

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Pada penelitian ini digunakan rancangan penelitian eksperimental dengan *post-test only control group design* dan dilakukan secara *in vitro*. Uji kepekaan antimikroba yang dipakai adalah dengan metode dilusi tabung. Metode dilusi tabung dengan menggunakan ekstrak daun kenanga (*Cananga odorata*) meliputi 2 tahap, yaitu tahap pengujian bahan di media cair dengan tujuan untuk mencari Kadar Hambat Minimal (KHM), kemudian dilanjutkan penggoresan pada media NAP yang ditunjukkan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari ekstrak daun kenanga tersebut terhadap bakteri *Vibrio cholerae*. Penentuan KHM juga dilakukan dengan menggunakan difusi cakram. Pada penelitian ini dibuat 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan yaitu kelompok bakteri yang diberi konsentrasi bunga kenanga dengan 7 konsentrasi yaitu 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% dan 26% yang merupakan uji pendahuluan.

4.2 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini pengulangan (n) pada tiap-tiap perlakuan dihitung berdasarkan rumus (Lukito, 1998):

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

n : Jumlah pengulangan

p : Jumlah perlakuan

Jadi, pada penelitian ini akan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini ada dua, yaitu variabel tergantung dan variabel bebas.

4.3.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae*.

4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah ekstrak daun kenanga dengan berbagai konsentrasi. Konsentrasi tersebut ditentukan berdasarkan uji pendahuluan.

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

4.4.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan antara bulan Juni-Juli 2013

4.4.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sedangkan pembuatan ekstrak daun kenanga di Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.

4.5 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari alat dan bahan.

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Suspensi Bakteri

1. Alat
 - a. Tabung reaksi steril
 - b. Ose
 - c. Lampu spiritus atau Bunsen
 - d. Korek api
 - e. Inkubator
 - f. Spektrofotometri
 - g. vortex
2. Bahan
 - a. *Vibrio cholerae* hasil kultur dari media NAP
 - b. Medium cair *Nutrient broth*

4.5.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

1. Alat
 - a. *Object glass* dan kaca penutup
 - b. Lampu spiritus atau Bunsen
 - c. Ose
 - d. Mikroskop
 - e. Minyak emersi
 - f. Korek api
 - g. Kertas saring
2. Bahan
 - a. Suspensi bakteri dari *Nutrient broth*
 - b. Bahan pewarnaan Gram : kristal violet, lugol, alkohol 95%, safranin
 - c. Aquades steril
 - d. Kertas penghisap atau tissue
 - e. Oksidase *reagent* (1% tetramethyl-p-phenylenediamine)
 - f. Medium agar *TCBS*
 - g. Kit untuk identifikasi biokimia dengan sistem *microbact*

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun kenanga

1. Alat
 - a. Pisau, mortar, dan pestle
 - b. Neraca analitik
 - c. Kertas saring
 - d. oven
 - e. Seperangkat ekstraktor soxhlet (kondensor, pipa/selang air, pipa vakum, tabung *soxhlet*/tabung penampung sampel/selongsong, sifon, labu penampung ekstraksi, *water bath*, dan pemanas air/*plate* pemanas)
2. Bahan
 - a. Daun kenanga yang telah dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk/bubuk dan ditimbang seberat 50 gram.
 - b. Pelarut etanol 95%
 - c. Aquades steril

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Dilusi Tabung

1. Alat
 - a. Tabung reaksi steril 7 buah
 - b. Pipet steril ukuran 1 mL
 - c. Inkubator
 - d. Vortex
 - e. Bunsen
 - f. Korek api
 - g. Plate NAP
 - h. *Colony counter*
2. Bahan
 - a. Ekstrak daun kenanga
 - b. Suspensi bakteri dari *Nutrient broth*

4.6 Definisi Operasional

1. Sediaan ekstrak daun kenanga adalah daun kenanga yang berwarna hijau segar yang diekstrak dengan metode ekstraksi Soxhlet menggunakan pelarut etanol 95%, dengan konsentrasi awal adalah 100% daun kenanga.
2. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae*. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu membunuh bakteri *Vibrio cholerae*.
3. Bakteri *Vibrio cholerae* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Jumlah koloni adalah jumlah koloni *Vibrio cholerae* yang tumbuh pada media NAP setelah dilakukan inkubasi pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 18-24jam.
5. *Original Inoculum* (OI) adalah inokulum bakteri *Vibrio cholerae* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi dan digunakan untuk mencari kategori KBM.
6. Kontrol positif adalah bakteri tanpa larutan ekstrak daun kenanga (konsentrasi ekstrak 0 mg/ml) yang dapat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain. Kontrol positif berasal dari larutan bakteri uji yang telah distandarisasi dengan standar *Mc Farland* 0,5 sebanyak 2 ml.
7. Kontrol negatif adalah bahan berupa larutan ekstrak daun kenanga untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril atau tidak. Kontrol negatif dibuat dengan cara mencampurkan antara ekstrak daun kenanga sebanyak 1 ml dengan aquades sebanyak 1ml.

8. Standar kepadatan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 10^3 CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kenanga

4.7.1.1 Proses Ekstraksi Soxhlet

- a. Daun kenanga 250 gram dicuci lalu dikeringkan
- b. Dihaluskan menggunakan pisau, mortar dan pestle
- c. Daun kenanga yang telah halus dibungkus dengan menggunakan kertas saring
- d. Dimasukkan ke dalam tabung ekstraktor *soxhlet*
- e. Ditambahkan pelarut etanol 95% dari bagian atas sampai tumpah ke dalam labu
- f. Ditambahkan pelarut lagi hingga setengahnya
- g. Dipanaskan labu yang telah berisi pelarut pada suhu medium ($78,5^{\circ}\text{C}$) sampai mendidih.
- h. Diamati proses terjadinya sirkulasi kontinyu pelarut etanol, hingga semua ekstrak dianggap telah terekstraksi.

4.7.1.2 Proses Evaporasi dengan *rotary evaporator vacum*

- a. Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan $30-40^{\circ}$ terhadap meja
- b. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu ekstraksi
- c. Satu set alas evaporasi diletakkan sedemikian rupa sehingga sebagian labu ekstraksi terendam aquades pada water bath

- d. Water bath dihubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhunya sampai 78,5°C (sesuai dengan titik didih etanol).
- e. Ditunggu proses pengembunan dan pemisahan di pendingin sampai hasil evaporasi tersisa dalam labu ekstraksi
- f. Hasil evaporasi berupa cairan kental. Dalam penelitian ini hasil evaporasi dianggap konsentrasi 100%.

4.7.2 Identifikasi *Vibrio cholerae*

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan Gram :

1. Membuat sediaan apusan kuman pada gelas objek
2. Sediaan dituangi dengan Kristal Violet selama 1 menit. Sisa Kristal Violet dibuang dan sediaan dibilas dengan air. Kristal Violet di sini berfungsi sebagai warna dasar.
3. Sediaan dituangi dengan Lugol selama 1 menit. Sisa Lugol dibuang dan sediaan dibilas dengan air.
4. Sediaan dituangi dengan Alkohol 95% selama 50-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa Alkohol dibuang dan sediaan dibilas dengan air.
5. Sediaan dituangi dengan Safranin selama 0,5 menit. Sisa Safranin dibuang dan sediaan dibilas dengan air. Adapun Safranin di sini berfungsi sebagai bahan warna pembanding.
6. Sediaan dikeringkan menggunakan kertas penghisap.
7. Sediaan ditetesi dengan minyak emersi.
8. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x.

4.7.2.2 Tes oksidase

1. Teteskan 2-3 tetes oksidase *reagent* (1% tetramethyl-p-phenylenediamine) pada kertas filter
2. Dengan menggunakan ose lakukan smear bakteri pada kertas filter yang telah ditetesi oksidase *reagent*
3. Hasilnya positif apabila smear bakteri tadi berubah warna menjadi ungu gelap dalam waktu 10 detik.

4.7.2.3 Agar TCBS (*Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose*)

Agar *TCBS* merupakan medium diferensial untuk bakteri yang meragikan dan tidak meragikan sukrosa.

Prosedurnya:

- Dilakukan inokulasi bakteri *V. cholerae* dengan metode penggoresan pada medium *TCBS* agar.
- Diinkubasi pada inkubator dengan suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 18 - 24 jam dan diamati hasilnya.
- Pengamatan mikroskopis dikatakan hasil positif jika pada pengamatan pada media agar, ditemukan morfologi koloni bakteri *V. cholerae* yang berbentuk batang bengkok seperti koma dengan panjang sekitar 2-4 μm , serta khas pada medium didapatkan koloni berwarna kuning (*sucrose fermenter*).

4.7.2.4 Sistem *Microbact*

Sistem *microbact* biasanya digunakan untuk mengidentifikasi *Enterobacteriaceae* dan bakteri batang gram-negatif lainnya. *Microbact* memiliki 2 *strip* yang diberi label 12A dan 12B. Dimana *strip* 12A digunakan untuk mengidentifikasi oksidase-negatif, nitrat-positif glukosa fermenter. *Strip* ini

mengandung data untuk 14 genus dan 34 spesies dari *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., atau *Serratia* spp.. Sedangkan strip 12B digunakan untuk mengidentifikasi oksidase-positif, nitrat-negatif glukosa non fermenter. *V. cholerae* merupakan salah satu bakteri oksidase-positif, jadi pada penelitian ini digunakan strip 12B.

Langkah-langkah yang dilakukan untuk tes biokimiawi ini dengan menggunakan sistem *microbact* yaitu:

- Hal pertama yang dilakukan adalah tes oksidase. Jika tes oksidase positif maka organisme tersebut diidentifikasi hanya menggunakan *microbact* strip 12B
- Selanjutnya adalah tes biokimiawi dengan *microbact* strip 12B. Bakteri 1 ose diambil dari TCBS agar dan dicampurkan dengan NaCl 0,9 % kemudian divorteks. Turbiditas yang digunakan adalah 10^8 CFU/ml.
- Dari suspensi bakteri yang telah dibuat diteteskan 10 μ l ke dalam tiap sumuran yang telah mengandung substrat tertentu.

Sumuran tersebut diinkubasi dalam suhu $\pm 37^\circ\text{C}$ selama 18-24 jam, kemudian dilakukan pembacaan dengan menggunakan program tertentu di komputer.

4.7.2.5 Pembuatan Suspensi Bakteri (10^6 CFU/ml)

1. Dengan menggunakan ose diambil koloni *Vibrio cholerae* dari media NAP.
2. Dimasukkan ke tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth* kemudian diinkubasikan dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. Melakukan pemeriksaan spektrofotometri pada hasil kultur medium cair *Nutrient Broth* dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui nilai absorbansi dari suspensi.

4. 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:

N_1 = nilai absorbansi suspensi hasil spektrofotometri (10³ CFU/ml)

V_1 = volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_2 = OD (0,1 = setara dengan 10⁸ CFU/ml)

V_2 = volume suspensi bakteri uji (10 ml)

Sehingga diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer NaCl

Untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10⁸ CFU/ml.

5. Membuat sediaan 10 ml bakteri *Vibrio cholerae* konsentrasi 10⁷ CFU/ml dengan cara mengambil 1 ml larutan dari konsentrasi bakteri 10⁸ CFU/ml kemudian dimasukkan dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl dan divortex hingga homogen. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi 10⁷ CFU/ml.
6. Membuat sediaan 10 ml bakteri *Vibrio cholerae* konsentrasi 10⁶ CFU/ml dengan mengambil 1 ml larutan dari konsentrasi kuman 10⁷ CFU/ml kemudian dimasukkan dalam tabung yang telah diisi 9 ml *Nutrient Broth* dan divortex hingga homogen. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi 10⁶ CFU/ml. Bakteri siap digunakan untuk penelitian.

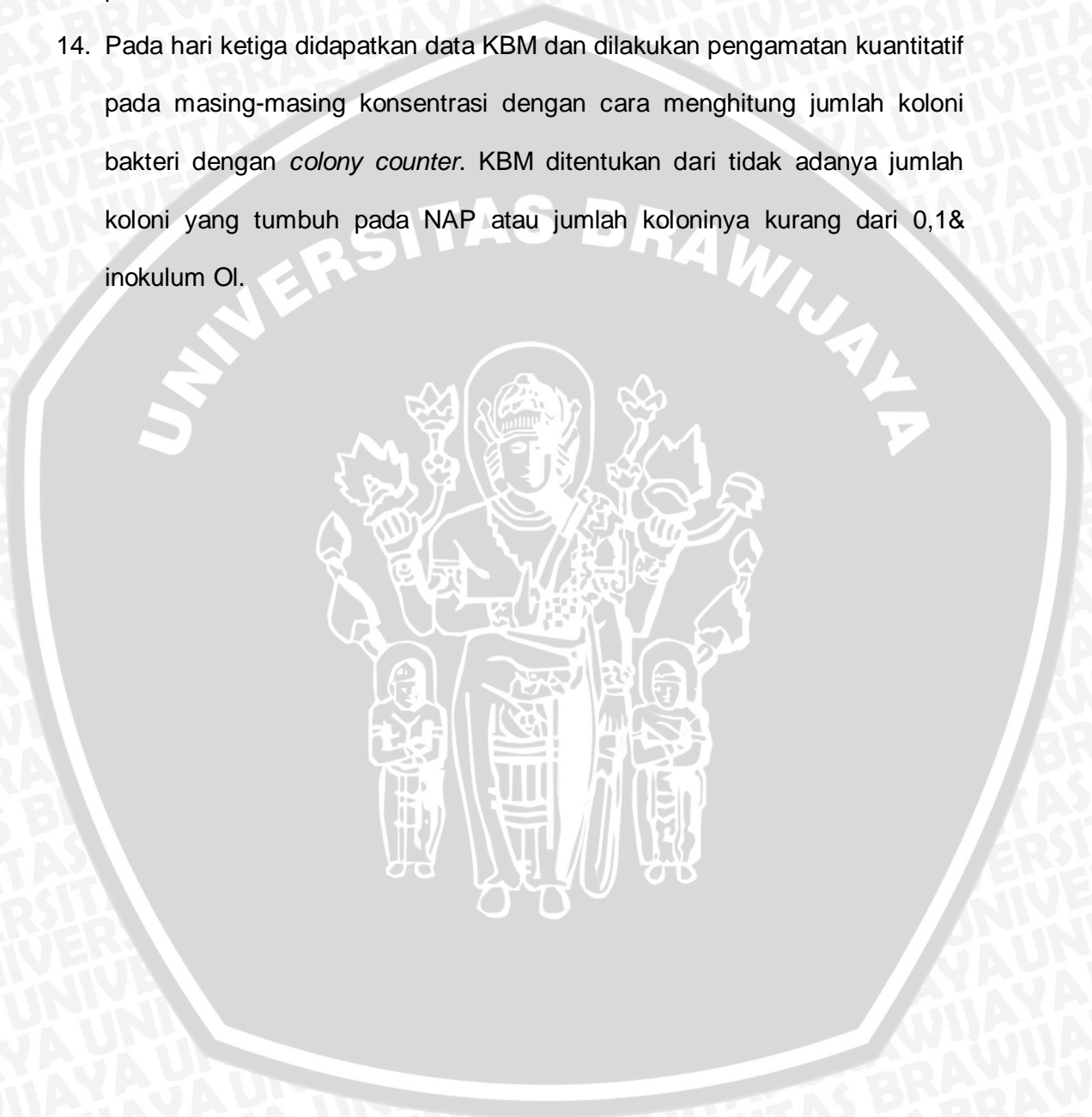
4.7.3 Pengujian Efek Antimikroba

Rangkaian uji aktivitas antimikroba ekstrak daun kenanga adalah sebagai berikut:

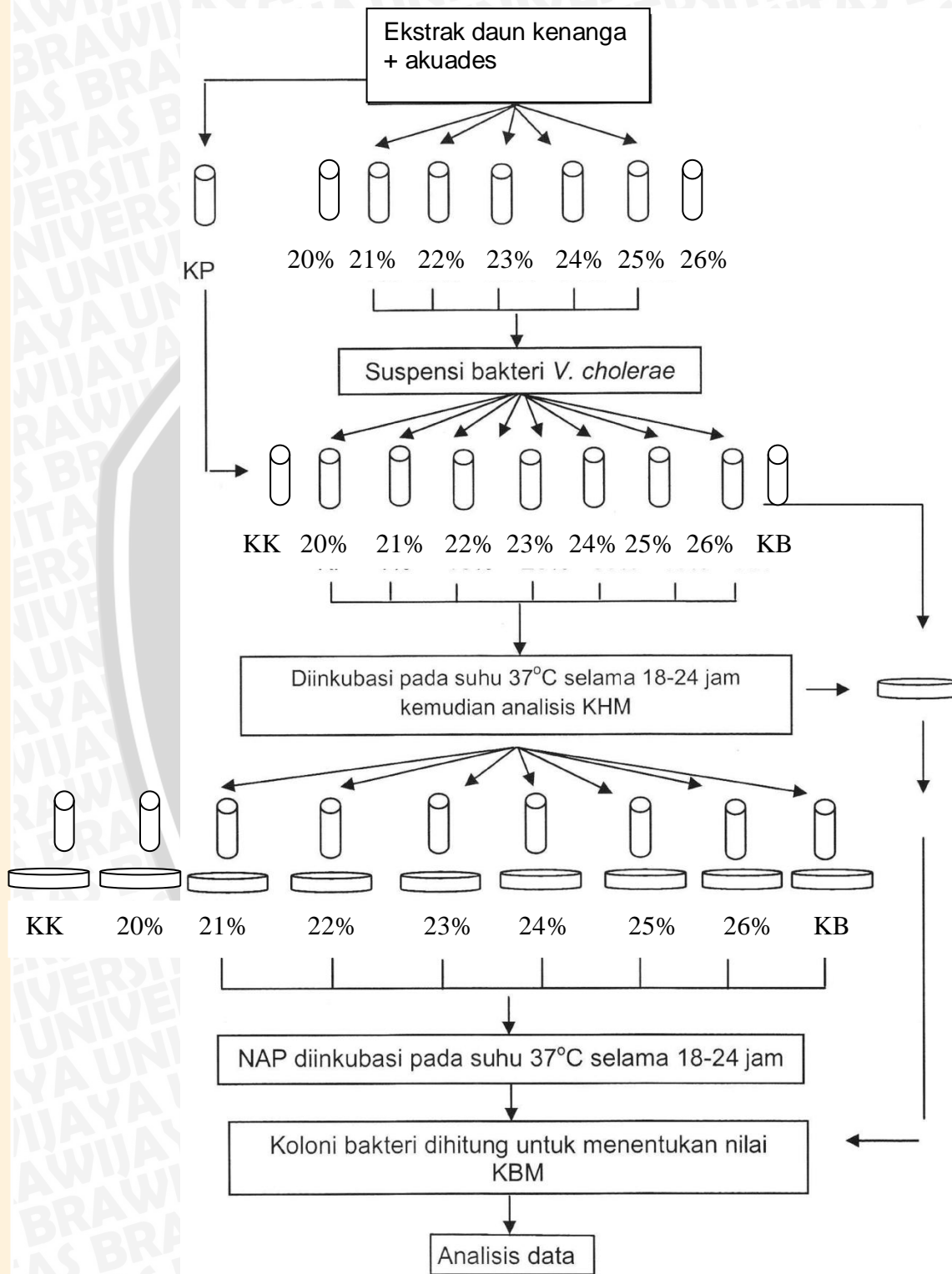
1. Sediakan 7 tabung steril, 5 tabung sebagai uji antimikroba, 1 tabung sebagai kontrol kuman (KK), dan 1 tabung sebagai kontrol bahan (KB).

2. Masukkan 0,8 mL aquades steril ke dalam tabung 1 lalu tambahkan 0,2 mL ekstrak daun kenanga (20%).
3. Masukkan 0,79 mL aquades steril ke dalam tabung 2 lalu tambahkan 0,21 mL ekstrak daun kenanga (21%).
4. Masukkan 0,78 mL aquades steril ke dalam tabung 3 lalu tambahkan 0,22 mL ekstrak daun kenanga (22%).
5. Masukkan 0,77 mL aquades steril ke dalam tabung 4 lalu tambahkan 0,23 mL ekstrak daun kenanga (23%).
6. Masukkan 0,76 mL aquades steril ke dalam tabung 5 lalu tambahkan 0,24 mL ekstrak daun kenanga (24%).
7. Masukkan 0,75 mL aquades steril ke dalam tabung 6 lalu tambahkan 0,25 mL ekstrak daun kenanga (25%).
8. Masukkan 0,74 mL aquades steril ke dalam tabung 7 lalu tambahkan 0,26 mL ekstrak daun kenanga (26%).
9. Masukkan 1 mL ekstrak daun kenanga saja ke dalam tabung KB (100%) dan masukkan 1 mL suspensi bakteri saja ke dalam tabung KK (0%).
10. Masukkan 1 mL suspensi bakteri *Vibrio cholerae* dengan konsentrasi bakteri 10⁶ CFU/mL ke dalam tabung 1-5.
11. Ambil bakteri dari tabung bertanda KK 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 1-5 dengan tabung KB.

13. Kemudian dari masing-masing tabung 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.



4.8 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

4.9 Analisa Data Statistik

Analisis data statistik yang digunakan adalah uji statistik one way Anova dan uji statistik *Korelasi-Regresi*. Uji statistik one way Anova digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun kenanga (*Cananga odorata*) terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae*. Sedangkan uji *Korelasi-Regresi* digunakan untuk menentukan sebagian besar pengaruh serta arah hubungan antara konsentrasi ekstrak daun kenanga terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae in vitro*. Dalam penelitian ini, analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Sotution*) for Window versi 18.0 dengan besar interval kepercayaan yang dipakai adalah 95% ($\alpha = 0,05$). Hipotesis ditentukan melalui H_0 diterima bila nilai signifikansi yang muncul $p > 0,05$, sedangkan H_0 ditolak bila nilai signifikansi yang muncul $p < 0,05$. H_0 dari penelitian ini adalah apabila tidak terdapat perbedaan efek antimikroba pada pemberian ekstrak daun kenanga pada masing-masing perlakuan terhadap jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang terdapat pada medium NAP.

Langkah-langkah dalam uji statistik dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: (a) Memeriksa syarat uji *one way Anova* untuk >2 kelompok yaitu sebaran data harus normal dan varian data harus homogen. (b) Melakukan analisis uji *one way Anova* untuk mengetahui perbedaan jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* pada masing-masing perlakuan. Apabila 2 point syarat pada (a) tidak dapat dipenuhi maka alternatif uji statistik non-parametrik yang dapat digunakan adalah uji statistik non-parametrik *Kruskal Wallis*. (c) Kemudian dilakukan uji *Post Hoc Test (Tukey test)* untuk mengetahui perlakuan mana saja yang menyebabkan jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* menunjukkan

perbedaan yang bermakna dan tidak bermakna. Alternatif dari uji ini untuk *Post Hoc* non-parametrik adalah Uji *Mann-Whitney*. (d) Selanjutnya dilakukan Uji Korelasi untuk mengetahui keeratan hubungan pemberian ekstrak daun kenanga terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae*, dengan uji alternatif non-parametrik Uji Korelasi Spearman serta Uji Regresi untuk menentukan persamaan regresi. Suatu persamaan dikatakan layak digunakan bila nilai p pada uji Anova $< 0,05$.

