

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini akan digunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorium, yaitu *true experiment-post test only control group design*, dengan menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Proses pengekstrakan daun sukun dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Pengujian ekstrak daun sukun sebagai antimikroba menggunakan metode dilusi tabung. Metode dilusi tabung meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada media *broth* untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan tahap penanaman pada medium *Nutrient Agar Plate* (NAP) dengan metode *streaking* (penggoresan) yang bertujuan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM).

4.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

4.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni – September 2013.

4.2.2 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini akan digunakan sampel berupa bakteri *Salmonella typhi* yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta (Lampiran 1).

4.4 Estimasi Jumlah Pengulangan

Dalam penelitian ini akan digunakan 5 perlakuan (konsentrasi ekstrak daun sukun), maka banyaknya pengulangan yang diperlukan dapat dicari dengan menggunakan rumus berikut $p(n-1) \geq 15$ dimana n = jumlah pengulangan yang diperlukan; p = jumlah perlakuan.

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4 \quad (\text{Solimun, 2001})$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan konsentrasi akhir 3%, 3,5%, 4%, 4,5% dan 5%. Konsentrasi akhir tersebut didapatkan melalui eksplorasi (penelitian pendahuluan).

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah tingkat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM).

4.6 Definisi Operasional

1. Sediaan yang digunakan sebagai ekstrak adalah daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang masih segar yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat Materia Medika, Batu. Sediaan ini diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan asumsi konsentrasi awal adalah 100%.
2. Daun sukun yang digunakan dalam penelitian ini telah dilakukan identifikasi di Laboratorium Biologi Universitas Brawijaya dan memiliki familia : Moraceae; genus : *Artocarpus*; spesies : *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg (Lampiran 2).
3. Bakteri *Salmonella typhi* yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta (Lampiran 1).
4. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi minimal ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* yang ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada larutan (Finegold *et al.*, 1986).
5. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi minimal ekstrak daun sukun yang mampu membunuh bakteri uji (*Salmonella typhi*) pada medium NAP (Dzen *dkk.*, 2010). KBM merupakan konsentrasi terendah

yang memungkinkan pertumbuhan hanya $< 0,1\%$ dari jumlah koloni

Original inoculum (OI).

6. *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.
7. Kontrol positif adalah tabung dengan sediaan bakteri tanpa penambahan ekstrak daun sukun.
8. Kontrol negatif adalah tabung dengan larutan ekstrak daun sukun tanpa penambahan bakteri.
9. Tingkat kekeruhan pada masing-masing tabung dievaluasi menggunakan kertas putih bergaris-garis hitam yang di posisikan tepat di belakang tabung.

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Sukun

Alat dan bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun sukun antara lain blender untuk menghaluskan daun sukun, kertas saring untuk membungkus serbuk daun sukun, gelas ekstraksi, seperangkat evaporator vakum, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator*, tabung pendingin dan pompa sirkulasi air dingin, bak penampung air dingin, pompa vakum, tabung penampung etanol, batu didih, cawan penguap, neraca analitik, bahan, daun sukun, etanol 96%, *aquabides*.

4.7.2 Alat dan Bahan untuk Uji Kepekaan Ekstrak Daun Sukun

Alat dan bahan yang digunakan untuk uji kepekaan ekstrak daun sukun antara lain tabung reaksi steril, pipet steril ukuran 1 ml dan 10 ml, karet

penghisap, inkubator, vortex, bunsen, korek api, kapas, *object glass*, plate kosong dan steril, alat penjepit (skalpel) steril, ose lengkung, *colony counter*, label, perbenihan cair bakteri *Salmonella typhi*, ekstrak daun sukun, *nutrient broth*, medium NAP, *aquabides*.

4.7.3 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

Alat dan bahan untuk identifikasi bakteri antara lain ose lurus, ose lengkung, kertas penghisap, minyak emersi, *object glass*, kaca penutup, mikroskop, tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, lampu spiritus, korek api, isolat *Salmonella typhi*, *selenite broth*, medium *Bismuth Sulfite Agar*, suspensi bakteri dari *Muller Hinton Broth*, bahan pewarnaan Gram : kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, *aquades* steril.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Identifikasi Bakteri

4.8.1.1 Pewarnaan Gram

Sampel bakteri *Salmonella typhi* diidentifikasi dengan pewarnaan Gram. Kemudian beberapa ose ditanam pada *nutrient broth* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Prosedur pewarnaan Gram (Dzen dkk., 2010):

1. Sterilisasi ose yang akan digunakan, dengan cara memanaskannya pada lampu bunsen sampai ose berpijar merah, lalu diamkan sejenak.
2. Setelah dirasa tidak terlalu panas, gunakan ose tersebut untuk mengambil sampel bakteri *Salmonella typhi* dan disapukan pada gelas objek dengan membentuk bulatan dari dalam keluar.

3. Setelah sediaan jadi, keringkan diudara lalu dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan gelas obyek diatas lampu bunsen yang menyala sebanyak tiga kali.
4. Sediaan lalu dituangi dengan kristal violet dan didiamkan selama 1 menit.
5. Setelah 1 menit, bersihkan sediaan dari kristal violet dan bilas sediaan dengan air.
6. Sediaan lalu dituangi larutan lugol sebagai mordant, dan dibiarkan selama 1 menit
7. Setelah 1 menit, buang sisa lugol dan bilas dengan air
8. Sediaan dituangi alkohol 96% sebagai peluntur selama 5-10 detik
9. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air
10. Sediaan dituangi safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik
11. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air
12. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 97-100 x.

4.8.1.2 Media Deferensiasi BSA (*Bismuth Sulfite Agar*) (Dzen dkk., 2010)

1. Biakan pada *selenite broth* (1 ose) ditanam pada BSA kemudian di inkubasi semalam pada suhu 37°C.
2. Koloni *Salmonella typhi* akan memberikan gambaran hitam (*black jet*) pada agar BSA.

4.8.2 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

Setelah dilakukan identifikasi bakteri, bakteri tersebut kemudian dipindahkan dalam tabung yang berisi *nutrient broth* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37° C. Perbenihan cair bakteri dari *nutrient broth* selanjutnya akan dinilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada gelombang cahaya 610 nm. Dari nilai absorbansi dapat diperkirakan jumlah kuman pada perbenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui yaitu absorbansi 0,1 ekuivalen dengan jumlah kuman sebesar 10⁸ CFU/ml. Dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

N_2 = *Optical density* (0,1= setara dengan 10⁸ CFU/ml)

N_1 sama dengan nilai absorbansi yang didapat sedangkan N_2 adalah absorbansi 0,1 yang ekuivalen dengan jumlah kuman 10⁸ CFU/ml. V adalah volume suspensi kuman. Sehingga diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10⁸/ml sebanyak 10 ml. Dari konsentrasi bakteri 10⁸ CFU/ml dilakukan pengenceran dengan menambahkan 1 ml perbenihan (10⁸ CFU/ml) ke dalam 9 ml *MH broth* untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10⁷ CFU/ml. Kemudian dilakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1 ml perbenihan cair (10⁷ CFU/ml) 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.

4.8.3 Pembuatan Ekstrak Daun Sukun

- Pengolahan daun sukun
 - Daun sukun yang masih segar dicuci dengan air bersih, kemudian ditiriskan dan diangin-anginkan sampai layu.
 - Daun sukun dibiarkan kering angin.
 - Daun sukun dihaluskan atau diblender, kemudian diayak.
- Ekstraksi dengan etanol
 - Daun sukun dalam bentuk serbuk sebanyak 100 gram dibungkus dengan kertas saring kemudian dimasukkan dalam kertas ekstraksi.
 - Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 96% dan dibiarkan terendam selama sekitar 3 hari. Ekstraksi dilakukan beberapa kali putaran dengan pergantian etanol.
- Proses evaporasi
 - Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan $30-40^\circ$ terhadap meja percobaan, dengan susunan dari bawah keatas: alat pemanas air, labu penampung, hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin spiral.
 - Hasil ekstraksi dipindah ke dalam labu pemisah ekstraksi.
 - Labu pemisah ekstraksi dihubungkan dengan bagian bawah *evaporator*.
 - Tabung pendingin spiral dihubungkan dengan bagian atas *evaporator*.

- Labu penampung hasil evaporasi dihubungkan dengan bagian atas *evaporator*.
- Tabung pendingin spiral dan pompa vakum dihubungkan dengan selang plastik.
- Tabung pendingin spiral dan pompa sirkulasi air dingin dihubungkan dengan selang plastik.
- Pompa sirkulasi air dingin ditempatkan dalam bak yang berisi *aquabides*.
- Letakkan satu set alat evaporasi sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam *aquabides* pada pompa sirkulasi air dingin.
- *Rotary evaporator*, pompa sirkulasi air dingin dan pompa vakum dijalankan.
- Alat pemanas air dinyalakan dan diatur suhunya sekitar 70-80°C (sesuai dengan titik didih etanol) sehingga hasil ekstraksi dalam labu pemisah ekstraksi mendidih dan pelarut etanol menguap.
- Hasil penguapan etanol dikondensasi menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap lain tersedot oleh pompa vakum.
- Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental.
- Setelah menjadi kental proses evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil.
- Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian dioven selama kurang lebih 2 jam pada suhu 80°C untuk menguapkan

pelarut yang tersisa, sehingga didapatkan hasil ekstrak daun sukun 100%.

- o Ekstrak kemudian ditimbang dengan neraca analitik.

4.8.4 Uji Sensitivitas Antimikroba

Rangkaian uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sukun adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak daun sukun disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit agar larutan ekstrak menjadi homogen dan tidak mengendap. Untuk perlakuan yang diambil adalah larutannya.
2. Sediakan 7 tabung steril, 5 tabung sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol positif (KP) dan 1 tabung sebagai kontrol negatif (KN).
3. Pada tabung 1-5, isikan sejumlah *aquades* dan ekstrak daun sukun sesuai dengan konsentrasi masing-masing tabung yang telah ditentukan.
4. Masukkan 1 mL ekstrak daun sukun saja ke dalam tabung KN dan masukkan 1 mL suspensi bakteri *Salmonella typhi* saja ke dalam tabung KP.
5. Masukkan 1 mL suspensi bakteri *Salmonella typhi* dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/mL ke dalam tabung 1-5.
6. Ambil bakteri dari tabung bertanda KN sebanyak 1 ose kemudian digoreskan pada NAP sebagai *original inoculum* kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
7. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat tingkat kekeruhan tabung dengan menggunakan kertas bergaris-garis hitam yang diposisikan di belakang tabung. Cara membaca derajat kekeruhan dengan membandingkan kejernihan tabung A-E dengan tabung KP.

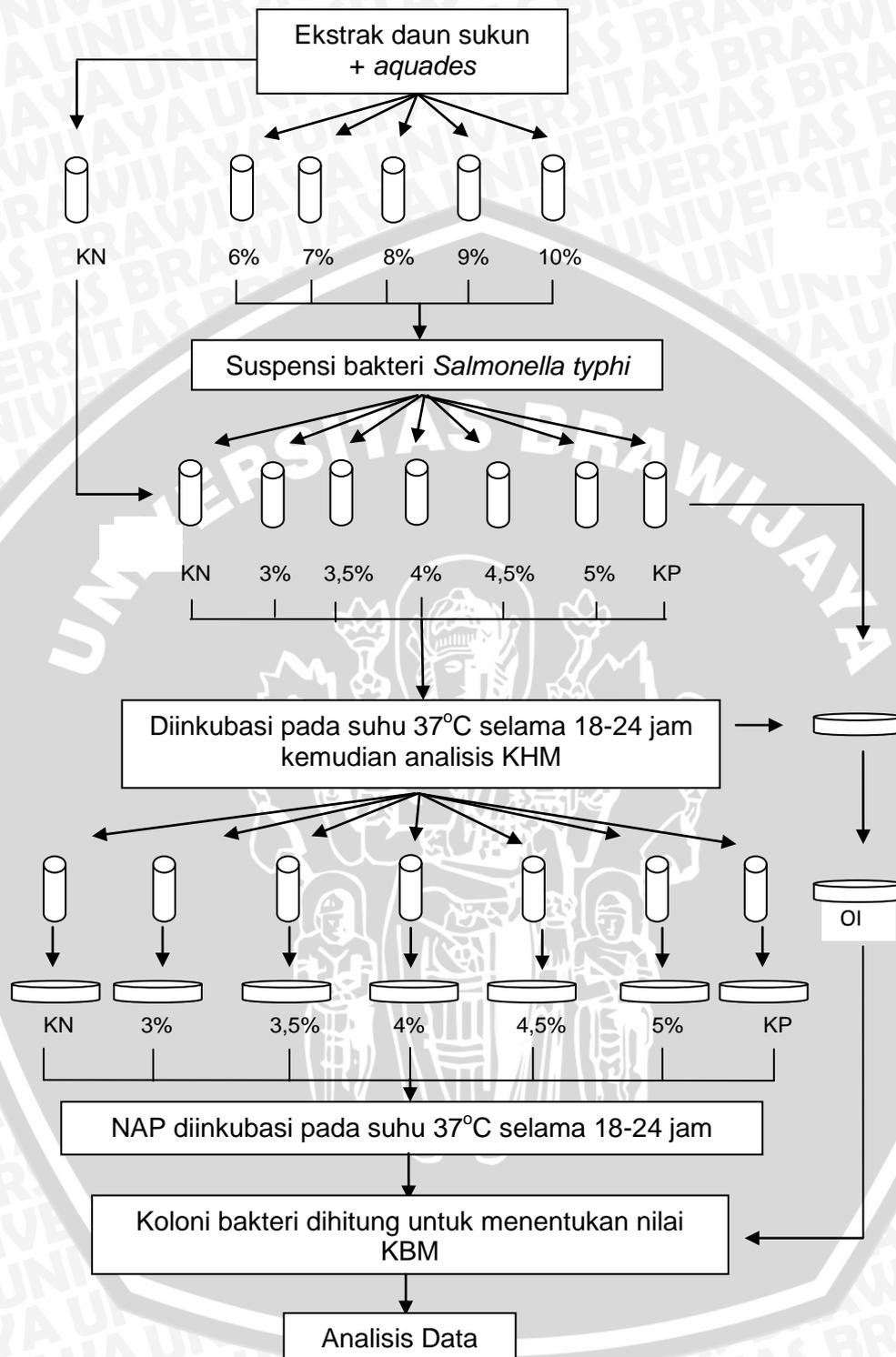
8. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada NAP yang berbeda. Kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C.
9. Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada NAP atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni OI.

Tabel 4.1 Persiapan Ekstrak Daun Sukun

Tabung	konsentrasi awal (%)	ekstrak (ml)	aquades (ml)	total (ml)
1	6	0,06	0,94	1
2	7	0,07	0,93	1
3	8	0,08	0,92	1
4	9	0,09	0,91	1
5	10	0,10	0,90	1
KN	100	1	0	1
KP	0	0	0	1

Keterangan: KN = kontrol negatif atau kontrol bahan

KP = kontrol positif atau kontrol bakteri



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

Keterangan : KP : Kontrol Positif

KHM : Kadar Hambat Minimal

KN : Kontrol Negatif

KBM : Kadar Bunuh Minimal

NAP : Nutrient Agar Plate

OI : Original Inoculum

4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari hasil penghitungan jumlah koloni bakteri *Salmonella typhi* pada medium NAP yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil penghitungan jumlah koloni yang tumbuh dikonversi ke dalam satuan CFU/ml dimana satu ose yang sudah dikalibrasi adalah sama dengan 5 mikroLiter. Sehingga 1 ml sama dengan 200 ose. Jadi jumlah koloni yang didapat dikalikan 200. Data tersebut kemudian dimasukkan ke tabel yang akan disusun berdasarkan konsentrasinya.

Data yang diperoleh yaitu data konsentrasi ekstrak daun sukun dan jumlah koloni bakteri *Salmonella typhi*. Analisis yang digunakan adalah uji ANOVA satu arah dan uji korelasi bivariat dengan menggunakan program SPSS untuk Windows. Uji *one way ANOVA* bertujuan untuk menganalisis perbedaan rata-rata jumlah koloni pada masing-masing konsentrasi. Analisis korelasi merupakan analisis yang digunakan untuk mengetahui adanya hubungan timbal balik antara dua buah variabel. Dalam penelitian ini, besar kepercayaan yang dipakai adalah 0.95 dan untuk tingkat signifikansi (α) = 0,05.