Singh, 2008).

Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam labu penampung sedangkan *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan. Alat pemanas aquadest juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam labu penampung hasil evaporasi mendidih dengan suhu 80° C (sesuai titik didih etanol) dan etanol menguap. Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak bercampur dengan hasil evaporasi dan uap lain tersedot oleh pompa vakum (Singh, 2008).

Proses evaporasi dilakukan hingga hasil evaporasi berkurang dan menjadi kental. Setelah kental, evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap dan dioven selama 2 jam pada suhu 80° C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapat hasil ekstrak 100%, sejumlah 100 ml.

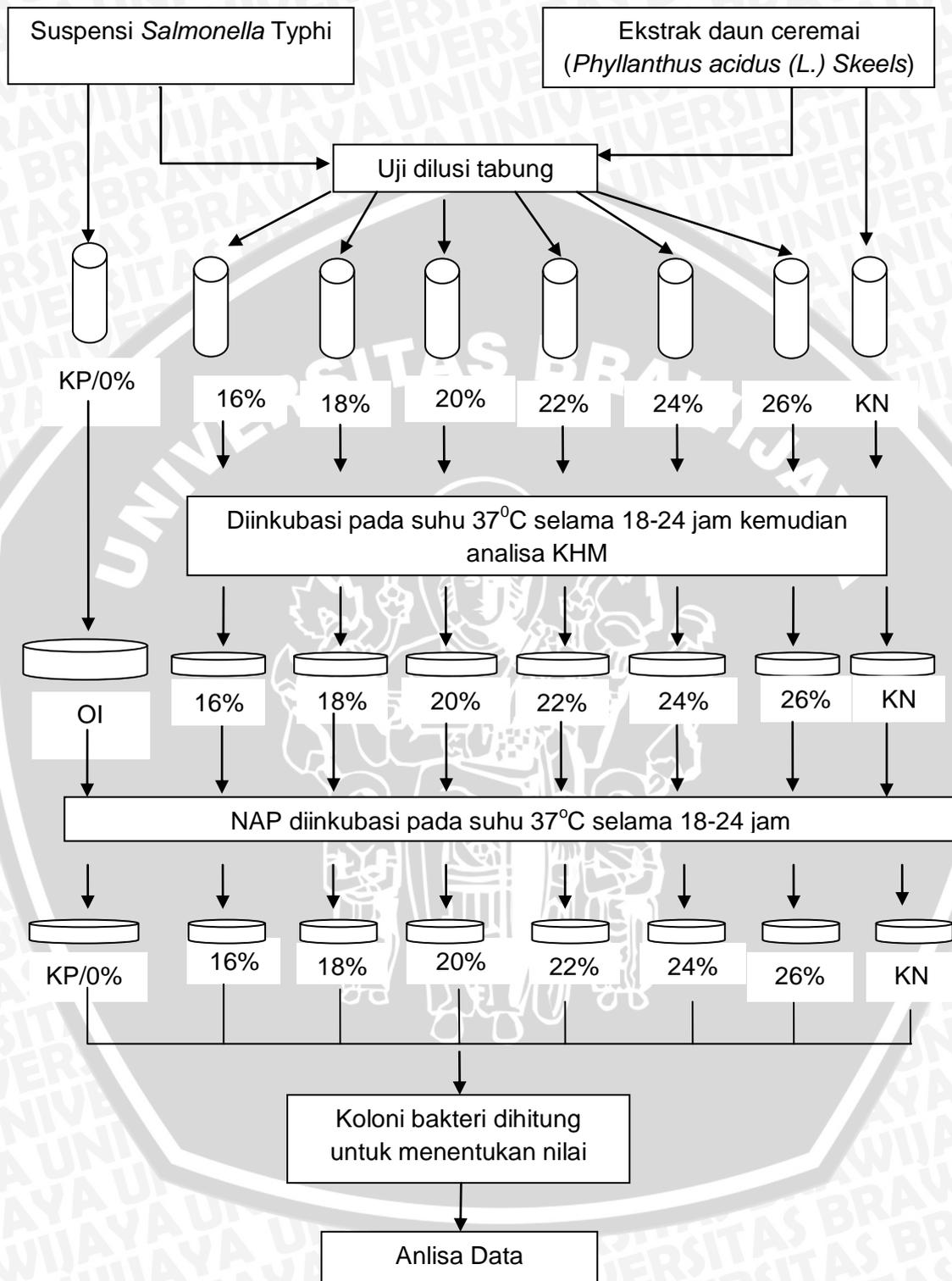
Hal ini bertujuan agar efek antimikroba ekstrak daun ceremai pada penelitian ini tidak dipengaruhi oleh etanol, karena ekstrak sudah mengalami proses evaporasi pada suhu 80°C, sedangkan titik didih etanol berada pada suhu 78°C (Singh, 2008).

4.7.3 Pengujian Efek Antimikroba

Rangkaian uji efek antimikroba ekstrak daun ceremai adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak daun ceremai disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit agar larutan ekstrak menjadi homogen dan tidak mengendap. Untuk perlakuan yang diambil adalah larutannya.
2. Menyediakan 6 tabung steril sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol positif (KP), dan 1 tabung sebagai kontrol negatif (KN).
3. Menyiapkan hasil suspensi bakteri *Salmonella* Typhi yang telah dilakukan standar inokulasi, yaitu suspensi bakteri dengan konsentrasi 1×10^6 /ml.
4. Pada tabung reaksi 0 diisi dengan 1 ml bakteri *Salmonella* Typhi dengan konsentrasi 1×10^6 (konsentrasi ekstrak 0%) dipakai sebagai kontrol bakteri atau kontrol positif (KP).
5. Pada tabung reaksi II diisi dengan 0,16 ml ekstrak daun ceremai ditambah 0,84 ml aquades steril. Lalu ditambah 1 ml suspensi bakteri, sehingga konsentrasi akhir tabung reaksi II adalah 16%.
6. Pada tabung reaksi III diisi dengan 0,18 ml ekstrak daun ceremai ditambah 0,82 ml aquades steril. Lalu ditambah 1 ml suspensi bakteri, sehingga konsentrasi akhir tabung reaksi III adalah 18%.
7. Pada tabung reaksi IV diisi dengan 0,2 ml ekstrak daun ceremai ditambah 0,80 ml aquades steril. Lalu ditambah 1 ml suspensi bakteri, sehingga konsentrasi akhir tabung reaksi IV adalah 20%.
8. Pada tabung reaksi V diisi dengan 0,22 ml ekstrak daun ceremai ditambah 0,78 ml aquades steril. Lalu ditambah 1 ml suspensi bakteri, sehingga konsentrasi akhir tabung reaksi V adalah 22%.
9. Tabung reaksi VI diisi dengan 0,24 ml ekstrak daun ceremai ditambah 0,76 ml aquades steril. Lalu ditambah 1 ml suspensi bakteri, sehingga konsentrasi akhir tabung reaksi VI adalah 24%.

10. Tabung reaksi VII diisi dengan 0,26 ml ekstrak daun ceremai ditambah 0,74 ml aquades steril. Lalu ditambah 1 ml suspensi bakteri, sehingga konsentrasi akhir tabung reaksi VII adalah 26%.
11. Pada tabung bertanda I sebagai kontrol bahan atau kontrol negatif (KN) diisi dengan 1 ml ekstrak daun ceremai dengan konsentrasi 100%.
12. Semua tabung uji, tabung kontrol, dan OI diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
13. Setelah 18-24 jam, diperhatikan dan dicatat derajat kekeruhan pada semua tabung. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan sebuah kertas putih dibelakang tabung, dimana sebelumnya pada kertas tersebut digambar sebuah garis hitam, kemudian garis hitam tersebut diperhatikan dari depan tabung. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.
14. Mengambil satu ose dari masing-masing tabung uji, kemudian dinokulasikan pada NAP dengan cara *streaking*, lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
15. Setelah diinkubasi, *Nutrient Agar Plate (NAP)* dikeluarkan dari inkubator untuk menentukan nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM) dengan pengamatan kuantitatif, yaitu menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter* pada masing-masing *Nutrient Agar Plate (NAP)*. Kadar Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh pada *Nutrient Agar Plate (NAP)* atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% dari jumlah koloni OI.



Gambar 4.1 Skema Alur Uji Antimikroba Ekstrak Daun Ceremai terhadap *Salmonella Typhi*

4.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan untuk mengetahui perbedaan pengaruh antara variabel bebas yaitu berbagai konsentrasi ekstrak daun ceremai terhadap variabel tergantung yaitu jumlah kolonibakteri *Salmonella Typhi* adalah uji statistik *one way ANOVA*. Dalam penelitian ini, besar kepercayaan yang dipakai adalah 95% (α) = 0,05. Bermakna bila $p < 0.05$. Data KHM dan KBM disajikan secara kualitatif dan kuantitatif. Data jumlah koloni berdasarkan dosis daun ceremai dianalisis secara statistik menggunakan fasilitas SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for windows versi 16.0. Sedangkan uji Regresi Linier digunakan untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas yaitu konsentrasi ekstrak daun ceremai terhadap variabel tergantung yaitu jumlah koloni bakteri *Salmonella Typhi*.

