

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* di laboratorik *in vitro* dengan rancangan *true experiment-post test only control group design*. Uji antimikroba ini dilakukan dengan menggunakan uji dilusi agar untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun kayu putih (*Melaleuca leucadendra*) sebagai antibakteri terhadap *Vibrio cholerae*. Uji antimikroba ini dilakukan untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM).

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan yakni tidak diberikan pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% dan 0% sebagai kontrol positif. Besarnya konsentrasi yang digunakan, ditetapkan melalui penelitian pendahuluan.

#### 4.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Juni-Agustus tahun 2014.

#### 4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam peneliltian ini adalah ekstrak daun kayu putih dan bakteri *Vibrio cholerae*.

#### 4.4 Estimasi Jumlah Pengulangan Sampel

Untuk menghitung jumlah pengulangan dapat diketahui dengan rumus (Solimun,2001)

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

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan

Pada penelitian ini, digunakan 6 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% serta 1 kontrol positif, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus estimasi pengulangan sbb (Loekito, 1998) :

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \approx 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut maka setiap perlakuan dalam penelitian ini, dilakukan pengulangan sebanyak 4x.

#### 4.5 Variabel Penelitian

##### 4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun Kayu Putih yang dibuat dengan konsentrasi kadar ekstrak antara lain : 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, dan KP(Kontrol positif) berdasarkan eksplorasi awal atau penelitian pendahuluan.

#### 4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah tingkat pertumbuhan koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh pada medium NA (*Nutrient Agar*) untuk menentukan KHM.

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Bakteri *V.cholerae* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan isolat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,
2. Daun kayu putih berasal dari kota Batu dan telah disertifikasi oleh Balai Materia Medika Batu. Daun dipilih yang muda, segar, berwarna hijau, dan berasal dari satu pohon yang kemudian diproses menjadi serbuk kering untuk diekstrak.
3. Ekstrak daun kayu putih diperoleh dari hasil ekstraksi cair daun kayu putih dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan bahan aktif sebesar 100%.
4. Kadar Hambat Minimal (KHM) yaitu konsentrasi terendah dari antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan metode dilusi agar yang ditandai dengan pertumbuhan koloni kurang dari atau sama dengan 2 (Andrews, 2001).
5. Hasil penelitian dinyatakan dalam bentuk *scoring*, yaitu +4, +3, +2, +1, 0, yang berarti:
  - +4 adalah koloni tumbuh sangat tebal dan tidak terhitung
  - +3 adalah koloni tumbuh tebal dan tidak terhitung
  - +2 adalah koloni tumbuh tipis dan tidak terhitung
  - +1 adalah koloni tumbuh sangat tipis dan tidak terhitung
  - 0 berarti tidak ada pertumbuhan koloni

## 4.7 Rancangan Operasional Penelitian

Operasional penelitian meliputi pembuatan ekstrak etanol daun kayu putih, identifikasi bakteri uji (*Vibrio cholerae*), persiapan suspensi bakteri uji, dan uji efek antibakteri ekstrak daun kayu putih.

### 4.7.1 Prosedur Pembuatan Ekstrak Daun Kayu Putih

#### 4.7.1.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Kayu Putih

*vacuum oven* atau *drying oven*, timbangan analisis (*Analytical balance*), *Beaker glass*, *Buchner funnel* (corong *Buchner*), *lundum/soxhlet extraction thimble* (tabung berpori untuk memasukkan sampel) dengan ukuran pori 10-15 mm yang sesuai dengan ekstraktor *soxhlet water bath*, labu penampung (*collection flask*) berukuran 250 mL, evaporator dengan vakum, *desiccator*, *water pump* dan *water bath*, dan ekstraktor *soxhlet*, yang terdiri dari gelas *soxhlet* dengan ukuran 100 mL.

#### 4.7.1.2 Ekstraksi dan Evaporasi

##### A. Pengolahan Daun Kayu Putih (*Melaleuca leucadendra*)

- 1) Daun kayu putih dicuci dari kotoran, tiriskan, lalu keringkan dari air, selanjutnya ditimbang.
- 2) Daun kayu putih segar sebanyak 1 kg di jemur dalam ruangan penjemuran dimana sinar matahari menjadi sumber panas selama kira-kira 3 hari untuk memperoleh daun kayu putih kering (*simplisia*).

- 3) Daun kayu putih kering digiling menggunakan mesin penggiling dengan ukuran besar penyaringnya 90 mass. Melakukan penggilingan sebanyak 3 kali.

#### B. Prosedur Ekstraksi

- 1) Menimbang serbuk daun kayu putih seberat 200 gram. Kemudian serbuk daun kayu putih direndam dengan pelarut etanol 96% dalam wadah beker glass dengan perbandingan 1 : 3 ( 1 kg bahan → 3 liter pelarut etanol 96%)

$$\text{Bahan} = 200\text{g} = 0,2 \text{ l}$$

$$\text{Maka volum pelarut} = \frac{0,2}{1} \times 3 \text{ l} = 0,6 \text{ l} \text{ ( 600 ml )}$$

- 2) Merendam bahan dan mendinginkan pada suhu kamar selama minimal 2x24 jam dengan sesekali diaduk. Setelah 2x24 jam, rendaman dalam baker glass tersebut disaring.
- 3) Menyaring bahan rendaman dengan menggunakan kertas saring Whatman no.40, hasil penyaringnya diwadahi dengan elemenyer glass.
- 4) Pelarut yang diperoleh (yang mengandung bahan aktif) di evaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut etanol 96% dengan menggunakan vacuum oven.
- 5) Mengoven kembali sisa pelarut yang tersisa dengan vacuum oven dengan suhu 40-50°C sehingga benar-benar tidak mengandung pelarut etanol.

## 4.7.2 Identifikasi bakteri *Vibrio cholerae*

### 4.7.2.1 Pewarnaan Gram

#### 4.7.2.1.1 Alat dan Bahan Untuk Pewarnaan Gram Bakteri

Isolat bakteri *Vibrio cholerae*, Kristal Violet, Lugol, Alkohol 96%, Safranin, Gelas objek, Kertas penghisap, Mikroskop binokuler, Ose, Minyak emersi dan Air.

#### 4.7.2.1.2 Prosedur Pewarnaan Gram

1. Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak. Kemudian biarkan dingin
2. Buat sediaan bakteri diatas gelas obyek dengan ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis) dan dibiarkan kering diudara. Kemudian difiksasi diatas lampu bunsen.
3. Sediaan dituangi dengan Kristal Violet. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
4. Kemudian sediaan dituangi dengan Lugol. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
5. Sediaan dituangi dengan alcohol 96%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air.
6. Sediaan dituangi dengan Safranin. Setelah setengah menit, sediaan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan obyektif perbesaran 100x. Hasil yang tampak bakteri *Vibrio cholera* berbentuk batang berwarna merah.

#### 4.7.2.2 Penanaman pada media TCBS (*Thiosulfat Citrat Bile Salt Sucrosa*)

##### 4.7.2.2.1 Alat dan Bahan Pembuatan TCBS:

Erlenmeyer 250 mL, Spirtus, Kaki tiga, Cawan Petri, Spatula Kasa, asbes, Autoclaf, Neraca Teknis, Gelas Ukur, Kasa Steril, Kapas Lemak, Agar TCBS, Aquadest, dan Bakteri vibrio cholera.

##### 4.7.2.2.2 Prosedur Penanaman Bakteri di Media TCBS

1. Sterilisasi aquadest 100 mL dalam erlenmeyer 250 mL, ditutup dengan bundel lalu ditutup dengan kertas ikat menggunakan karet, lalu di autoclaf selama 15 menit pada suhu 121°C
2. Agar TCBS ditimbang secara teknis sebanyak 8,8 gram
3. Kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer yang telah berisi aquadest steril 100 mL. Tabung Erlenmeyer ditutup kapas (pada ujung bibir erlanmayer untuk penutup erlanmayer saat direbus dan diinkubasi) dan dibungkus (Erlanmayer dibungkus Koran dan diikat dengan tali untuk pengemasan saat perebusan dan diinkubasi).
4. Campuran direbus 20 menit hingga larut dan digoyangkan sampai homogen
5. Dituangkan kedalam cawan petri secara aseptik
6. Ditunggu sampai hangat-hangat kukuh untuk penanaman bakteri
7. Setelah beku, cawan petri dibalik.

8. Dibungkus menggunakan kertas diberi nama media dan tanggal pembuatan.
9. Kemudian TCBS diinkubasi dalam waterbath hingga media akan digunakan. TCBS tidak disterilisasi dalam autoklaf karena TCBS memiliki antinutrisi yang dapat merusak nutrisi jika TCBS disterilisasi dalam autoklaf.

#### 4.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

1. Beberapa koloni *Vibrio cholerae* dipindahkan ke tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth* dengan menggunakan ose.
2. Tabung reaksi lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10<sup>8</sup> CFU/ml (sesuai standar McFarland 0,5), lakukan perhitungan sebagai berikut:

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Keterangan:

- V1 : Volume bakteri yang akan ditambah pengencer  
N1 : Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)  
V2 : Volume suspensi bakteri uji (10 mL)  
N2 : Optical density (0,1 = setara dengan 10<sup>8</sup>/mL)

Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10<sup>8</sup>/ml sebanyak 10 ml.



4. Lakukan pengenceran suspensi bakteri sebesar 1/100 dari konsentrasi seluma untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml, caranya: Dari 10 ml bakteri dengan konsentrasi  $10^8$  CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl, aduk rata sampai larutan homogen sehingga konsentrasi bakteri menjadi  $10^7$  CFU/ml. Lalu dari larutan dengan konsentrasi bakteri  $10^7$  CFU/ml tersebut diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml *nutrient broth*, aduk rata sampai larutan homogen, sehingga konsentrasi bakteri menjadi  $10^6$  CFU/ml (Dzen et al., 2003).

#### 4.7.4 Uji Dilusi Agar

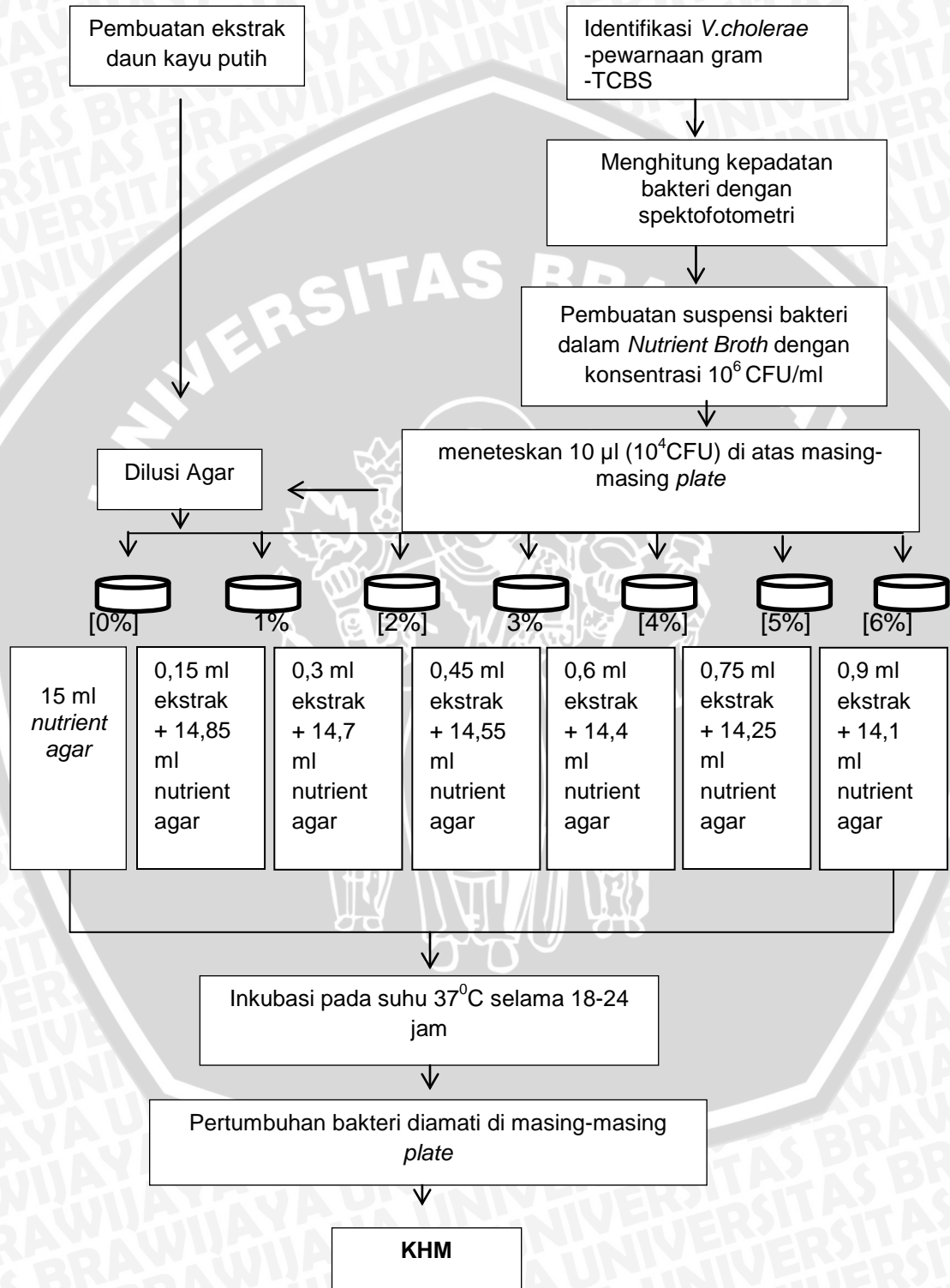
Uji kepekaan bakteri pada penelitian ini menggunakan metode dilusi agar.

Prosedur dari metode dilusi agar adalah sebagai berikut :

- 1) Disediakan 6 *plate* berdiameter 9 cm dan telah diberi tanda I, II, III, IV, V, VI dan VII. *Plate* sebelumnya telah disterilisasi dengan menggunakan otoklaf (suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit), kemudian didinginkan hingga suhunya mencapai  $48\text{-}50^{\circ}\text{C}$ .
- 2) Masing-masing *plate* diisi dengan larutan ekstrak etanol daun kayu putih (*Melaleuca leucadendra*) dengan konsentrasi 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% dan dicampur dengan *nutrient agar*. Volume yang dipakai dalam setiap *plate* adalah 15 ml. Dengan perhitungannya sebagai berikut :
  - Konsentrasi 0% : tanpa ekstrak + 15 ml *nutrient agar*

- Konsentrasi 1% : 0,15 ml ekstrak etanol daun kayu putih + 14,85 ml *nutrient agar*
  - Konsentrasi 2% : 0,3 ml ekstrak etanol daun kayu putih + 14,7 ml *nutrient agar*
  - Konsentrasi 3% : 0,45 ml ekstrak etanol daun kayu putih + 14,55 ml *nutrient agar*
  - Konsentrasi 4% : 0,6 ml ekstrak etanol daun kayu putih + 14,4 ml *nutrient agar*
  - Konsentrasi 5% : 0,75 ml ekstrak etanol daun kayu putih + 14,25 ml *nutrient agar*
  - Konsentrasi 6% : 0,9 ml ekstrak etanol daun kayu putih + 14,1 ml *nutrient agar*
- 3) Keesokan harinya, setiap *plate* tersebut dibagi 4 untuk masing-masing perlakuan karena dalam penelitian ini menggunakan 4 pengulangan yang masing-masing akan ditetesi bakteri uji sebanyak 1 tetes mikro pipet yang setara dengan 10 $\mu$ l mengandung 10<sup>4</sup>CFU/ml. (Bakteri uji yang dipakai adalah bakteri yang diencerkan sampai 10<sup>6</sup> CFU/ml).
- 4) Kemudian semua *plate* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C.
- 5) Koloni yang tumbuh pada agar *plate* diamati. *Plate* dengan konsentrasi terendah dimana tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni bakteri adalah *plate* dengan konsentrasi yang dapat disebut sebagai kadar hambat minimum (KHM)

### 4.8 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

#### 4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh berasal dari hasil pertumbuhan koloni *Vibrio cholerae* pada agar *plate* yang telah diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Analisis data yang digunakan adalah uji statistik non parametrik dikarenakan data hasil penelitian berupa data ordinal, sehingga uji parametrik tidak dapat digunakan. Uji statistic nonparametrik yang digunakan adalah statistik Kruskal Wallis untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh ekstrak daun kayu putih terhadap *Vibrio cholerae*. Uji Mann Whitney digunakan untuk membandingkan perlakuan mana saja yang menyebabkan pertumbuhan bakteri *V. cholerae* cenderung berbeda secara signifikan atau tidak berbeda signifikan. Dan uji Korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan dari pemberian ekstrak ekstrak daun kayu putih (*Melaleuca leucadendra*) terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae*. Dalam perhitungan hasil penelitian ini digunakan batas kepercayaan 95% untuk tingkat signifikansi ( $\alpha$ ) = 0,05.