

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian eksperimental laboratorium dengan *post-test control design* dan dilakukan secara *in vitro*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak etanol daun dan sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Uji kepekaan antimikroba yang dipakai adalah uji kepekaan antimikroba dengan metode dilusi tabung. Metode dilusi tabung dengan menggunakan ekstrak etanol daun sambiloto ini meliputi 2 tahap, yaitu tahap pengujian bahan di media cair dengan tujuan untuk mencari Kadar Hambat Minimal (KHM), kemudian dilanjutkan dengan tahap penggoresan pada media NAP yang ditujukan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari ekstrak etanol daun sambiloto tersebut terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

4.2.1 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan antara bulan April – 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 bakteri *K. pneumoniae* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sampel diperoleh dari specimen urin salah satu pasien yang terinfeksi *K. pneumoniae* di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang. Banyaknya pengulangan yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$P(n-1) \geq 15 \quad (\text{Solimun, 2001})$$

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan (terdiri dari lima macam perlakuan, atau konsentrasi ekstrak daun sambiloto)

n = banyaknya pengulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka banyaknya pengulangan jumlah dari sampel bakteri *K. pneumoniae* yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Dependen

Jumlah koloni bakteri *Klebsiella Pneumoniae* yang tumbuh pada medium NAP.

4.4.2 Variabel Independen

Ekstrak etanol daun sambiloto yang dibuat dalam konsentrasi tertentu.

4.5 Definisi Operasional

1. Daun Sambiloto yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sambiloto yang didapat di Balai Materia Medika Kota Batu
2. Ekstrak etanol daun sambiloto adalah daun sambiloto dalam bentuk serbuk kemudian dijadikan ekstrak cair dengan menggunakan bahan pengekstrak etanol 96%.
3. *Klebsiella pneumoniae* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *Klebsiella pneumoniae* berasal dari spesimen urin salah satu pasien yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae* di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang.
4. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu menghambat pertumbuhan kuman.
5. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu membunuh kuman.
6. Kontrol negatif adalah ekstrak etanol daun sambiloto murni yang tidak dicampur dengan bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril di mana nilai

kontrol negatif adalah 0 (tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri jenis apa pun).

7. Kontrol positif adalah biakan *Klebsiella pneumoniae* murni yang tidak dicampur dengan ekstrak etanol daun sambiloto yang dapat digunakan sebagai standar jumlah pertumbuhan bakteri tanpa ekstrak etanol daun sambiloto.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri yang akan digunakan, dilakukan dua proses, yaitu proses pewarnaan Gram dan Microbact 12A. 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 *Klebsiella pneumoniae* pewarna gram (kristal violet, lugol, alcohol 96%, dan safranin) dan minyak emersi.

Alat yang digunakan untuk identifikasi bakteri menggunakan Microbact 12A adalah ose dan tabung reaksi. Sedangkan bahan yang digunakan dalam identifikasi ini adalah reagent, garam fisiologis, dan sumur microbact.

4.6.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sambiloto

Proses dalam pembuatan ekstrak etanol daun sambiloto, terdapat tiga macam proses, yaitu proses pengeringan, proses ekstraksi, dan proses evaporasi. Alat yang digunakan dalam proses pengeringan penelitian ini, adalah oven dan alat pengering untuk mengeringkan bahan penelitian setelah dicuci.

Alat yang digunakan dalam proses ekstraksi bahan penelitian antara lain, blender untuk menghaluskan daun sambiloto, kertas saring untuk membungkus serbuk daun sambiloto, gelas ekstraksi, dan neraca analitik.

Alat yang digunakan dalam proses evaporasi 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, dan cawan penguap.

Sedangkan, bahan yang digunakan dalam ketiga proses diatas, proses pengeringan, ekstraksi, dan evaporasi, antara lain, daun sambiloto, etanol 96%, dan aquades.

4.6.3 Alat dan Bahan Uji Kepekaan Ekstrak Etanol Daun Sambiloto

Dalam melakukan uji kepekaan ekstrak etanol daun sambiloto, alat-alat yang digunakan antara lain, tabung reaksi steril, ose, mikropipet 1ml, inkubator, lampu spiritus, label, dan vortex. Sedangkan bahan yang digunakan dalam prosedur kali ini antara lain, perbenihan cair bakteri *Klebsiella pneumoniae*, ekstrak etanol daun sambiloto, *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 daun sambiloto. Proses pembuatan ekstraksi etanol daun sambiloto dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Serbuk daun sambiloto ditimbang sebanyak 100 gram lalu dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer berukuran 1 liter. Kemudian serbuk daun sambiloto tersebut direndam dengan larutan etanol sampai volume 900 ml dan diaduk selama ± 30 menit dengan mesin pengaduk (*stirer*), lalu didiamkan selama satu hari atau 24 jam hingga mengendap.

Campuran tersebut kemudian disaring menggunakan corong *Buchner* dan hasil yang diperoleh (yang mengandung bahan aktif) dicampur dan diuapkan menggunakan *rotatory evaporator* yang dibantu dengan pompa vakum untuk menghilangkan sisa pelarut. Selanjutnya hasil akhir ekstraksi dimasukkan ke dalam botol plastik dan disimpan di dalam lemari pendingin (*freezer*). Hasil ekstraksi yang dihasilkan dari 200 gram serbuk kering daun sambiloto adalah berbentuk semi padat menyerupai pasta sebanyak 50ml.

4.7.2 Preparasi Bakteri

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan Gram:

1. Membuat sediaan apusan kuman pada gelas obyek.
2. Menuangi sediaan dengan Kristal Violet selama 1 menit, kemudian membuang sisa Kristal Violet dan membilas dengan air.
3. Menuangi sediaan dengan Lugol selama 1 menit, kemudian membuang sisa Lugol dan membilas dengan air.

4. Menuangi sediaan dengan Alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur, kemudian membuang sisa Alkohol dan membilas dengan air.
5. Menuangi sediaan dengan Safranin selama 30 detik, kemudian membuang sisa Safranin dan membilas dengan air.
6. Mengeringkan sediaan dengan menggunakan kertas penghisap. Dan selanjutnya dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x dengan bantuan minyak emersi.

4.7.2.2 Tes Identifikasi Bakteri dengan Microbact 12A

- 1) Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 3-5 ml garam fisiologis dalam tabung reaksi steril hingga homogen.
- 2) Larutan bakteri yang telah homogen dimasukkan kedalam sumur microbact sebanyak 100 μ l atau 4 tetes untuk sumur lysin, omitin dan H_2S ditambahkan larutan mineral oil sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu microbact diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- 3) Microbact yang telah diinkubasi diambil kemudian ditetaskan reagent pada sumur nomor 8 dengan indol kovact sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VIP I dan VIP III masing-masing 1 tetes, dan sumur nomor 12 dengan TDA sebanyak 1 tetes.
- 4) Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur microbact apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir Patent Record.
- 5) Angka-angka oktaf didapatkan dari penjumlahan reaksi positif dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktaf)
- 6) Nama bakteri dilihat dengan computer berdasarkan angka oktaf yang keluar.

4.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

1. Dilakukan pemeriksaan spektrofotometri pada hasil kultur medium cair Nutrient Broth, dengan panjang gelombang 625 nm untuk mendapatkan OD (Optical Density) = 0,1 yaitu setara dengan McFarland 0,5 (1×10^8 CFU/ml).
2. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 /ml sebanyak 10 ml, selanjutnya dilakukan pengenceran dengan menambahkan 1ml perbenihan cair 10^8 /ml ke dalam 9ml *nutrient broth* untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^7 /ml. Kemudian dilakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1ml perbenihan cair 10^7 /ml untuk ditambahkan 9ml *nutrient broth* sehingga pada akhirnya didapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu sebesar 10^6 /ml. Kini suspensi bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

4.7.4 Pengujian Efek Antimikroba

Untuk pengujian efek antimikroba disediakan 7 tabung steril, 5 tabung sebagai uji antimikroba, 1 tabung sebagai kontrol positif (KP), dan 1 tabung sebagai kontrol negatif (KN). Disediakan pula aquades dan larutan bakteri uji (*Klebsiella pneumoniae*).

Larutan ekstrak etanol daun sambiloto dengan konsentrasi 29% yaitu diperoleh dari 0,29ml ekstrak etanol daun sambiloto ditambah dengan 0,71ml aquades. Larutan ekstrak etanol daun sambiloto dengan konsentrasi 31% yaitu diperoleh dari 0,31ml ekstrak etanol daun sambiloto ditambah dengan 0,69ml aquades. Larutan ekstrak etanol daun sambiloto dengan konsentrasi 33% yaitu diperoleh dari 0,33ml ekstrak etanol daun sambiloto ditambah dengan 0,67ml aquades. Larutan ekstrak etanol daun sambiloto dengan konsentrasi 35% yaitu diperoleh dari 0,35ml ekstrak etanol daun sambiloto ditambah dengan 0,65ml aquades. Larutan ekstrak etanol daun sambiloto dengan konsentrasi 37% yaitu diperoleh dari 0,37ml ekstrak etanol daun sambiloto ditambah dengan 0,63ml aquades.

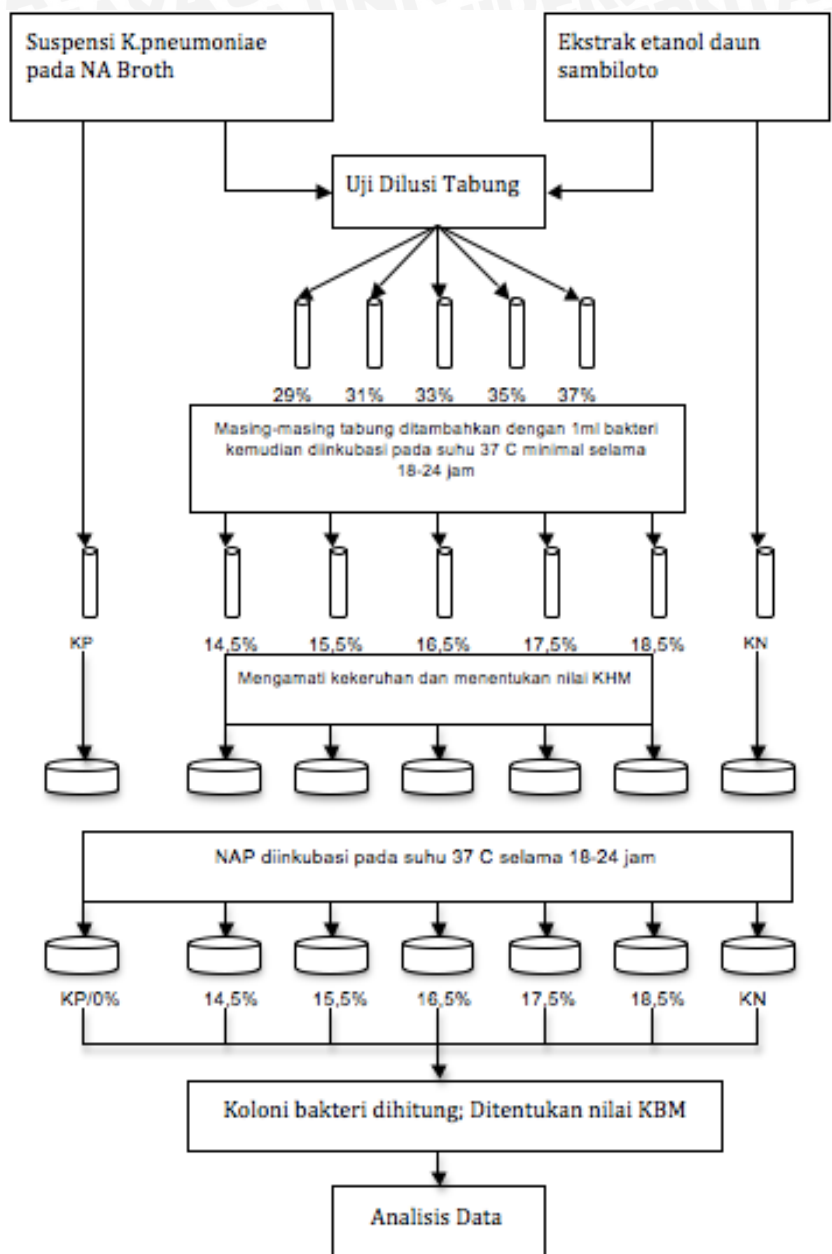
Kemudian kelima konsentrasi awal ekstrak etanol daun sambiloto tersebut masing-masing ditambahkan dengan 1ml perbenihan cair

kuman kemudian dicampur menggunakan vortex. Semua tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Sehingga didapatkan konsentrasi akhir sebesar setengah dari konsentrasi awal yaitu 14,5%; 15,5%; 16,5%; 17,5% dan 18,5%.

Diperhatikan dan dicatat pada tabung nomor berapa tampak mulai terjadi kekeruhan. Kadar terendah pada tabung yang menunjukkan tidak ada kekeruhan merupakan KHM. 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.



4.8 Alur Kerja Penelitian



Keterangan : KP : Kontrol Positif KN : Kontrol Negatif

NAP: Nutrient Agar Plate

Gambar 4.1 Skema Alur Uji Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Sambiloto terhadap *Klebsiella pneumoniae*

4.9 Analisis Data

Analisis data menggunakan uji statistik *one way Anova*, pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha < 0,05$). Uji Anova satu arah ini digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian berbagai macam konsentrasi ekstrak etanol daun sambiloto terhadap jumlah koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Sedangkan untuk mengetahui hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak dengan penurunan jumlah koloni bakteri digunakan uji korelasi dengan taraf kepercayaan 95%.

