

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini akan digunakan rancangan penelitian eksperimental laboratoris dengan desain penelitian post test only control group untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak daun kenanga terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Pada penelitian ini, dibuat dua kelompok, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan yaitu kelompok bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang diberi ekstrak daun kenanga dengan lima konsentrasi yang berbeda. Sedangkan kelompok kontrol adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang tidak diberi ekstrak daun kenanga.

4.2 Sampel dan Estimasi Jumlah Pengulangan

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Jumlah pengulangan yang digunakan dapat diketahui dengan rumus sebagai berikut:

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n = 4 \text{ (Loekito, 1998)}$$

Keterangan :

p : jumlah perlakuan (dosis)

n : Jumlah Pengulangan

Jadi pada penelitian ini, masing – masing perlakuan dilakukan empat kali pengulangan.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan pembuatan ekstrak dilaksanakan di Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang pada bulan Maret 2013

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Konsentrasi larutan ekstrak daun kenanga

Variabel tergantung : Jumlah koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

A. Alat

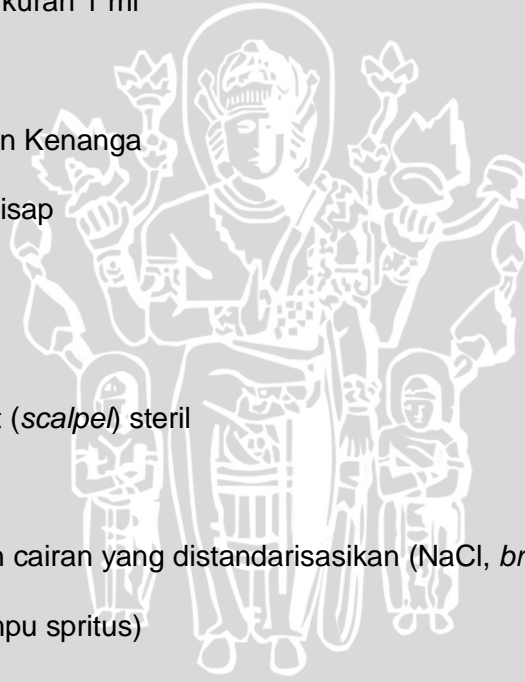
- Ose lurus, Ose lengkung
- Kertas penghisap, minyak emersi
- Object glass
- Mikroskop
- Tabung reaksi
- Penjepit tabung reaksi
- Rak tabung reaksi
- Lampu spiritus
- Korek api

B. Bahan

- Isolat *Pseudomonas aeruginosa*
- Pewarna Gram (kristal violet, lugol, alkohol asam, safranin)
- Nutrient broth
- Medium McConkey TSI (Triple Sugar Iron)
- Bahan tes IMVIC, urease, mobilitas

4.5.2 Alat dan Bahan Untuk Uji Dilusi Tabung :

- Tabung reaksi
- Pipet steril ukuran 1 ml
- Inkubator
- Ekstrak Daun Kenanga
- Karet penghisap
- NAP
- Korek api
- Alat penjepit (*scalpel*) steril
- Vortex
- Pembenihan cairan yang distandarisasikan (NaCl, *broth*)
- Bunsen (lampu spritus)
- Gelas objek
- Plate kosong dan steril
- *Colony counter*
- Kapas



4.5.3 Alat dan bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun kenanga

Alat dan bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak antara lain neraca analitik, *rotary evaporator vacuum*, gelas beker, pisau, blender, kertas saring, daun kenanga, etanol 96%.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Ekstrak Daun Kenanga

Sediaan ekstrak daun kenanga adalah sediaan 100 gram daun yang segar. Sediaan ini diekstrak dengan metode evaporasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan asumsi konsentrasi awal adalah 100%.

4.6.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi pada Nutrient Agar Plate yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.6.3 Kadar Hambat Minimal (KHM)

Kadar hambat minimal (KHM) ekstrak daun Kenanga adalah konsentrasi antimikroba ekstrak daun Kenanga terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, yang ditandai dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba), setelah diinkubasi selama 18-24 jam yang dibandingkan dengan larutan kontrol positif.

4.6.4 Kadar Bunuh Minimal (KBM)

Kadar bunuh minimal (KBM) ekstrak daun Kenanga adalah konsentrasi antimikroba ekstrak daun Kenanga terendah yang mampu membunuh bakteri

Pseudomonas aeruginosa, yang ditandai dengan tidak tumbuhnya koloni mikroba pada NAP setelah diinkubasi selama 18-24 jam yang dibandingkan dengan bahan kontrol negatif.

4.6.5 Kontrol Bakteri (Kontrol Positif)

Kontrol bakteri (kontrol positif) adalah konsentrasi ekstrak 0 % yang dapat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain. Kontrol positif berasal dari larutan bakteri uji yang telah distandardisasi dengan standar *Mc Farland* 0,5 sebanyak 2 ml.

4.6.6 Kontrol Bahan (Kontrol Negatif)

Kontrol bahan (kontrol negatif) adalah konsentrasi ekstrak 100% yang digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril. Kontrol negatif dibuat dengan cara mencampurkan antara ekstrak daun Kenanga sebanyak 1 ml dengan aquades sebanyak 1 ml.

4.6.7 *Original inoculum*

Original inoculum adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 Coloni Forming Unit/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi, dan digunakan untuk mencari kategori KBM.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Identifikasi Bakteri

4.7.1.1 Pewarnaan Gram

Sampel bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, kemudian beberapa ose ditanam pada nutrient broth dan diinkubasi selamam pada suhu 37° C.

Pewarnaan Gram (Dzen, *dkk.*, 2003) :

1. Lakukan sterilisasi ose yang akan digunakan, dengan cara memanaskannya pada lampu bunsen sampai ose berpijar merah, lalu diamkan sejenak.
2. Setelah dirasa tidak terlalu panas, lalu gunakan ose tersebut untuk mengambil sampel bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan disapukan pada gelas objek dengan membentuk bulatan dari dalam keluar.
3. Setelah sediaan jadi, keringkan diudara lalu dilakukan fiksasi dengan cara dilewatkan 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.

4.7.1.2 Microbact 12A/E-24E

1. Sebelum ditentukan menggunakan 12A/12E atau 24E, koloni bakteri dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negative menggunakan *Microbact system* 12A/12E saja, sedangkan jika hasil oksidasenya positif maka menggunakan 24E.
2. Koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 5 mL NaCl 0,9% pada tabung reaksi steril dan divortex hingga homogen.
3. Larutan bakteri yang telah homogen diteteskan ke dalam sumur *Microbact* sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
4. *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan 2 tetes reagen Nitrat A dan B pada sumur 7, pada sumur nomor 8 dengan *Indol Kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak satu tetes.
5. Untuk uji fermentasi karbohidrat pada *microbact* 12B, tanpa ada penambahan reagen yaitu hasil dari sumuran langsung bisa dibaca hasilnya, yaitu jika fermentasi positif menunjukkan warna kuning, sedangkan hasil negatif tidak ada perubahan warna tetap biru.
6. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan table warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*.
7. Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*).

8. Nama spesies bakteri dilihat dengan *software microbact system* di komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat

4.7.1.3 Perbenihan

Pada hari ke-1, biakan di nutrient broth diambil satu ose, lalu dilakukan tes oksidase, prosedur tes oksidase adalah sebagai berikut :

1. Pada penelitian ini dilakukan tes oksidase metode kertas filter
2. Kertas filter dibasahi dengan larutan reagen tetramethyl p-phenylenediamine didrochloride 1%
3. Koloni kuman yang diperiksa digoreskan pada kertas tersebut
4. Tes positif apabila warna goresan tersebut menjadi ungu sampai hitam dalam waktu ½-1 menit
5. Pada *Pseudomonas aeruginosa*, hasilnya adalah positif

4.8 Pembuatan Ekstrak Daun Kenanga

- Proses Ekstraksi

Daun kenanga terpilih (bersih, segar, tidak kering, bukan daun pucuk) 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 pengering tersebut. Daun yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender. Setelah halus, ditimbang lalu dibungkus menggunakan kertas saring. Kertas saring yang berisi daun kenanga dimasukkan ke dalam tabung ekstraksi. Kemudian masukan etanol ke dalam tabung ekstraksi sehingga daun kenanga terendam etanol 96%. Supaya etanol tercampur rata ke dalam bubuk

ekstrak, sebaiknya larutan daun kenanga 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 12 jam. Ulangi langkah tersebut beberapa kali sampai air ekstrak jernih. Lalu hasil ekstraksi dievaporasi.

- Proses evaporasi
 1. 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.
 2. Hasil ekstraksi dipindah kedalam labu pemisah ekstraksi
 3. Labu pemisah ekstraksi dihubungkan dengan bagian bawah evaporator
 4. Tabung pendingin spiral dihubungkan dengan bagian atas evaporator
 5. Labu penampung hasil evaporasi dihubungkan dengan bagian atas evaporator
 6. Tabung pendingin spiral dan pompa vakum dihubungkan dengan selang plastik
 7. Tabung pendingin spiral dan pompa sirkulasi air dingin dihubungkan dengan selang plastik
 8. Pompa sirkulasi air dingin ditempatkan dalam bak yang berisi akuabides
 9. Letakkan satu set alat evaporasi sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam akuabides pada pompa sirkulasi air dingin

10. Rotary evaporator, pompa sirkulasi air dingin, dan pompa vakum dijalankan
11. 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.
12. Hasil penguapan etanol dikondensasi menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap lain tersedot oleh pompa vakum
13. Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental
14. Setelah kental proses evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil
15. 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 Kenanga 100%
16. Ekstrak kemudian ditimbang dengan neraca analitik

4.8.1 Uji Sensitivitas Antimikroba

Rangkaian uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kenanga adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak daun kenanga disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit agar larutan ekstrak menjadi homogen dan tidak mengendap. Untuk perlakuan yang diambil adalah larutannya.
2. Sediakan 8 tabung steril, 6 tabung sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol positif (KP), dan 1 tabung sebagai kontrol negatif (KN).
3. Masukkan 0,975 mL aquades steril ke dalam tabung 1 lalu tambahkan 0,025 mL ekstrak daun kenanga (2,5%).

4. Masukkan 0,950 mL aquades steril ke dalam tabung 2 lalu tambahkan 0,05 mL ekstrak daun kenanga (5%).
5. Masukkan 0,925 mL aquades steril ke dalam tabung 3 lalu tambahkan 0,075 mL ekstrak daun kenanga (7,5%).
6. Masukkan 0,9 mL aquades steril ke dalam tabung 4 lalu tambahkan 0,1 mL ekstrak daun kenanga (10%).
7. Masukkan 0,875 mL aquades steril ke dalam tabung 5 lalu tambahkan 0,125 mL ekstrak bunga kenanga (12,5%).
8. Masukkan 0,85 mL aquades steril ke dalam tabung 6 lalu tambahkan 0,15 mL ekstrak bunga kenanga (15%).
9. Masukkan 1 mL ekstrak daun kenanga saja ke dalam tabung KP dan masukkan 1 mL suspensi kuman saja ke dalam tabung KN.
10. Masukkan 1 mL suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/mL ke dalam tabung 1-6.
11. 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 .
12. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung. Cara membaca derajat kekeruhan dengan membandingkan kejernihan tabung A-E dengan tabung KP.
13. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada NAP yang berbeda. Kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C .
14. 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% inokulum OI.

4.9 Analisa Data

Data KHM dan KBM disajikan secara kualitatif dan kuantitatif. Data jumlah koloni berdasarkan dosis daun Kenanga dianalisis secara statistik menggunakan fasilitas SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) 15.0. Untuk mengetahui perbedaan antara variabel bebas yaitu dosis ekstrak daun Kenanga terhadap variabel tergantung yaitu jumlah koloni digunakan uji parametrik ANOVA (*Analisis of Variance*) satu arah. Uji Regresi Linier digunakan untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas yaitu dosis ekstrak daun Kenanga terhadap variabel tergantung yaitu jumlah koloni.

4.10 Diagram Alur Penelitian

Larutan ekstrak daun Kenanga dalam MH Broth dengan 4 konsentrasi yang

berbeda



Ditambahkan 1 ml suspensi kuman *Pseudomonas aeruginosa* pada masing-

masing tabung



Konsentrasi akhir larutan ekstrak daun Kenanga akan berubah menjadi 5

konsentrasi yang berbeda



Masing-masing tabung divorteks dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰



Disiapkan kontrol negatif (kontrol bahan) dan kontrol positif (kontrol bakteri)



Kontrol bakteri langsung digoreskan pada medium NAP dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C



Pada hari kedua, kekeruhan yang terjadi diamati dan dibandingkan dengan kontrol negatif



Ditentukan KHM larutan ekstrak daun Kenanga



Inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰ C



Ditentukan KBM bahan uji dan dibandingkan perbedaan kepadatan koloni kuman pada NAP yang telah dilakukan streaking larutan daun Kenanga dengan konsentrasi berbeda tersebut



Analisis data

