

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan studi eksperimental *in vitro* dengan *post test only control group design* untuk membuktikan efek antibakteri dari ekstrak daun duwet (*Syzygium cumini*) terhadap *E. coli* dengan metode dilusi agar (*Agar Dilution test*) untuk mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM). Uji efek antibakteri menggunakan dilusi agar dilakukan apabila ekstrak keruh, sehingga tidak dapat dilakukan dengan dilusi tabung.

4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan bakteri *E. coli* isolat urine yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pada penelitian ini jumlah sampel sebanyak 4 isolat didapat dengan menggunakan rumus yaitu sebagai berikut (Notobroto, 2005):

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22 \rightarrow n \geq 3,14 \approx 4$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan (6 konsentrasi ekstrak dan 1 kontrol bakteri)

n = jumlah sampel

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan September - Desember 2013. Pembuatan bahan ekstrak dilakukan di Laboratorium kimia Politeknik Negeri Malang.

4.4 Variabel

4.4.1 Variabel Bebas

Dalam penelitian ini variabel bebasnya adalah kadar larutan ekstrak daun duwet yaitu: 0% (kontrol bakteri), 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% yang diperoleh dari hasil eksplorasi.

4.4.2 Variabel Tergantung

Dalam penelitian ini variabel tergantungnya adalah tingkat pertumbuhan bakteri *E. coli* untuk menentukan KHM.

4.5 Definisi Operasional

Pada penelitian ini yang dimaksud dengan:

- a. Daun duwet yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun duwet yang segar, berwarna hijau muda dengan ukuran 8-10cm yang diambil dari lapangan Gedung Rektorat Universitas Brawijaya.
- b. Ekstrak daun duwet adalah sediaan dari hasil ekstraksi daun duwet dengan menggunakan pelarut etanol 96% melalui proses ekstraksi maserasi.
- c. *E. coli* yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 4 isolat yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

d. Kriteria penilaian hasil penelitian dibuat menggunakan sistem skoring dengan ketentuan sebagai berikut:

++++ : koloni tumbuh sangat tebal dan berdiameter lebar (>6mm)

+++ : koloni tumbuh tebal dan berdiameter kecil (≤ 6 mm)

++ : koloni tumbuh tipis dan berdiameter kecil (≤ 6 mm)

+ : koloni tumbuh sangat tipis dan berdiameter kecil (≤ 6 mm)

0 : tidak ada pertumbuhan

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat

Alat yang dibutuhkan dalam pembuatan ekstrak daun duwet adalah oven, blender, labu erlemeyer, timbangan, *rotary evaporator*, corong Buchner, botol steril bertutup, dan kertas saring Whatman no. 1. Alat yang digunakan untuk identifikasi bakteri adalah kaca objek dan kaca penutup, *plate*, lampu spiritus atau bunsen, ose, mikroskop, minyak emersi, korek api, dan spidol permanen. Alat yang digunakan untuk uji kepekaan ekstrak daun duwet adalah *plate* dengan diameter 9 cm, mikropipet 10 μ l, tabung reaksi, lampu spiritus, ose, vortex, inkubator, spektrofotometer, dan spidol permanen.

4.6.2 Bahan

Bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan ekstrak daun duwet adalah daun duwet, dan etanol 96%. Bahan yang dibutuhkan untuk identifikasi bakteri adalah kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, minyak emersi, medium EMB, medium McConkey. Bahan yang dibutuhkan dalam uji kepekaan ekstrak daun duwet adalah 4 isolat bakteri *E. coli*, ekstrak daun duwet, medium MH Agar, MH *broth*, NaCl, dan aquades.

4.7 Prosedur Pengumpulan Data

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Duwet

Langkah-langkah pembuatan Sediaan Ekstrak daun duwet melalui proses ekstraksi maserasi adalah sebagai berikut :

- a. Daun duwet (*Syzygium cumini*) yang masih segar dikumpulkan sejumlah 1 kilogram.
- b. Daun duwet dikeringkan dengan cara dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C selama kurang lebih 8 jam.
- c. Daun duwet dihancurkan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk daun duwet.
- d. Serbuk kering daun duwet ditimbang sebanyak 100 gram.
- e. Serbuk kering daun duwet dimasukkan ke dalam labu erlemeyer berukuran 1 L.
- f. Serbuk kering daun duwet direndam dengan etanol 96% hingga volume mencapai 900 ml.
- g. Labu erlemeyer dikocok hingga serbuk daun duwet tercampur etanol 96% kurang lebih selama 30 menit.
- h. Hasil kocokan didiamkan selama 1x24 jam.
- i. Hasil rendaman disaring menggunakan corong Buchner hingga didapatkan filtrat yang terpisah dari supernatannya.
- j. Supernatan hasil perendaman pertama direndam lagi dengan etanol 96% sehingga dihasilkan filtrat kedua.
- k. Supernatan hasil perendaman kedua direndam lagi dengan etanol 96% sehingga dihasilkan filtrat ketiga.

- l. Ketiga filtrat yang diperoleh dari perendaman pertama, kedua, dan ketiga dicampur menjadi satu.
- m. Filtrat diuapkan secara bertahap menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 80°C selama 1 jam hingga dihasilkan ekstrak daun duwet 100% yang siap digunakan sebagai bahan penelitian.
- n. Ekstrak daun duwet dimasukkan dalam botol steril, ditutup rapat, dan disimpan di tempat yang sejuk.

4.7.2 Persiapan Bakteri Uji

Isolat yang ada diidentifikasi dengan cara berikut: pewarnaan Gram, pembiakan bakteri pada medium EMB, dan pembiakan bakteri pada medium McConkey. Kemudian dilakukan preparasi bakteri uji hingga didapatkan bakteri sebesar 10^6 CFU/ml.

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

- a. Gelas obyek ditetesi satu ose aquades steril. Sedikit bakteri diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquades pada gelas obyek dan diratakan. Sediaan dibiarkan kering di udara. Setelah kering dilakukan fiksasi, sediaan siap diwarnai.
- b. Sediaan dituangi dengan kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit kemudian sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- c. Sediaan dituangi dengan lugol dan dibiarkan selama 1 menit. Kemudian sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- d. Sediaan dituangi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang.
- e. Sediaan dituangi dengan safranin selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.

- f. Sediaan dikeringkan dengan menggunakan kertas penghisap. Sediaan dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran obyektif 100x.

4.7.2.2 Pembiakan Bakteri pada Medium EMB (*Eosin Methylene Blue*)

Bakteri diinokulasikan ke agar EMB kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Koloni *E. coli* memberikan gambaran yang khas seperti kilatan logam.

4.7.2.3 Pembiakan Bakteri pada Medium McConkey

Bakteri diinokulasikan ke agar McConkey kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Koloni *E. coli* pada medium tersebut akan berwarna merah karena bakteri ini memfermentasikan laktosa.

4.7.2.4 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Sehari sebelum perlakuan, dilakukan penanaman bakteri yang telah teruji pada MH *broth*, dengan cara beberapa koloni *E. coli* yang seragam ditanamkan pada MH *broth*. Kemudian diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C.

Untuk pembuatan perbenihan cair bakteri dengan kepadatan 10⁶ CFU/ml. Pertama dilakukan pemeriksaan spektrofotometri pada hasil kultur medium cair MH *broth*, dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui nilai absorbansi dari suspensi. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar 10⁸ CFU/ml yang setara dengan OD (*Optical Density*) = 0.1, maka dilakukan perhitungan sebagai berikut:

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

Keterangan:

V₁ = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N₁ = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V₂ = Volume suspensi bakteri uji (10ml)

N₂ = OD

sehingga, diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml. Setelah itu dilakukan pengenceran 100 kali dengan menggunakan NaCl 0.9% dan MH *broth* sehingga diperoleh suspensi bakteri sebanyak 10 ml dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml.

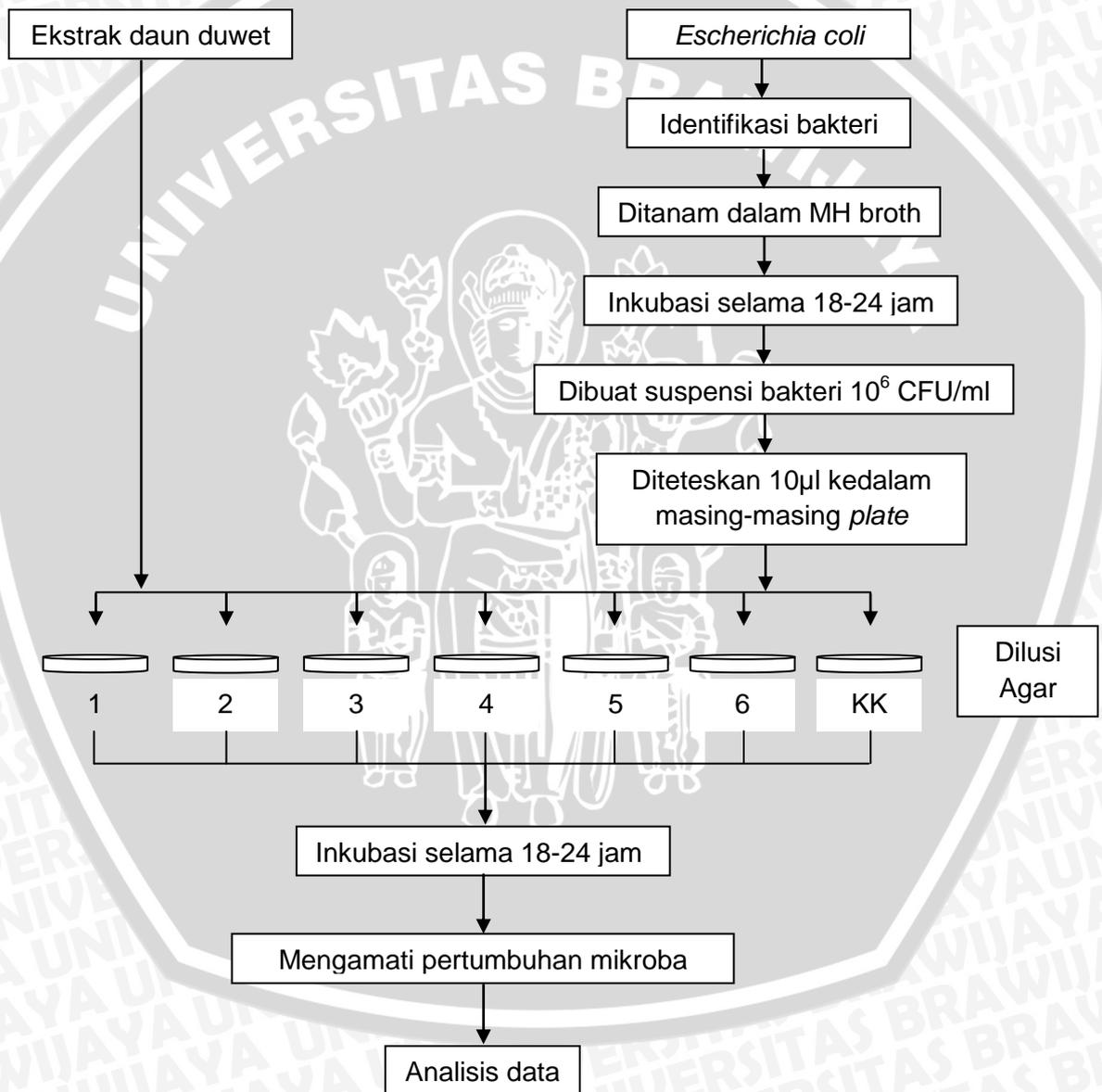
4.8 Perencanaan Proses dan Analisis Data

4.8.1 Pengujian Efek Antibakteri

- a. Disediakan 7 *plate* steril berdiameter 9 cm dan telah diberi tanda 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan KK. Masing-masing *plate* diisi larutan ekstrak dengan konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 0% dan dicampur dengan agar yang telah dipanaskan, lalu ditunggu hingga agarnya dingin.
- b. Total volume yang dipakai dalam setiap *plate* untuk mencampur agar adalah 10 ml, jadi volume ekstrak yang dimasukkan kedalam *plate* 1-6 dan KK adalah masing-masing :
 - 1) *Plate* KK (Konsentrasi 0%) berisi 10 ml agar
 - 2) *Plate* 1 (Konsentrasi 1%) berisi 0.1 ml ekstrak + 9.9 ml agar
 - 3) *Plate* 2 (Konsentrasi 2%) berisi 0.2 ml ekstrak + 9.8 ml agar
 - 4) *Plate* 3 (Konsentrasi 3%) berisi 0.3 ml ekstrak + 9.7 ml agar
 - 5) *Plate* 4 (Konsentrasi 4%) berisi 0.4 ml ekstrak + 9.6 ml agar
 - 6) *Plate* 5 (Konsentrasi 5%) berisi 0.5 ml ekstrak + 9.5 ml agar
 - 7) *Plate* 6 (Konsentrasi 6%) berisi 0.6 ml ekstrak + 9.4 ml agar
- c. Setelah agar dingin, setiap *plate* tersebut dibagi 4 untuk ditetesi 4 isolat bakteri uji yang berbeda sebanyak 10^4 bakteri/10 μ l. Kemudian semua *plate* diinkubasi selama 18-24 jam.

- d. Setelah itu koloni yang tumbuh pada *plate* agar dibaca. Apabila tidak tampak koloni yang tumbuh maka dapat disebut sebagai KHM larutan ekstrak.

4.8.2 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka operasional penelitian

Keterangan: KK : Kontrol bakteri
 1-6 : Kelompok perlakuan

4.8.4 Analisis Data

Data yang diperoleh merupakan data kualitatif dari hasil pertumbuhan koloni *E. coli* pada *plate* agar yang telah diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C berupa data konsentrasi ekstrak daun duwet dan pertumbuhan koloni bakteri. Analisis yang digunakan adalah uji statistik Kruskal Wallis dan Mann Whitney, tujuannya untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak daun duwet terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*. Selain itu dilakukan uji korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian perlakuan terutama yang disebabkan oleh pemberian ekstrak daun duwet dengan pertumbuhan koloni bakteri *E. coli*. Dalam penelitian ini besar kepercayaannya yang dipakai adalah 0.95 untuk tingkat signifikansi (α) = 0.05.

