

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah *True Experimental – Post test only Control Group Design* secara *in vitro* dengan uji dilusi tabung (*Tube Dilution Test*) untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak etanol batang Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*. *Tube Dilution Test* ditujukan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) (Dzen dkk, 2003). Desain penelitian menggunakan dua kelompok, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada Tahun 2013.

4.3 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol batang Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*) dan menggunakan sampel bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya serta Rumah Sakit Saiful Anwar Malang yang berasal dari penderita Pneumonia.

4.4 Pengulangan

4.4.1 Pengulangan

Pada penelitian ini, digunakan 5 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda serta 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif. Pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus estimasi pengulangan $p(n-1) \geq 15$ (Loekito, 1998).

Berdasarkan rumus tersebut perhitungan pengulangan perlakuan adalah sebagai berikut:

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 22/7$$

$$n \geq 3,1 \rightarrow 4$$

Jadi besarnya pengulangan yang dilakukan adalah 4 kali.

Keterangan : n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (konsentrasi ekstrak etanol batang Kayu Secang).

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Pengukuran variabel tergantung yaitu, dengan melihat kekeruhan dan jumlah pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

4.5.2 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian konsentrasi ekstrak etanol batang Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*) yang berbeda-beda dengan konsentrasi 17,5%, 16,25%, 15%, 13,75%, dan 12,5%.

4.6 Definisi Operasional

- 4.6.1. Ekstrak etanol batang Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang dengan pelarut etanol yang kemudian dievaporasi sedemikian rupa.
- 4.6.2. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang digunakan diperoleh dari kultur bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- 4.6.3. Uji kepekaan metode *tube dilution test* adalah uji kepekaan *in vitro* dengan melakukan satu seri pengenceran antimikroba, kemudian ditambahkan perbenihan cair yang telah mengandung bakteri.
- 4.6.4. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* (ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung apabila dibandingkan dengan kontrol).
- 4.6.5. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi antimikroba terendah pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* setelah biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada medium agar padat, diinkubasikan, kemudian keesokan harinya diamati ada

tidaknya koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh. KBM ditentukan pada konsentrasi ekstrak yang jumlah koloni bakteri pada NAP <0,1% dari jumlah koloni yang terdapat pada *original inoculum*.

4.7 Pengukuran Pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*

Untuk mengukur pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, dilakukan penghitungan jumlah koloni dengan menggunakan *colony counter*.

4.8 Alat dan Bahan Penelitian

4.8.1 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Alat

- a. Ose lurus, ose lengkung
- b. Kertas penghisap, minyak emersi
- c. Mikroskop
- d. Tabung reaksi
- e. Lampu spiritus
- f. *Oksidase detektor trips*

2. Bahan

- a. Isolat *Klebsiella pneumoniae*
- b. Pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin)
- c. *Nutrient broth*
- d. *Medium Mc Conkey Agar*
- e. TSI Agar
- f. Bahan tes IMIVIC-MU

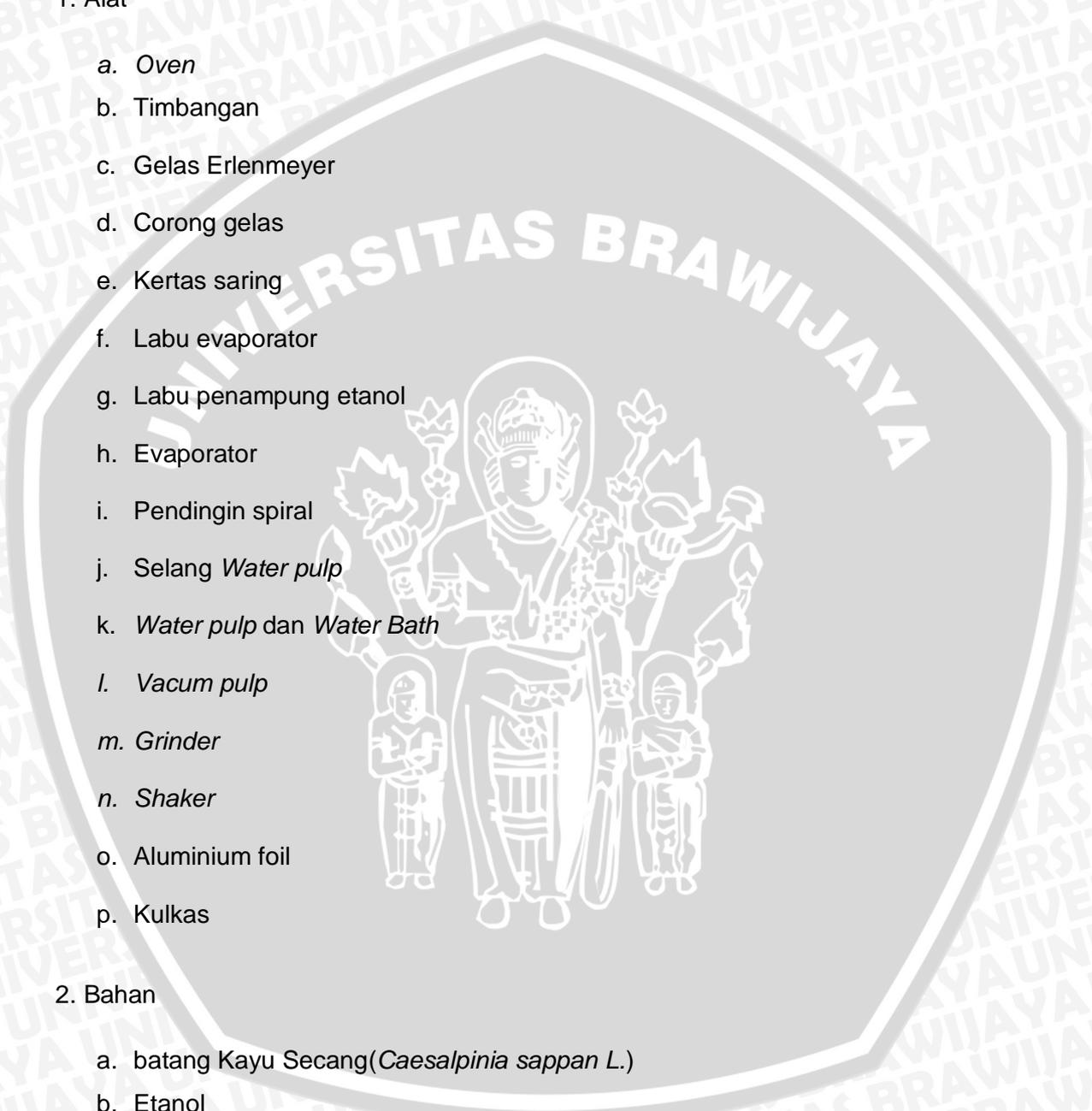
4.8.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Etanol Batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*)

1. Alat

- a. Oven
- b. Timbangan
- c. Gelas Erlenmeyer
- d. Corong gelas
- e. Kertas saring
- f. Labu evaporator
- g. Labu penampung etanol
- h. Evaporator
- i. Pendingin spiral
- j. Selang *Water pulp*
- k. *Water pulp* dan *Water Bath*
- l. *Vacum pulp*
- m. *Grinder*
- n. *Shaker*
- o. Aluminium foil
- p. Kulkas

2. Bahan

- a. batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*)
- b. Etanol
- c. Akuades
- d. Botol hasil ekstrak



4.8.3 Alat dan Bahan Uji Kepekaan Ekstrak Etanol Batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*)

1. Alat

- a. Tabung reaksi steril
- b. Ose lengkung
- c. Mikropipet (1mL)
- d. Inkubator
- e. Lampu spiritus
- f. Label
- g. *Vortex*

2. Bahan

- a. Perbenihan cair *Klebsiella pneumoniae*
- b. Ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*)
- c. *Nutrient Broth*
- d. *Nutrient Agar plat* (NAP)
- e. Akuades steril

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Identifikasi Bakteri

4.9.1.1 Pewarnaan Gram

Pada hari pertama, sampel *Klebsiella pneumoniae* diidentifikasi dengan pewarnaan Gram. Kemudian beberapa ose larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae* ditanam pada *broth*, lalu diinkubasikan semalam pada suhu 37°C.

Sebelum memulai pewarnaan, bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak dan bakteri kontaminan. Kemudian diamkan 1-3 detik agar gelas obyek tidak terlalu panas.

1. Satu ose Akuades steril diteteskan pada gelas obyek, kemudian ambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan Akuades yang telah diletakkan diatas gelas obyek. Kemudian biarkan kering diudara.
2. Suspensi bakteri yang telah kering afiksasi dengan cara melewatkannya diatas api beberapa kali dan sediaan siap diwarnai.
3. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan tunggu selama satu menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan air perlahan-lahan,
4. Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit, lalu lugol dibuang dan dibilas dengan air.
5. Sediaan ditetesi alkohol 96% dan ditunggu selama 5-10 detik, kemudian alkohol 96% segera dibuang dan dibilas dengan air.
6. Sediaan ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama 30 detik kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat di bawah mikroskop.

4.9.1.2 Tes IMViC

Tes IMViC adalah seperangkat tes yang berguna untuk mengidentifikasi anggota famili Enterobacteraceae. Tes ini terdiri dari empat tes, yaitu *Indole test* (tryptone broth), *Methyl Red test* dan *Voges-Proskauer test* (MRVP broth) dan *Citrate test* (Citrate agar slants)(Rao, 2006).

4.9.1.3.1 Tes Indole

Bakteri yang akan di tes diinokulasikan pada larutan pepton yang mengandung asam amino triptofan dan diinkubasi selama satu malam pada suhu 37⁰ C. Selama inkubasi, tambahkan beberapa tetes Reagen Kovac's. Reagen Kovac's terdiri dari para-dimethyl amino benzaldehyde dan isoamyl alcohol. Bentuk cincin warna merah atau pink di bagian atas menunjukkan hasil yang positif.

4.9.1.3.2 Tes Methyl Red(MRVP *broth*)

Bakteri yang akan diuji diinokulasikan pada glucose phosphate *broth*, yang mengandung Glukosa dan *buffer* Fosfat serta diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 48 jam. Lebih dari 48 jam, organisme pembuat asam harus membuat asam yang cukup untuk mengatasi *buffer* Fosfat dan sisa asam. Derajat keasaman media diuji dengan penambahan lima tetes Reagen Methilen Merah. Bentuk Warna merah menandakan hasil yang positif. Organisme negatif Methilen Merah menghasilkan warna kuning.

4.9.1.3.3 Tes Voges-Proskauer

Bakteri yang akan diuji diinokulasikan pada glucose phosphate *broth* dan diinkubasi selama 48 jam. Tambahkan 0.6 ml alpha-naphthol pada *broth* uji kemudian goyangkan. Tambahkan 0.2 ml KOH 40% pada *broth* kemudian goyangkan lagi. Tabung ditempatkan berdiri selama 15 menit. Warna merah menandakan hasil tes yang positif.

4.9.1.3.4 Tes Citrate(Simmon's Citrate slant)

Koloni bakteri dibawa dari Ose dan diinokulasikan pada daerah lereng dari Simmon's citrate agar dan diinkubasi selama satu malam pada suhu 37⁰C. Jika Organisme tersebut mempunyai kemampuan untuk menggunakan Citrate, media akan berubah warna dari hijau ke biru.

4.9.1.3 Penanaman pada *Media Nutrient Agar*

Dilakukan inkubasi bakteri pada media *Nutrient Agar* yang kemudian diinkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C, selama 18-24 jam. Penanaman ini untuk melihat pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan gambaran koloni besar dan *lob-convex*, kasar, dan biasanya mukoid dengan tumbuh segaris dengan garis *streaking*. Kultur berbau khas yang disebut “*cor taco like odor*” (Brisse *et al.*, 2006).

4.9.2 Perbenihan Cairan Bakteri 10⁶bakteri/ml

Suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada medium *Nutrient broth* dispektrofotometri dengan panjang gelombang (λ) 625 nm sehingga diketahui kepadatan bakterinya (OD = *Optical Density*) 0,1 setara dengan angka standard Mc Farland 0,5 yang setara dengan kepadatan bakteri 1x10⁸ bakteri/ml.

Biakan cair dengan konsentrasi bakteri 1x10⁶ bakteri/ml, dapat dibuat melalui langkah-langkah sebagai berikut :

1. Ambil 1 ml larutan dengan konsentrasi bakteri 1x10⁸ bakteri/ml tersebut, dan masukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml MH *broth*. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi 1x10⁷ bakteri/ml.
2. Ambil lagi 1 ml larutan dengan konsentrasi 1x10⁷ bakteri/ml tersebut, dan masukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml MH *broth* steril. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi 1x10⁶ bakteri/ml. Biakan bakteri siap digunakan untuk penelitian.

4.9.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan* L.)

4.9.3.1 Proses Pengeringan

1. batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*) dibersihkan.
2. Memotong kecil-kecil
3. batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*) yang telah dipotong kecil-kecil lalu dioven dengan suhu 64,7°C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air).

4.9.3.2 Proses Ekstraksi

1. Kemudian digrinder sampai halus dan jika telah halus.
2. Bubuk batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*) ditimbang dengan menggunakan timbangan sebanyak 1 kg kemudian dimasukkan dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter.
3. Kemudian direndam didalam campuran larutan etanol dengan volume 960ml dan Akuades 240 ml yang ditutup alumunium foil setelah itu dishaker dengan kecepatan 122 mot 1/min selama 1 jam 45 menit, lalu disimpan dalam kulkas. Kemudian dishaker setiap hari selama 30 menit dalam waktu 1 minggu dan sampel disaring dengan kertas saring. Setelah itu dievaporasi sampai volume mencapai 1/10 volume awal.

4.9.3.2 Proses Evaporasi

1. Evaporator set dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30° – 40° terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin.
2. Kemudian tabung pendingin dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui pipa plastik. Tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.

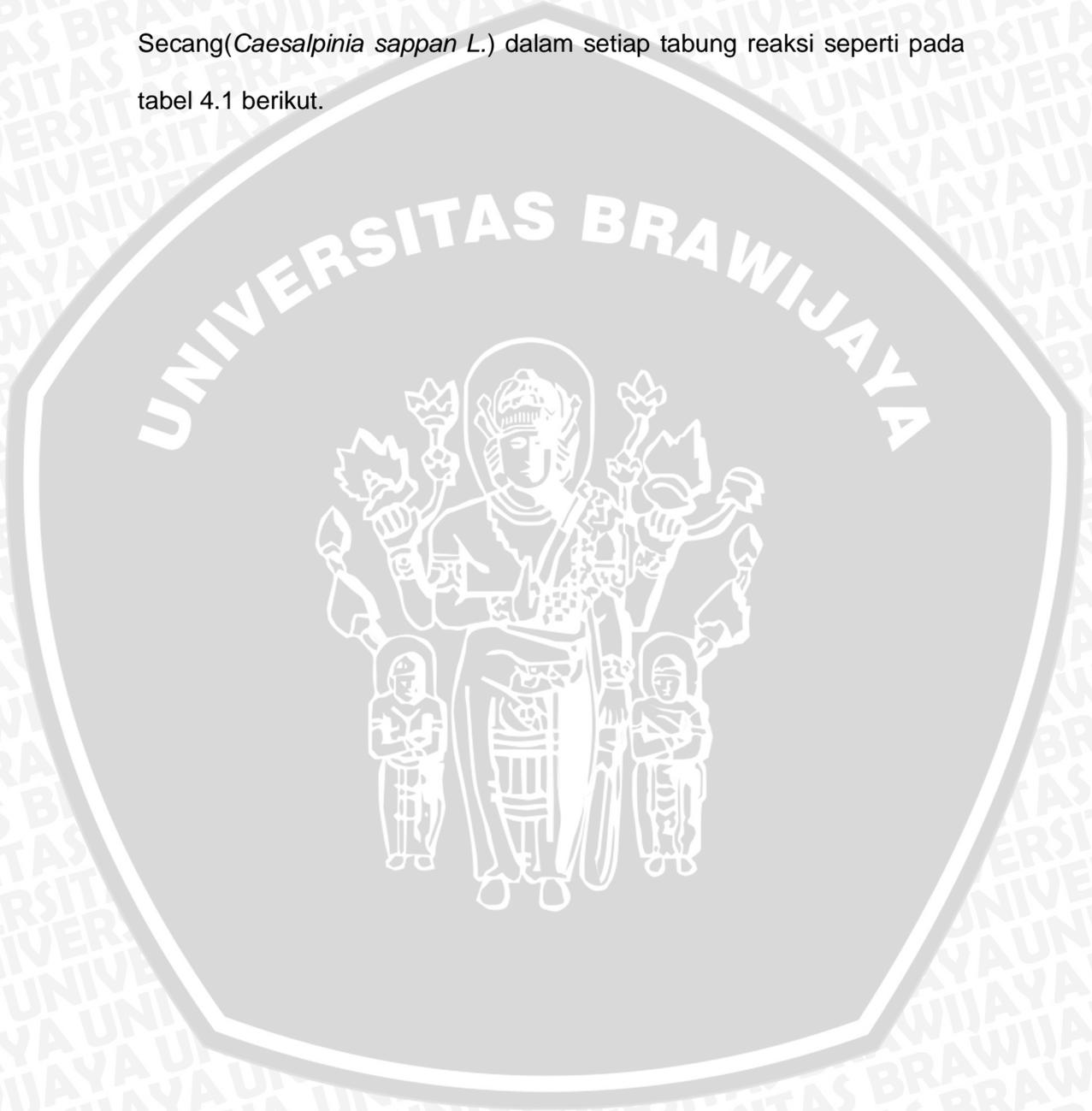
3. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu penampung sedangkan *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.
4. Pemanas Akuades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih dengan suhu 78°C (sesuai titik didih etanol) dan etanol mulai menguap.
5. Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.
6. Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil berkurang dan menjadi kental.
7. Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil.
8. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven selama 2 jam pada suhu 78°C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstrak 100% berbentuk cair sebanyak 500 ml.

4.9.4 Uji Kepekaan Antimikroba Ekstrak Etanol Batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*)

1. Siapkan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan konsentrasi sebesar 10^6 bakteri/ml.
2. Disediakan 7 tabung reaksi masing-masing dibuat kadar ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*) 17,5%, 16,25%, 15%, 13,75%, dan 12,5% dan 2 tabung kontrol yaitu 1 kontrol bakteri dan 1 kontrol bahan.

3. Tabung reaksi 1 diisi dengan 1 ml ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*) sehingga konsentrasi ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*) adalah 100%.
4. Tabung reaksi 2 diisi dengan 0,35 ml ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*)+ 0,65 ml Akuades steril+ 1 ml bakteri, sehingga konsentrasi ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*) adalah 17,5%.
5. Tabung reaksi 3 diisi dengan 0,325 ml ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*)+ 0,675 ml Akuades steril+ 1 ml bakteri, sehingga konsentrasi ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*) adalah 16,25%.
6. Tabung reaksi 4 diisi dengan 0,3 ml ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*)+ 0,7 ml Akuades steril+ 1ml bakteri, sehingga konsentrasi ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*) adalah 15%.
7. Tabung reaksi 5 diisi dengan 0,275 ml ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*)+ 0,725 ml Akuades steril+1 ml bakteri, sehingga konsentrasi ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*) adalah 13,75%.
8. Tabung reaksi 6 diisi dengan 0,25 ml ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*)+ 0,75 ml Akuades steril+ 1 ml bakteri, sehingga konsentrasi ekstrak etanol batang Kayu Secang(*Caesalpinia sappan L.*) adalah 12,5%.
9. Tabung reaksi 7 diisi 2 ml bakteri *Klebsiella pneumoniae* untuk kontrol positif.

10. Tabung reaksi 2-6 ditambahkan dengan bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan konsentrasi 10^6 bakteri/ml dalam tabung, masing-masing sebanyak 1 ml. Sehingga kadar ekstrak etanol batang Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*) dalam setiap tabung reaksi seperti pada tabel 4.1 berikut.



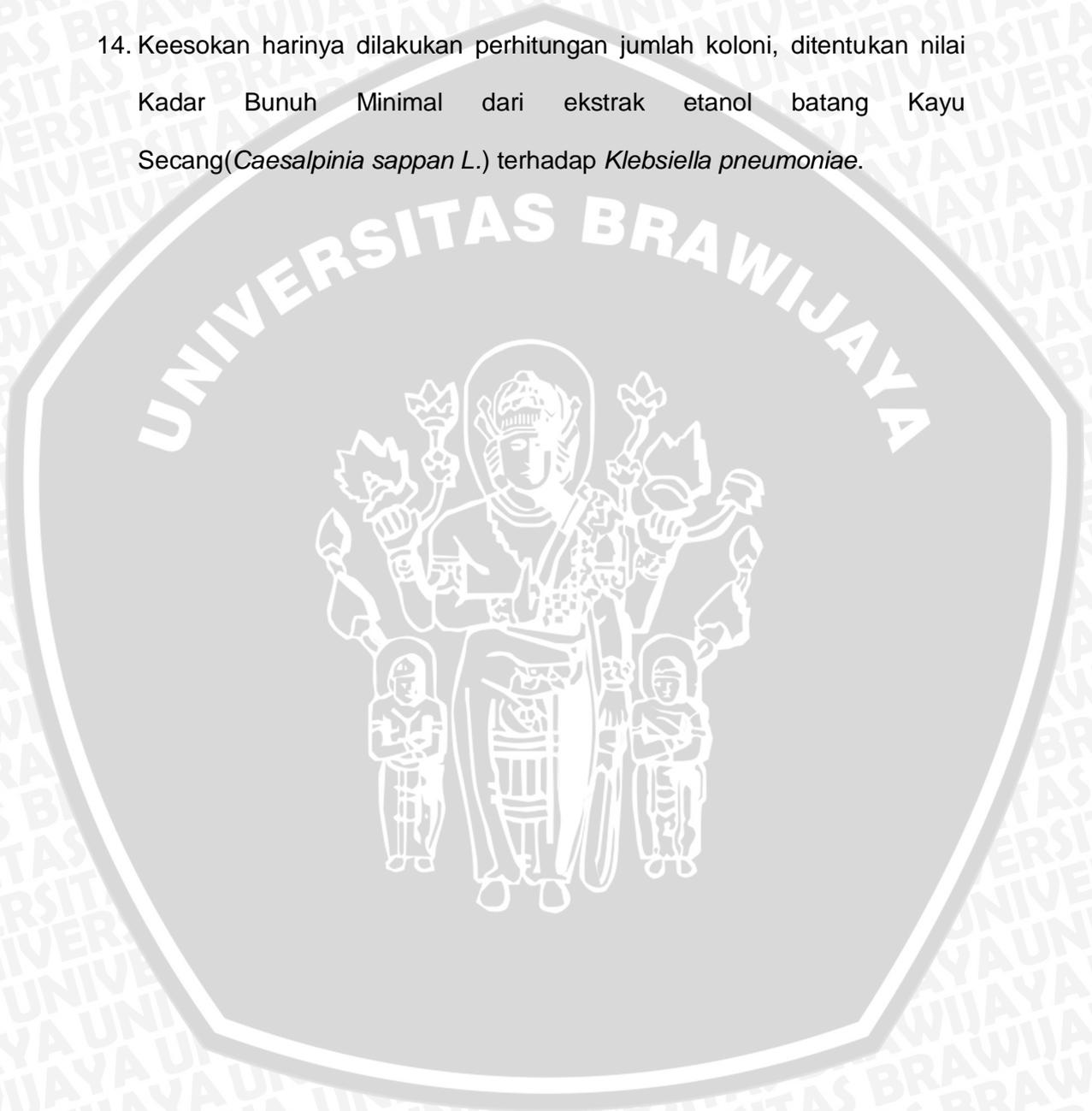
Tabel 4.1 Persiapan Konsentrasi Ekstrak etanol batang Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.)

No.	Tabung g 1	Tabung 2	Tabung 3	Tabung 4	Tabung 5	Tabung 6	Tabung 7
Konsentrasi	Kontrol bahan	35%	32,5%	30%	27,5%	25%	Kontrol bakteri
Volume bahan (ml)	2	0,35	0,325	0,3	0,275	0,25	0
Volume Akuades (ml)	0	0,65	0,675	0,7	0,725	0,75	1
Perbenihan bakteri (ml)	0	1	1	1	1	1	1
Konsentrasi Akhir	100%	17,5%	16,25%	15%	13,75%	12,5%	0%

10. Dari tabung reaksi 7 diambil larutan sebanyak 1 ose kemudian dilakukan penggoresan pada NAP untuk membuat *original inoculum*
11. Tabung reaksi 1-7 diinkubasi pada suhu 37°C – 37,5°C selama 18-24 jam.
12. Keesokan harinya dilakukan pencatatan terhadap tabung yang mulai terjadi kekeruhan. Kadar terendah pada tabung yang menunjukkan tidak adanya kekeruhan merupakan KHM.
13. Untuk memperoleh data KBM, dilakukan penanaman isi tabung yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan (kekeruhan) sebanyak 0,1 ml

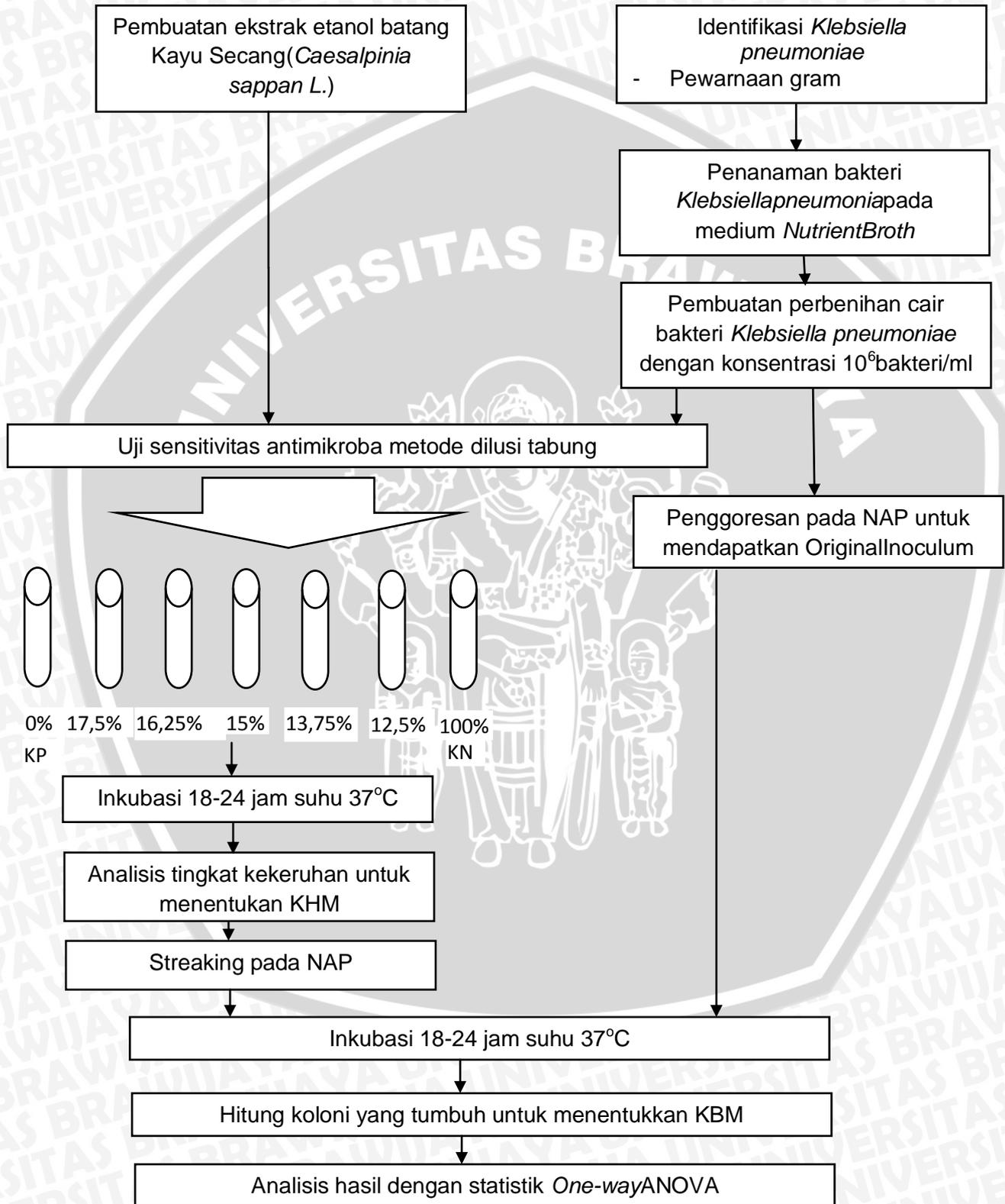
(satu mata ose) pada medium NAP. Kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam kemudian dilihat ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri.

14. Keesokan harinya dilakukan perhitungan jumlah koloni, ditentukan nilai Kadar Bunuh Minimal dari ekstrak etanol batang Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*) terhadap *Klebsiella pneumoniae*.



Secara sistematis , alur kerja dapat dilihat pada gambar 4.1 halaman

berikut.



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

KP : Kontrol Positif, KN : Kontrol Negatif, NAP : Nutrient Agar Plate, KHM : Kadar Hambat Minimal, KBM : Kadar Bunuh Minimal

4.10 Pengumpulan dan Analisa Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari hasil penghitungan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* pada NAP yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Data tersebut kemudian dimasukkan dalam tabel. Seluruh teknik pengolahan data hasil penelitian akan dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan software *Statistical Product and Service Solutions 17 (SPSS 17) for windows* dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

Pada penelitian ini, variabel yang akan dianalisis yaitu jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* yang dihasilkan pada NAP berdasarkan tingkat konsentrasi ekstrak etanol batang Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*). Untuk mengetahui apakah terdapat keragaman antar perlakuan dilakukan uji hipotesis komparatif. Metode yang dapat digunakan, yaitu uji parametrik *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* dengan alternatifnya yaitu uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*.