# BAB 4

# METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan *post test control group desaign only* yang menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun ciplukan sebagai antimikroba yang dapat mempengeruhi *Escherichia coli* secara *in vitro*. Proses ekstraksi daun ciplukan menggunakan etanol. Metode dilusi tabung meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada MH (Muller Hinton) broth untuk menentukan KHM dan tahap streaking pada media NAP (Nutrient Agar Plate) untuk menentukan KBM.

## 4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun ciplukan dan *Escherichia coli* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Besarnya sampel yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

Estimasi jumlah sampel:

$P(n-1) \geq 15$ (Notobroto, 2005)

$5(n-1) \geq 15$

$5n-5 \geq 15$

$5n \geq 20$

$n \geq 4$

keterangan : n = jumlah perlakuan (terdiri dari lima macam perlakuan berdasarkan konsentrasi ekstrak etanol daun ciplukan)

p = banyaknya penggulangan yang diperlukan

**4.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang yang dilakukan selama bulan Februari sampai Agustus 2014.

**4.4 Variabel Penelitian**

**4.4.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak etanol daun ciplukan yang terdiri dari 5 konsentrasi, yaitu 14%, 13%, 12%, 11%, 10% berdasarkan eksplorasi terdahulu.

**4.4.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

**4.5 Definisi Operasional**

- Daun ciplukan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun ciplukan yang tumbuh liar dan didapat di Kota Malang dengan karakteristik warnanya masih terlihat hijau serta masih segar.
- Ekstrak etanol daun ciplukan adalah daun ciplukan yang dikeringkan dana dibuat bentuk serbuk kemudian dijadikan ekstrak cair dengan menggunakan bahan pengekstrak etanol 96% dengan metode maserasi.
- Konsentrasi awal ekstrak daun ciplukan yang dipakai adalah 14%, 13%, 12%, 11%, 10% yang dimana konsentrasi itu didapat melalui penelitian pendahuluan.

- Isolat *Escherichia coli* yang digunakan pada penelitian ini adalah 1 isolat *Escherichia coli* pasien berasal dari Kota Malang yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Kontrol negatif adalah ekstrak daun ciplukan murni yang tidak dicampur dengan bakteri *Escherichia coli*.
- Kontrol positif adalah biakan *Escherichia coli* murni yang dicampur dengan ekstrak etanol daun ciplukan.

**4.6 Bahan dan Alat Penelitian**

**4.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun ciplukan**

**4.6.1.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak etanol daun ciplukan antara lain: blender untuk menghaluskan daun ciplukan, kertas saring untuk membungkus serbuk daun ciplukan, gelas ekstraksi, seperangkat evaporator, tabung pengdingin dan pompa sirkulasi air dingin, bak penampungan air dingin, pompa vakum, tabung penampungan etanol, batu didih, cawan penguap dan neraca analitik.

**4.6.1.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak etanol daun ciplukan antara lain: daun ciplukan, etanol 96%, dan aquades,NAP, Muller Hinton Broth.

**4.6.2 Identifikasi dan Tes Kepekaan Bakteri**

**4.6.2.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam identifikasi dan tes kepekaan ekstrak terhadap bakteri antara lain: cawan petri, ose, tabung rekasi, labu Erlenmeyer,

thermometer, incubator, gelas obyek, Bunsen, korek api, spidol permanen, pipet steril 10 ml, mikroskop, penggaris, dan *colony counter*.

**4.6.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam identifikasi dan tes kepekaan ekstrak bakteri antara lain: ekstrak daun ciplukan, isolat *Escherichia coli*, nutrient broth, medium NAP, aquades.

**4.6.3 Uji Antimikroba Ekstrak Etanol Daun ciplukan**

**4.6.3.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam uji kepekaan ekstrak etanol daun ciplukan antara lain: tabung reaksi, ose, mikropipet 1ml, inkubator, lampu spiritus, dan vortex.

**4.6.3.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam uji kepekaan ekstrak daun ciplukan antara lain: ekstrak daun ciplukan, perbenihan cairan bakteri *Escherichia coli*, Nutrient Broth (NB), Nutrient Agar Plate (NAP) dan aquades.

**4.7 Rancangan Prosedur Penelitian**

**4.7.1 Pembuatan Sediaan Ekstrak Etanol Daun ciplukan**

Didalam penelitian ini dipergunakan bahan uji berupa ekstrak etanol daun ciplukan yang dibuat dengan cara sebagai berikut:

**4.7.1.1 Proses Pengeringan**

- daun ciplukan dicuci terlebih dahulu
- Dikeringkan dibawah cahaya matahari

**4.7.1.2 Proses Ekstraksi**

- Daun ciplukan, dihaluskan dengan blender

- Daun ciplukan yang kering ditimbang sebanyak 420 gram (daun ciplukan kering)
- gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter dimasukkan 420 gram daun ciplukan kering
- Kemudian direndam dengan etanol sampai volume 900 ml
- Lalu dikocok sampai benar-benar tercampur(± 30 menit)
- Mendiamkan semalam sampai mengendap

**4.7.1.3 Proses Evaporasi**

- Bagian yang akan diambil adalah lapisan atas campuran etanol
- Lalu lapisan tersebut dimasukan ke 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$^{o}$C), sambungkan dengan aliran listrik
- larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu
- larutan etanol ditunggu sampai berhenti menetes pada labu penampung (± 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu)
- Hasil ekstraksi dimasukan ke dalam botol plastik
- Larutan disimpan dalam freezer

**4.7.2 Persiapan Uji Bakteri**

**4.7.2.1 Pewarnaan Gram**

Prosedur pengecatan Gram:

- Membuat sediaan apusan bakteri pada gelas obyek.

- Sediaan dituangi dengan Kristal violet selama 1 menit. Buang sisa Kristal Violet dan bilas dengan air. Kristal Violet di sini berfungsi sebagai bahan warna dasar.
- Sediaan dituangi dengan lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
- Sediaan dituangi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas dengan air.
- Sediaan dituangi dengan safranin selama 30 detik. Buang sisa Safranin dan bilas dengan air, Safranin di sini berfungsi sebagai bahan pewarna pembanding.
- Sediaan dikeringkan menggunakan kertas penghisap. Dan selanjutnya dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x dengan bantuan minyak emersi.

**4.7.2.2 Fermentasi Laktosa pada Medium MacConkey**

Tes ini dilakukan dengan mengamati koloni *Escherichia coli* yang ditanam pada medium MacConkey dan telah diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37$^{o}$C. koloni *E.coli* pada medium tersebut akan berwarna merah karena bakteri ini memfermentasikan laktosa.

**4.7.2.3 Media Diferensia EMB (Eosin Methylene Blue)**

Koloni *E.coli* memberikan gambaran yang khas seperti kilatan logam (*metallic sheen*) pada agar EMB yang telah diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37$^{o}$C.

**4.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji**

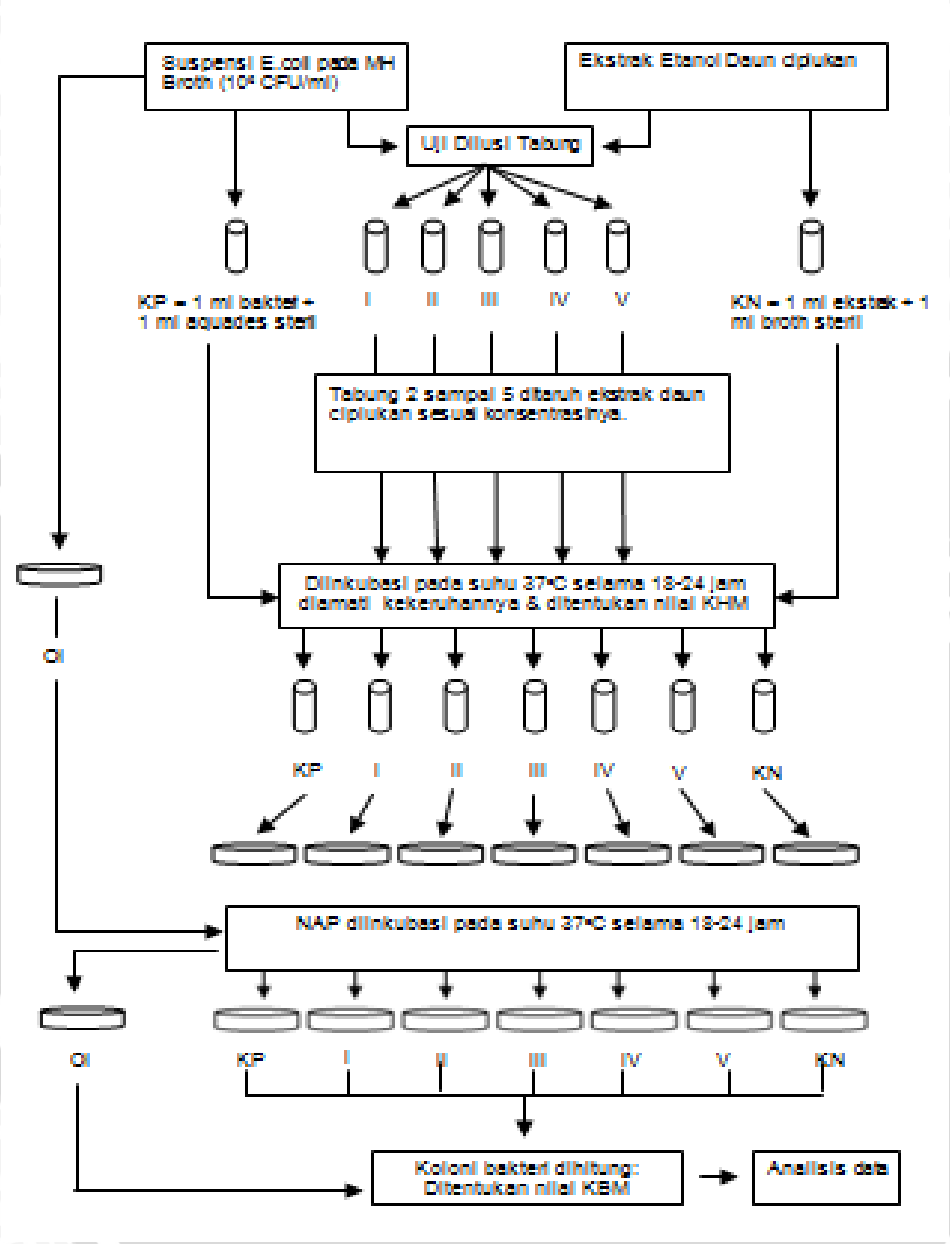
Suspensi bakteri yang digunakan adalah $10^{6}$ CFU/ml. Dilakukan pemeriksaan spektrofotometri pada hasil kultur medium cair MH broth, dengan panjang

gelombang 625 nm untuk mengetahui nilai absorbsi dari suspensi. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar $10^6$ CFU/ml yang setara dengan OD *(Optical Density)* = 0,5 (Macfarlane, 1999). Sehingga diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi $10^6$CFU/ml sebanyak 10 ml. setelah diperoleh suspense bakteri dengan konsentrasi $10^6$ CFU/ml sebanyak 10 ml, selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 1/100 kali dengan menggunakan MH broth sehingga diperoleh suspensi bakteri sebanyak 10 ml dengan konsentrasi bakteri $10^6$ CFU/ml. kini suspensi bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

### 4.7.4 Pengujian Efek Antimikroba

- 5 tabung reaksi steril yang siap digunakan dan diberi label sebagai A (28%), B (26%), C (24%), D (22%), dan E (20%), dimana konsentrasi tersebut belum ditambahkan bakteri.
- Stok 10 ml 50% ekstrak etanol daun ciplukan dibuat dengan menambahkan 5 ml dari ekstrak etanol daun ciplukan dan 5 ml air suling
- Uji tabung A diisi dengan 0.56ml ekstrak etanol daun ciplukan 50% dan 0.44ml air suling untuk mendapatkan konsentrasi 28%.
- Uji tabung B diisi dengan 0.52ml ekstrak etanol daun ciplukan 50% dan 0.46ml air suling untuk mendapatkan konsentrasi 26%.
- Uji tabung C diisi dengan 0.48ml ekstrak etanol daun ciplukan 50% dan 0.44ml air suling untuk mendapatkan konsentrasi 24%.
- Uji tabung D diisi dengan 0.44ml ekstrak etanol daun ciplukan 50% dan 0.56ml air suling untuk mendapatkan konsentrasi 22%.

- Uji tabung E diisi dengan 0.40ml ekstrak etanol daun ciplukan 50% dan 0.60ml air suling untuk mendapatkan konsentrasi 20%.
- 1 ml bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi $10^6$/ml ditambahkan pada tabung A, B, C, D, dan E.
- Konsentrasi akhir untuk tabung A, B, C, D, dan E setelah ditambahkan 1ml *Escherichia coli* $10^6$ bakteri/ml adalah 14%, 13%, 12% dan 11%, dan 10%.
- Lalu dimasukkan ke inkubator selama 18-24 jam pada suhu $37^oC$.
- Lalu dilihat hasil KHM dari setiap tabung kemudian menentukan kadar hambat minimal dari tabung dengan melihat jernih atau keruhnya hasil dari inkubasi, setelah itu setiap tabung yang berisi konsentrasinya tersebut ditanaman pada medium NAP untuk menilai kadar bunuh minimal.
- Kemudian diinkubasikan pada suhu $37^oC$ selama 18-24 jam kemudian dihitung jumlah pertumbuhan koloni bakteri untuk menentukan KBM.




Keterangan :

KP : Kontrol Positif

KN : Kontrol Negatif

A : 14%

B : 13%

C : 12%

D : 11%

E : 10%

### 4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif dari hasil penghitungan jumlah koloni *Escherichia coli* pada NAP yang telah diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37$^{o}$C.

Dalam perhitungan hasil penelitian ini digunakan batas kepercayaan 95% (a=0,05). Data yang diperoleh yaitu data konsentrasi ekstrak etanol daun ciplukan dari jumlah koloni bakteri. Analisis yang digunakan adalah uji korelasi,uji regresi,post hoc tukey,uji asumsi data, dan uji *One Way* ANOVA. Uji ANOVA digunakan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun ciplukan terhadap pertumbuhan koloni bakteri serta dapat digunakan untuk memprediksi jumlah koloni bakteri. Uji korelasi bertujuan untuk menganalisis hubungan antara ekstrak etanol daun ciplukan dengan pertumbuhan bakteri *E.coli*.