BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah dengan *True Experimental-post* test only Control Group Design dengan metode dilusi agar. Sehingga diketahui efek ekstrak temulawak sebagai antimikroba, dalam hal ini mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM), terhadap bakteri *Escherichia coli*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2014 pada rentang waktu 23 Juni 2014 – 4 Juli 2014.

4.3 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Escherichia coli*, yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Jumlah sampel didapat dengan menggunakan rumus perhitungan:

p (n-1) ≥ 15

dengan:

p = jumlah konsentrasi yang digunakan

n = jumlah sampel yang dibutuhkan

Penelitian ini menggunakan 6 konsentrasi yang berbeda, jadi jumlah sampel yang dibutuhkan sesuai dengan perhitungan berikut:

 $p(n-1) \ge 15$ (Notobroto, 2005)

 $6 (n-1) \ge 15$

 $6n - 6 \ge 15$

 $6n \ge 15 + 6$

6n ≥ 21

 $n \ge 3.5 = 4$

Penelitian ini menggunakan 4 isolat yang berbeda. Isolat yang diambil berasal dari urine, darah, dan feses. Isolat yang diambil dari urine sebanyak 2 buah, sedangkan untuk isolat darah dan feses masing-masing berjumlah 1 buah.

Penelitian ini menggunakan 4 isolat yang berbeda dikarenakan sebagai pengganti pengulangan dalam penelitian ini dan untuk mewakili dari masingmasing bentuk patogenitas.

4.4 Variabel

4.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ektrak temulawak. Variabel ditentukan lewat penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan koloni Escherichia coli dalam media padat.

4.5 Definisi Operasional

- Sediaan ektrak temulawak adalah sediaan yang berasal dari temulawak yang diekstrak dengan asumsi konsentrasi awal adalah 100% dan temulawak didapat dari Pasar Besar, Malang.
- Isolat bakteri adalah isolat bakteri Escherichia coli yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

- KHM adalah konsentrasi terendah ekstrak rimpang temulawak yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri Escherichia coli yang pada metode dilusi agar ditandai dengan pertumbuhan koloni kurang dari tiga pada media yang ditetesi 1x10⁴ CFU/10 µl (*Baron et all*,1994).
- Penilaian pertumbuhan koloni menggunakan skoring

> 0 : tidak ada pertumbuhan koloni

pertumbuhan koloni bisa dihitung

> +2 : pertumbuhan koloni tipis dan tidak bisa dihitung

> +3 : pertumbuhan koloni tebal dan tidak bisa dihitung

4.6 Bahan dan Alat

4.6.1 Pembuatan Ekstrak

- Evaporator
- timbangan ukur
- pendingin spiral / rotatory evaporator
- labu erlenmeyer
- selang water pump
- corong gelas
- water pump

- kertas saring
- waterbath
- labu evaporator
- vacum pump
- labu penampung
- bubuk rimpang temulawak
- air suling
- etanol 96%

4.6.2 Identifikasi Bakteri

- Isolat bakteri Escherichia coli
- cawan petri
- inkubator
- larutan McFarland 0,5

bahan pewarna gram: kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin, minyak emersi, ose, mikroskop binokuler.

4.6.3 Dilusi Agar

Alat:

tabung reaksi	>	korek api
tabang round		Korok apr

- mikropipet
 ose
- inkubator
 penggaris
- vortex
 plate kosong dan steril
- bunsen
 kapas.

Bahan:

- ekstrak rimpang temulawak
- isolat bakteri E. coli
- alkohol 95%
- air suling
- media dilusi agar.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Rimpang Temulawak

4.7.1.1 Proses Pengeringan

- Rimpang temulawak dicuci dari kotoran, tiriskan, keringkan, selanjutnya ditimbang.
- Keringkan dengan sinar matahari atau udara.

4.7.1.2 Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi.

- Rimpang remulawak kering ditumbuk halus menjadi bubuk lalu ditimbang dalam timbangan ukur seberat 100 gram.
- Bungkus menggunakan kertas saring dan direndam dalam etanol 96% selama semalam. Etanol 96% yang digunakan untuk merendam diganti beberapa kali sampai air ekstrak jernih. Kemudian hasil ekstraksi siap untuk dievaporasi.

4.7.1.3 Proses Evaporasi

- Evaporator sel dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30°-40° terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotatory evaporator* dan tabung pendingin, kemudian tabung pendingin dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui pipa plastik. Tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.
- Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam labu penampung sedangkan rotatory
 evaporator, alat pompa sirkulasi air dingin, dan alat pompa vakum
 dinyalakan. Pemanas aquades juga dinyalakan pada suhu 65°C (titik didih
 etanol) sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi
 mendidih dan etanol mulai menguap.
- Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum
- Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah menjadi kental, evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap

kemudian dioven selama 2 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstrak 100%

4.7.2 Preparasi Bakteri

4.7.2.1 Tes konfirmasi bakteri Escherichia coli

4.7.2.1.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram

- Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas obyek, kemudian diambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan aquades yang telah diletakkan di atas gelas obyek. Kemudian dibiarkan kering di udara.
- 2. Suspensi bakteri yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkannya di atas api beberapa kali dan siap diwarnai.
- 3. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama 1 menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan perlahan-lahan.
- 4. Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama 1 menit, lalu lugol tersebut dibuang dan dibilas dengan air.
- 5. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat dibawah mikroskop.

4.7.2.1.2 Media Diferensiasi EMB (*Eosin Methylene Blue*)

- 1. Membiakkan bakteri ditanam pada agar EMB kemudian diinkubasi semalam pada suhu 37°C.
- 2. Koloni *Escherichia coli* akan memberikan gambaran kilatan logam (*metallic-sheen*) pada agar EMB. (Dzen dkk., 2003)

4.7.2.2 Pembuatan suspensi uji bakteri

- 1. Beberapa koloni *E. Coli* dipindahkan ke tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth* dengan menggunakan ose.
- Untuk mengetahui optical density (OD) sama dengan 1 dari suspensi tersebut, lakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625nm.
- 3. Untuk mendapatkan konstentrasi bakteri sebesar 10⁶ CFU/ml yang setara dengan OD = 0,1, lakukan pengenceran suspensi bakteri dengan konstentrasi sebanyak 2 kali, caranya: dari 10 ml bakteri dengan konsentrasi 10⁸ 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 10⁷ CFU/ml. Lalu dari larutan homogen sehingga konsentrasi bakteri 10⁷ CFU/ml tersebut diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml *NaCl* aduk rata sampai larutan homogen, sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10⁶ CFU/ml (Dzen dkk, 2003).

4.7.3 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Rimpang Temulawak

Cara menentukan konsentrasi ekstrak rimpang temulawak dalam media agar adalah sebagai berikut :

$$X = \frac{V \text{ ekstrak}}{V \text{ ekstrak} + V \text{ agar}}$$

X = konsentrasi rimpang temulawak yang digunakan dalam media agar

V = volume

Volume total dari agar plate diasumsikan sebesar 20 ml. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam percobaan ini adalah 25%, 24%,23%, 22%, 21%, dan 20%. Konsentrasi tersebut didapat setelah sebelumnya dilakukan penelitian eksplorasi yang dilakukan sebanyak dua kali. Pada

penelitian eksplorasi pertama kali menggunakan konsentrasi 1%, 5%, dan 10% tidak menunjukkan hasil yang diharapkan. Kedua, menggunakan konsentrasi 11%, 12%, 13%, 14%, dan 15%. Pada konsentrasi 15% masih menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri yang tebal.

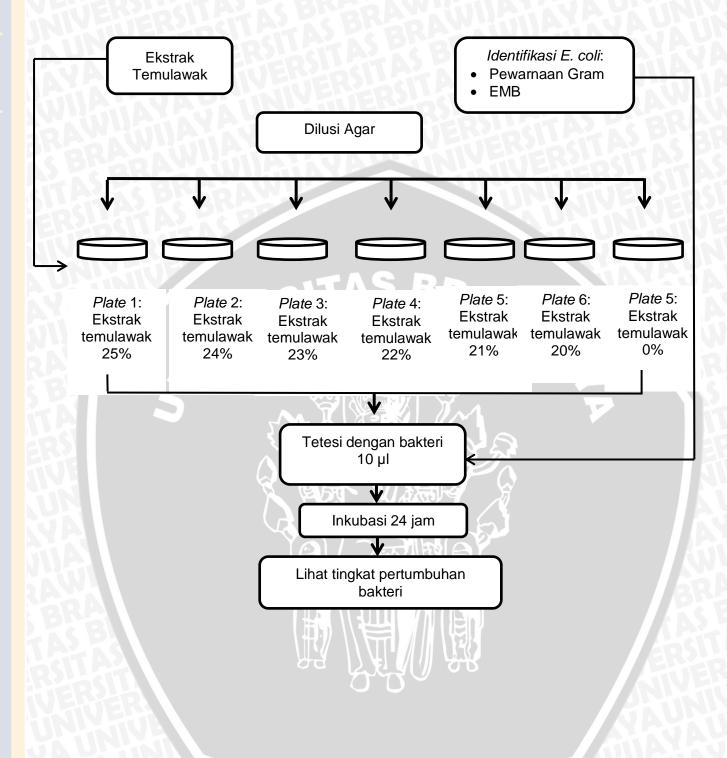
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak rimpang temulawak 25%
 dibutuhkan 5 ml ekstrak rimpang temulawak dan 15 ml agar.
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak rimpang temulawak 24%
 dibutuhkan 4,8 ml ekstrak rimpang temulawak dan 15,2 ml agar.
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak rimpang temulawak 23% dibutuhkan 4,6 ml ekstrak rimpang temulawak dan 15,4 ml agar.
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak rimpang temulawak 22%
 dibutuhkan 4,4 ml ekstrak rimpang temulawak dan 15,6 ml agar.
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak rimpang temulawak 21%
 dibutuhkan 4,2 ml ekstrak rimpang temulawak dan 15,8 ml agar.
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak rimpang temulawak 20% dibutuhkan 4 ml ekstrak rimpang temulawak dan 16 ml agar.

4.7.4 Pengujian Efek Antimikroba

- Sediakan 6 plate steril berdiameter 9 cm.
- Tandai plate untuk pengujian efek anti bakteri pada plate 1 sampai 7:
 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20% 0%
- Volume yang dipakai dalam setiap plate untuk mencampur agar adalah
 20 ml, sehingga volume ekstrak yang dimasukkan ke dalam ke masing-masing plate adalah sebagai perikut:
 - Plate 1:5 ml ekstrak rimpang temulawak dan 15 ml agar
 - Plate 2: 4,8 ml ekstrak rimpang temulawak dan 15,2 ml agar
 - Plate 3: 4,6 ml ekstrak rimpang temulawak dan 15,4 ml agar

- Plate 4: 4,4 ml ekstrak rimpang temulawak dan 15,6 ml agar
- ➤ Plate 5 : 4,2 ml ekstrak rimpang temulawak dan 15,8 ml agar
- Plate 6: 4 ml ekstrak rimpang temulawak dan 16 ml agar
- ➤ Plate 7 : 20 ml agar
- Bakteri uji yang dipakai adalah bakteri yang diencerkan sampai 106 CFU/ml.
- Setelah agar dingin, plate tersebut ditandai menjadi 4 bagian yang pada setiap bagian ditetesi bakteri uji sebanyak 10⁴ CFU/10 µl. Kemudian semua plate diinkubasikan selama 18-24 jam.
- Setelah koloni tumbuh, dibaca hasilnya. Konsentrasi ekstrak pada dilusi agar plate yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni disebut sebagai KHM larutan ekstrak.





4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data kualitatif dari hasil pertumbuhan koloni Escherichia coli pada agar plate yang diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam berupa data konsentrasi ekstrak rimpang temulawak dan pertumbuhan koloni bakteri. Analisis yang digunakan adalah uji statistik Kruskall Wallis untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak temulawak terhadap Escherichia coli sehingga dapat disimpulkan jika ekstrak temulawak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap Escherichia coli, uji Mann Whitney yang digunakan untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian ekstrak temulawak sebagai antimikroba terhadap bakteri Escherichia coli pada setiap konsentrasi yang diberikan, dan uji korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian perlakuan terutama yang disebabkan oleh pemberian ekstrak temulawak dengan pertumbuhan koloni bakteri Escherichia coli. Dalam penelitian ini, besar kepercayaan yang dipakai adalah 0,95 untuk tingkat signifikansi (α)= 0,05.