

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian eksperimental dengan *post-test control design* dan dilakukan secara *in vitro*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antibiotik ekstrak etanol tanaman putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap bakteri *S. Typhi*. Uji kepekaan antibiotik yang dipakai adalah uji kepekaan antibiotik dengan metode dilusi tabung dan cakram difusi. Metode dilusi tabung dengan menggunakan ekstrak putri malu ini meliputi 2 tahap, yaitu tahap pengujian bahan di media cair kemudian dilanjutkan dengan tahap penggoresan pada media NAP yang ditujukan untuk menentukan KBM dari ekstrak putri malu tersebut terhadap bakteri *S. Typhi*. Untuk mengetahui KHM menggunakan metode cakram difusi.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

4.2.1 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan antara bulan September – November 2013.

4.2.2 Tempat Penelitian

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

4.3 Sampel dan Besar Sampel

Sampel yang digunakan di dalam penelitian ini adalah ekstrak tanaman putri malu dan menggunakan bakteri uji yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pada penelitian ini, digunakan 5 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda, serta 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus estimasi pengulangan sbb (Notobroto, 2005)

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan (terdiri dari lima macam perlakuan, atau konsentrasi ekstrak tanaman putri malu)

n = banyaknya pengulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka banyaknya pengulangan dari sampel bakteri *S. Typhi* yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 4 kali.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Dependen

Tingkat pertumbuhan bakteri *S. Typhi* (KHM dan KBM).

4.4.2 Variabel Independen

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak putri malu terdiri dari 5 konsentrasi, yaitu 5%, 7%, 9%, 11%, 13% berdasarkan eksplorasi terdahulu.

4.5 Definisi Operasional

Di dalam penelitian ini ada beberapa hal yang perlu diketahui yaitu :

1. Akar, batang dan daun putri malu yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman putri malu didapat di Balai Materia Medika Kabupaten Batu
2. Ekstrak etanol tanaman putri malu adalah tanaman putri malu dalam bentuk serbuk kemudian dilakukan proses ekstraksi (pengambilan zat-zat aktif suatu bahan) menggunakan bahan pelarut etanol 96% dengan cara maserasi dan evaporasi (pemisahan zat-zat aktif dengan pelarutnya) sehingga menjadi ekstrak cair.
3. *S. Typhi* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari bakteri yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
4. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak tanaman putri malu yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. Typhi*. Aktivitas penghambatan ditandai dengan terbentuknya daerah jernih atau zona hambat disekitar kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak etanol tanaman putri malu kemudian di tanam *agar plate* berisi *S. Typhi* dan diinkubasi selama 18-24 jam.
5. KBM (Kadar Bunuh Minimal) atau *MBC (Minimal Bactericidal Concentration)* adalah konsentrasi terendah dari ekstrak tanaman putri malu yang dapat membunuh kuman ditandai dengan tidak tumbuhnya kuman pada medium NAP.

6. Kontrol negatif adalah ekstrak etanol tanaman putri malu murni yang tidak dicampur dengan bakteri *S. Typhi* yang digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril di mana nilai kontrol positif adalah 0 (tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri jenis apapun).
7. Kontrol positif adalah biakan *S. Typhi* murni yang tidak dicampur dengan ekstrak etanol tanaman putri malu yang dapat digunakan sebagai standar jumlah pertumbuhan bakteri tanpa ekstrak tanaman putri malu.
8. *Original inoculum/OI* adalah inokulasi bakteri pada medium Nutrient Agar Plate (NAP) dengan cara streaking untuk mencari kategori Kadar Bunuh Minimum (KBM).
9. CFU (*Colony Forming Unit*) adalah banyaknya koloni bakteri yang tumbuh. Satuan yang digunakan untuk menentukan jumlah sel-sel bakteri yang terdapat dalam sampel per mL (CFU/mL).

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Uji Identifikasi Bakteri

Dalam mengidentifikasi bakteri yang akan digunakan, dilakukan dua proses, yaitu proses pewarnaan Gram dan proses penanaman pada medium B.S.A (*Bismuth Sulfite Agar*). Alat yang diperlukan untuk proses pewarnaan Gram, antara lain mikroskop, kertas penghisap, lampu spiritus, gelas objek dan gelas penutup. Sedangkan bahan yang diperlukan adalah isolat *S. Typhi* pewarna gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin) dan minyak emersi.

Alat yang digunakan untuk proses penanaman pada medium B.S.A adalah ose lurus. Sedangkan bahan yang digunakan dalam proses ini adalah *Nutrient Broth* dan medium B.S.A

4.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Putri Malu

Alat dan bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak putri malu antara lain: blender untuk menghaluskan putri malu, kertas saring untuk membungkus serbuk putri malu, 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, tanaman putri malu, etanol 96%, dan aquades.

4.6.3 Uji Kepekaan Ekstrak Etanol Putri Malu

Alat dan Bahan yang digunakan antara lain; tabung reaksi steril, ose, mikropipet, inkubator, lampu spiritus, label, vortex, perbenihan cair bakteri *S.Typhi*, ekstrak putri malu, nutrient Broth, medium NAP dan aquades.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini berupa ekstrak etanol tanaman putri malu yang dibuat dengan cara sebagai berikut:

1. Proses pengeringan
 - Mencuci bersih tanaman putri malu yang akan dikeringkan
 - Lalu keringkan

2. Proses ekstraksi

- Setelah kering, menghaluskan dengan blender sampai halus
- Menimbang sebanyak 100 gram (serbuk tanaman putri malu)
- Memasukkan 100 gram tanaman putri malu kering ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter
- Kemudian merendam dengan etanol sampai volume 900 ml
- Mengocok tanaman putri malu kering dan etanol sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit)
- Mendinginkan hasil kocokan semalam sampai mengendap

3. Proses evaporasi

- Mengambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terpisah hasil dari ekstraksi
- Memasukkan dalam labu evaporasi pada evaporator
- Mengisi *water bath* dengan air sampai penuh
- Memasang semua rangkaian alat termasuk pendingin spiral, pemanas *water bath* (atur sampai suhu 90° C), kemudian menyambungkan dengan aliran listrik
- Membiarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu
- Menuunggu sampai larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu)
- Memasukkan hasil ekstraksi dalam botol plastic
- Menyimpan dalam lemari pendingin (*freezer*)

4.7.2 Preparasi Bakteri

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan Gram:

1. Membersihkan objek glass dengan kapas, lalu dilewatkan di atas api. Dinginkan.
2. Membuat sediaan apusan kuman pada gelas obyek. Kemudian difiksasi di atas lampu Bunsen.
3. Menuangi sediaan dengan Kristal Violet selama 1 menit, kemudian membuang sisa Kristal Violet dan membilas dengan air.
4. Menuangi sediaan dengan Lugol selama 1 menit, kemudian membuang sisa Lugol dan membilas dengan air.
5. Menuangi sediaan dengan Alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur, kemudian membuang sisa Alkohol dan membilas dengan air.
6. Menuangi sediaan dengan Safranin selama 30 detik, kemudian membuang sisa Safranin dan membilas dengan air.
7. Mengeringkan sediaan dengan menggunakan kertas penghisap. Dan selanjutnya dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x dengan bantuan minyak emersi. Hasil yang tampak bakteri *S. Typhi* berbentuk batang dan berwarna merah.

4.7.2.2 Penanaman Bakteri pada Medium B.S.A

1. Menyiapkan medium B.S.A sehari sebelum digunakan dan menyimpannya di tempat yang gelap pada suhu ruangan
2. Mengambil bakteri dari perbenihan cair sebanyak 1 ose

3. Menggoreskan bakteri tersebut pada medium B.S.A
4. Menginkubasikan biakan bakteri dalam medium B.S.A tersebut selama 18-24 jam dengan suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
5. Mengamati pertumbuhan bakteri yang menunjukkan koloni khas berwarna hitam (*black jet colony*).

4.7.2.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

1. Mengambil koloni *S. Typhi* dengan karakteristik sama dari media *Nutrient Agar Plate* dengan menggunakan ose.
2. Memasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth*, kemudian lakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625nm, untuk mengetahui *optical density (OD)* dari suspensi tersebut.
3. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar $10^8/\text{mL}$ yang setara dengan *OD (Optical Density) = 0,1*, lakukan penghitungan 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 (10 ml)
N2 = OD (0,1=setara dengan $10^8/\text{ml}$)

4. Dari perhitungan tersebut diperoleh volume (dalam ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi $10^8/\text{ml}$ sebanyak 10 ml. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi

10^8 /ml sebanyak 10 ml, selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan NaCl dan *nutrient broth* sehingga diperoleh suspensi bakteri sebanyak 10 ml dengan konsentrasi bakteri 10^6 /ml. Kini suspensi bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

4.7.3 Pengujian Efek Antimikroba

Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa ekstrak etanol putri malu merupakan ekstrak yang keruh sehingga penentuan KHM secara kualitatif tidak dapat ditentukan dengan membandingkan tingkat kekeruhan pada uji dilusi tabung Akibatnya pada rangkaian uji aktivitas antibiotik ekstrak putri malu terdapat dua metode, yaitu uji difusi disk untuk menentukan KHM dan uji dilusi tabung untuk menentukan KBM

Uji Dilusi Tabung

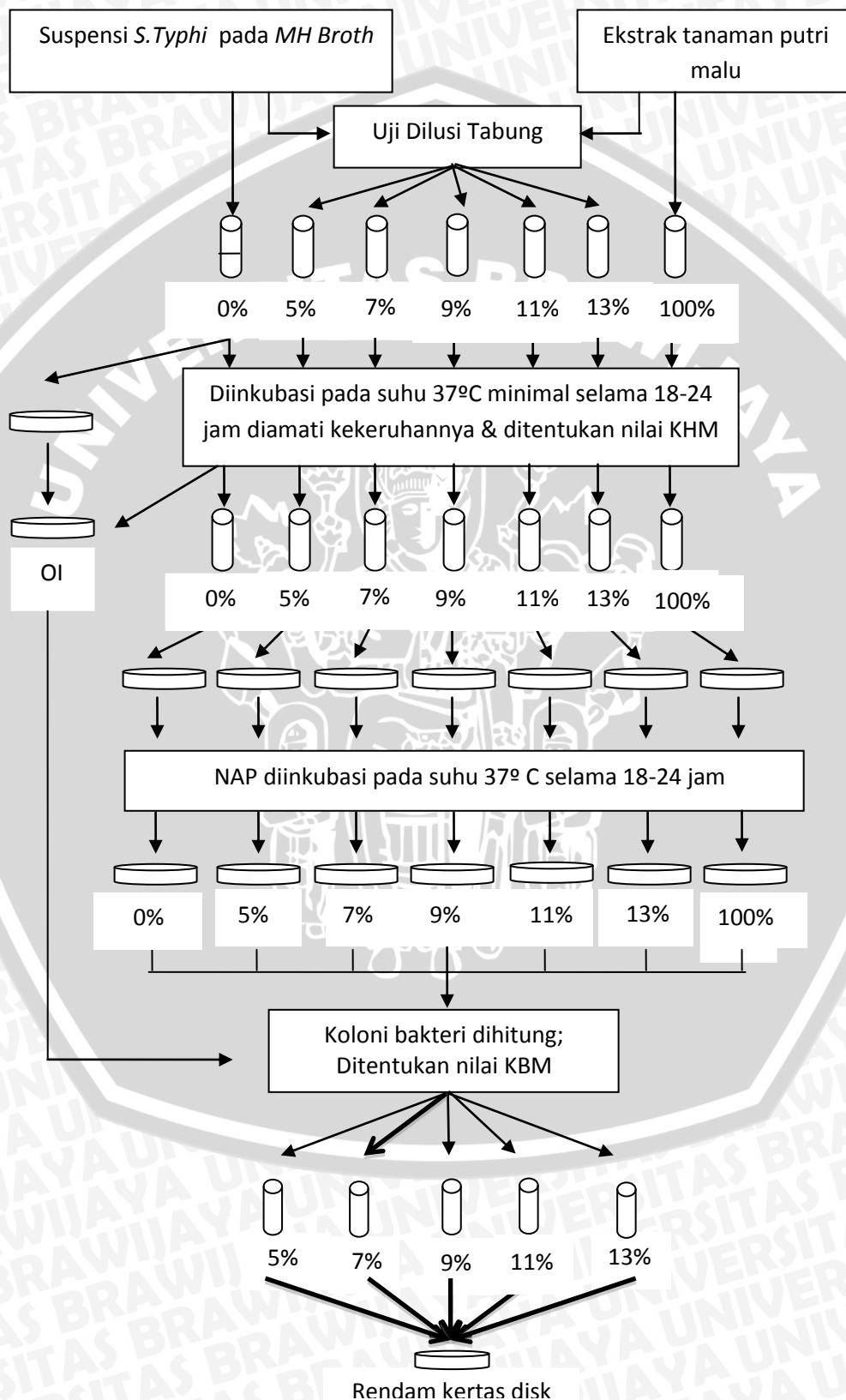
1. Menyediakan 7 tabung steril, 5 tabung sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol positif (KP), dan 1 tabung sebagai kontrol negatif (KN).
2. Menyediakan pula aquades dan larutan bakteri uji (*S. Typhi*).
3. Membuat larutan ekstrak etanol tanaman putri malu dengan kadar tertentu.
4. Memasukan aquades dan ekstrak tanaman putri malu (berdasarkan kadar yang sudah ditentukan diatas) dengan volume tertentu sehingga diperoleh 5 konsentrasi ekstrak tanaman putri malu yang berbeda-beda.
5. Menambahkan perbenihan cair kuman ke dalam masing-masing tabung ekstrak tanaman putri malu kemudian mencampur menggunakan vortex.
6. Semua tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

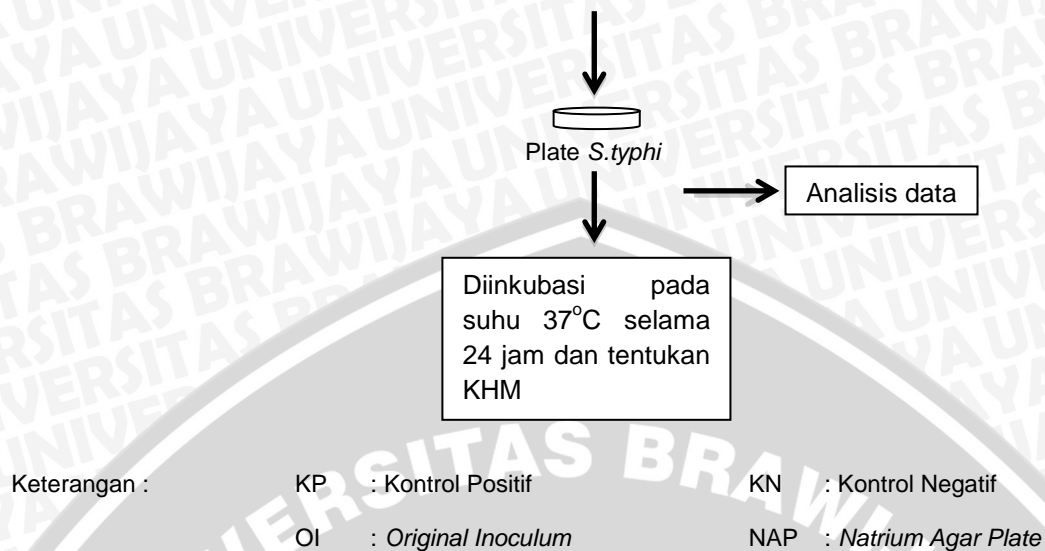
7. Memperhatikan dan mencatat pada tabung nomor berapa tampak mulai terjadi kekeruhan. Kadar terendah pada tabung yang menunjukkan tidak ada kekeruhan merupakan KHM.
8. Untuk memperoleh data KBM, dilakukan penanaman isi tabung yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan (kekeruhan) sebanyak 0,1 ml (satu mata ose) pada medium NAP. Kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam kemudian dilihat ada tidaknya pertumbuhan koloni kuman.

Uji Difusi Disk

1. Ekstrak putri malu disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit agar larutan ekstrak menjadi homogen dan tidak mengendap. Untuk perlakuan yang diambil adalah larutannya.
2. Menyediakan 6 cawan petri steril yang telah diberi kertas disk steril.
3. Merendam kertas disk dalam larutan ekstrak selama 10 menit atau sampai larutan menjadi jenuh.
4. Menyediakan plate yang berisi biakkan *S. Typhi* pada media NAP dan telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
5. Memindahkan kertas disk dalam cawan petri steril sesuai variabel konsentrasi masing-masing kemudian inkubasi selama 18 jam dengan suhu 37°C.
6. Pada hari kedua didapatkan data KHM dan dilakukan pengamatan kualitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung diameter daya hambat yang dihasilkan masing-masing variabel menggunakan mistar.

4.8 Kerangka Operasional Penelitian





Gambar 4.1 Skema Alur Uji Antibiotik Ekstrak Tanaman Putri Malu terhadap *S. Typhi*

4.9 Analisa Data

Analisis data menggunakan uji *non parametric*, dengan besar kepercayaan 0,95 untuk tingkat signifikansi (α) = 0,05. Analisis yang digunakan adalah uji statistik Kruskall Wallis untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak etanol putri malu terhadap *S. Typhi* sehingga dapat disimpulkan apakah ekstrak etanol putri malu mempunyai pengaruh antibiotik yang signifikan terhadap *S. Typhi*, uji Mann Whitney yang digunakan untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian ekstrak etanol putri malu sebagai antibiotik terhadap bakteri *S. Typhi* pada setiap konsentrasi yang diberikan, dan uji korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian perlakuan terutama yang disebabkan oleh pemberian ekstrak etanol putri malu dengan pertumbuhan koloni bakteri *S. Typhi*.