

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah studi eksperimen dengan desain *true experiment*. Uji antimikroba dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan *tube dilution test* untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun gambir sebagai antimikroba terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*. *Tube dilution test* meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada *medium broth* untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan tahap kultur pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP) untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KBM).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus Tahun 2013.

4.3 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun gambir (*Uncaria gambir*) dan menggunakan isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Pengulangan dan Besar Sampel

4.4.1 Pengulangan

Pada penelitian ini, digunakan perlakuan dengan 5 macam dosis konsentrasi berbeda 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif. Jumlah pengulangan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus estimasi pengulangan sebagai berikut $p(n-1) \geq 15$ (Loekito, 1998) .

Penghitungan banyaknya pengulangan sebagai berikut :

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 22/7$$

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

Jadi besarnya pengulangan yang dilakukan adalah 4 kali.

Keterangan : n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (konsentrasi ekstrak daun gambir)

4.4.2 Besar Sampel

Setelah diketahui jumlah perlakuan dan pengulangan, maka jumlah sampel dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut $S = p \times n$ (Loekito, 1998).

Penghitungan jumlah sampel sebagai berikut :

$$S = p \times n$$

$$= 7 \times 4$$

$$= 28$$

Jadi jumlah sampel yang diperlukan adalah 28.

Keterangan : S = jumlah sampel

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada agar. Pengukuran variabel tergantung yaitu, dengan melihat kekeruhan dari tabung reaksi dan jumlah pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada agar.

4.5.2 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun gambir (*Uncaria gambir*) dengan konsentrasi yang berbeda-beda pada tabung perlakuan.

4.6 Definisi Operasional

- Daun gambir yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Padang yang diekstrak menggunakan metode maserasi dan evaporasi di Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya dan menghasilkan konsentrasi ekstrak 100%.
- Bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang digunakan diperoleh dari kultur bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari sputum penderita pneumonia serta telah diuji karakteristik mikrobiologinya dan memberikan hasil sesuai karakteristik bakteri *Klebsiella pneumoniae*.
- Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*

(ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung apabila dibandingkan dengan kontrol).

- Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi antimikroba terendah pada biakan padat yang menunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* setelah biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada medium agar padat, diinkubasikan, kemudian keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh. KBM ditentukan pada konsentrasi ekstrak yang jumlah koloni bakteri pada NAP $<0,1\%$ ($<0,001$) dari jumlah koloni yang terdapat pada *original inoculums*.

4.7 Pengukuran Pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*

Untuk mengukur pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, dilakukan penghitungan jumlah koloni dengan menggunakan *colony counter*.

4.8 Alat dan Bahan Penelitian

4.8.1 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Alat

- a. Ose lurus, ose lengkung
- b. Kertas penghisap, minyak emersi
- c. Mikroskop
- d. Tabung reaksi
- e. Lampu spiritus

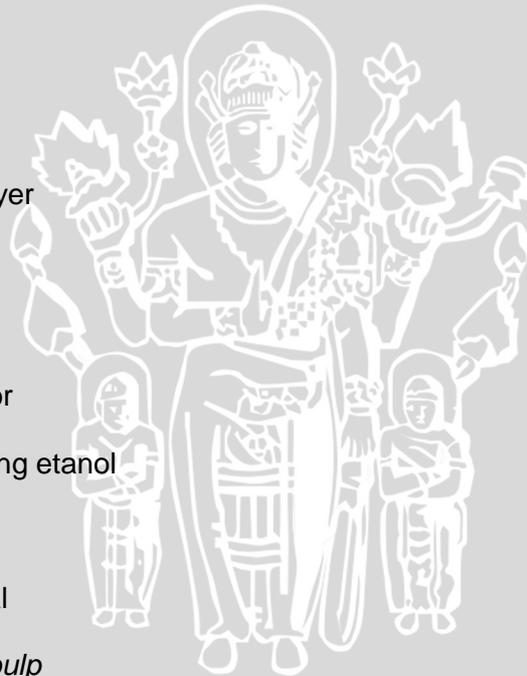
2. Bahan

- a. Isolat *Klebsiella pneumoniae*
- b. Pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin)
- c. *Nutrient broth*
- d. Medium *Mc Conkey Agar*
- e. Bahan tes *Microbact*

4.8.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Gambir (*Uncaria gambir*)

1. Alat

- a. Oven
- b. Timbangan
- c. Gelas Erlenmeyer
- d. Corong gelas
- e. Kertas saring
- f. Labu evaporator
- g. Labu penampung etanol
- h. Evaporator
- i. Pendingin spiral
- j. Selang *Water pulp*
- k. *Water pulp* dan *Water Bath*
- l. *Vacum pulp*



2. Bahan

- a. Daun Gambir (*Uncaria gambir*)
- b. Etanol 96%

- c. Air suling
- d. Botol hasil ekstrak

4.8.3 Alat dan Bahan Uji Kepekaan Ekstrak Daun Gambir (*Uncaria gambir*) Metode *Tube Dilution*

1. Alat

- a. Tabung reaksi steril
- b. Ose lengkung
- c. Mikropipet (1mL)
- d. Inkubator
- e. Lampu spiritus
- f. Label
- g. *Vortex*

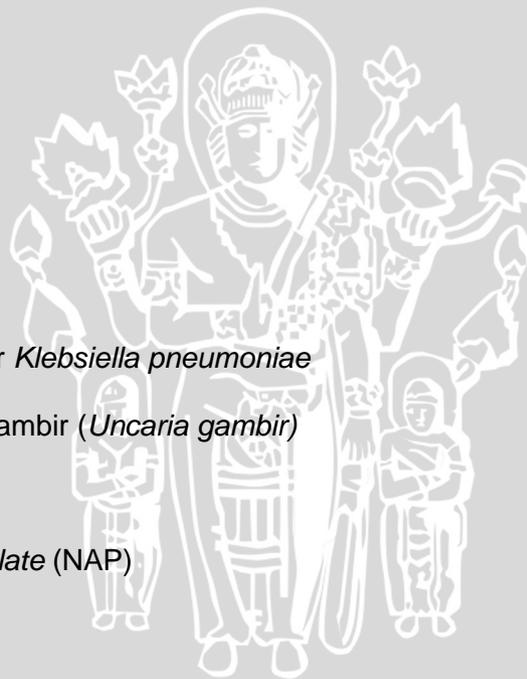
2. Bahan

- a. Perbenihan cair *Klebsiella pneumoniae*
- b. Ekstrak daun gambir (*Uncaria gambir*)
- c. *Nutrient Broth*
- d. *Nutrient Agar plate* (NAP)
- e. Air suling

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Identifikasi Bakteri

4.9.1.1 Pewarnaan Gram



Pada hari pertama, sampel *Klebsiella pneumoniae* diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, dengan cara sebagai berikut (Fransisca, 2008) :

1. Bersihkan gelas obyek dengan kertas tissue dan lewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak. Kemudian biarkan sampai dingin.
2. Buat sediaan bakteri di atas gelas obyek dengan ketebalan yang cukup dan dibiarkan kering di udara. Kemudian difiksasi di atas api 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 alkohol 96%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air.
6. Sediaan dituangi dengan safranin. Setelah 30 detik, sediaan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, selanjutnya dilihat di bawah mikroskop dengan obyektif perbesaran 100x.

4.9.1.2 Perbenihan

Pada hari kedua, biakan diambil (satu ose), kemudian ditanam pada medium *Mc Conkey*, untuk mendapatkan koloni terpisah, kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C. Pada hari ketiga, hasil dari *Mc Conkey* dilihat (ada fermentasi gula atau tidak) (Fransisca, 2008).

4.9.1.3 Tes *Microbact*

Microbact hit mencakup miniatur tes biokimia 12 (12A, 12B, dan 12E) atau 24 (24E). Tes *microbact* untuk bakteri gram negatif dengan hasil tes oksidase negatif digunakan set 12A (dengan strip) atau 12E (dengan *microplate*). Bakteri Gram negatif dengan hasil tes oksidase positif menggunakan set 12B yang dilengkapi dengan set 12A. Prosedur tes *microbact* antara lain: (oxid, 2003)

1. Menentukan hasil tes oksidase bakteri yang akan diuji untuk menentukan set *microbact* yang akan digunakan.
2. Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan ke dalam 3-6 ml garam fisiologis pada tabung reaksi steril hingga homogen
3. Buka penutup lubang *microplate*. Masukkan ± 4 tetes suspensi bakteri ke dalam masing-masing lubang plate.
4. Masukkan ± 2 tetes *mineral oil* (MB1093A) ke dalam lubang plat hitam.
5. Tutup kembali semua lubang plate, kemudian inkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
6. Keluarkan *microplate* dari inkubator, kemudian tambahkan reagen yang diperlukan.
7. Hasil tes *microbact* dapat diinterpretasikan menggunakan program tertentu yang telah disertakan dalam paket *microbact*.



Gambar 4.1 Microbact set (Microplate 12A) (Oxoid, 2003)

4.9.1.5 Penanaman pada *Media Nutrient Agar*

Dilakukan inokulasi bakteri pada media *Nutrient Agar* yang kemudian diinkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C, selama 18-24 jam. Penanaman ini untuk melihat pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan gambaran koloni besar dan *lob-convex*, kasar, dan biasanya berbentuk oval dengan tumbuh segaris dengan garis *streaking*. Kultur berbau khas yang disebut “*cor taco like odor*” (Fransisca, 2008).

4.9.2 Perbenihan Cair Bakteri 10⁶ bakteri/ml

1. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* diambil sebanyak 1-2 ose, lalu dimasukkan ke dalam tabung berisi broth 10 ml, dihomogenkan menggunakan vortex hingga kekeruhan sama dengan standar McFarland 0,5 yaitu 1-1,5 x 10⁸ bakteri/ml.
2. Ambil 1 ml larutan dengan konsentrasi bakteri 1x10⁸ bakteri/ml tersebut, dan masukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml *broth*. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi 1x10⁷ bakteri/ml.

3. Ambil lagi 1 ml larutan dengan konsentrasi 1×10^7 bakteri/ml tersebut, dan masukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml *broth* steril. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi 1×10^6 bakteri/ml. Biakan bakteri siap digunakan untuk penelitian.

4.9.3 Pembuatan Ekstrak Daun Gambir (*Uncaria gambir*) Metode Maserasi dan Evaporasi

4.9.3.1 Proses Pengeringan

1. Daun *Uncaria gambir* dibersihkan.
2. Memotong kecil-kecil
3. Daun Gambir yang telah dipotong kecil-kecil lalu dioven dengan suhu 80°C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air).

4.9.3.2 Proses Ekstraksi

1. Kemudian ditumbuh sampai halus dan jika telah halus.
2. Bubuk daun gambir ditimbang dengan menggunakan timbangan sebanyak 400 gram kemudian dimasukkan dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter.
3. Kemudian direndam didalam larutan etanol 96% sampai volume 600ml dan dikocok sampai benar-benar tercampur (± 30 menit).
4. Didiamkan selama 1 malam sampai mengendap.

4.9.3.2 Proses Evaporasi

1. Evaporator set dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan $30^\circ - 40^\circ$ terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin.
2. 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.

3. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu penampung sedangkan *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.
4. Pemanas air suling juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih dengan suhu 80°C (sesuai titik didih ethanol) dan etanol mulai menguap.
5. Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung ethanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.
6. Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil berkurang dan menjadi kental.
7. Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil.
8. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven selama 2 jam pada suhu 80°C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstrak 100%.

4.9.4 Pelaksanaan Penelitian Eksploratif / Penelitian Pendahuluan

Penelitian eksplorasi dimulai dengan konsentrasi 3,125% hingga 100%. Pada konsentrasi tersebut tidak memenuhi syarat sebagai penelitian utama karena pertumbuhan bakteri hilang secara signifikan, sehingga dilanjutkan dengan perapatan konsentrasi 6,25% hingga 12,5%. Eksplorasi berikutnya dilakukan pada konsentrasi 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5% dan 15%. Pada konsentrasi tersebut tidak memenuhi syarat sebagai penelitian utama karena pertumbuhan bakteri hilang secara signifikan antara konsentrasi 2,5% dan 5%,

sehingga dilanjutkan, sehingga penelitian dilanjutkan dengan konsentrasi antara 2,5% hingga 5%.

Eksplorasi berikutnya dilakukan pada konsentrasi 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, dan 5%. Pada konsentrasi tersebut terlihat pertumbuhan bakteri diduga bukan merupakan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga dilakukan kultur ekstrak pada media NAP. Pada kultur ekstrak tidak didapatkan pertumbuhan bakteri, sehingga penelitian dilanjutkan dengan dosis dibawah 2,5%. Eksplorasi berikutnya dilakukan pada konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% dan 3%. Pada konsentrasi tersebut tidak memenuhi syarat sebagai penelitian utama karena pertumbuhan bakteri hilang secara signifikan antara konsentrasi 2,5% dan 3%, sehingga penelitian dilanjutkan dengan konsentrasi yang dirapatkan antara 2% hingga 3%.

Eksplorasi berikutnya dilakukan pada konsentrasi 2%, 2,2%, 2,4%, 2,6%, 2,8% dan 3%. Pada konsentrasi tersebut tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi manapun, sehingga eksplorasi ini tidak dapat dijadikan penelitian utama. Sehingga dilanjutkan eksplorasi dengan menggunakan konsentrasi dibawah 2%. Eksplorasi berikutnya dilakukan pada konsentrasi 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 1,25%, dan 1,5%. Pada konsentrasi tidak memenuhi syarat sebagai konsesentrasi utama dikarenakan bakteri tumbuh di semua tingkatan konsentrasi, sehingga eksplorasi dilanjutkan dengan konsentrasi diatas 1,5%.

Eksplorasi berikutnya dilakukan pada konsentrasi 1,5%, 2,5%, 3,5%, 4,5%, 5,5% dan 6,5%. Pada konsentrasi tersebut tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi manapun, sehingga eksplorasi ini tidak dapat dijadikan penelitian utama. Sehingga dilanjutkan eksplorasi dengan menggunakan

konsentrasi dibawah 1,5%. Eksplorasi berikutnya dilakukan pada konsentrasi 1%, 1,2%, 1,4%, 1,6%, 1,8%, 2%, 2,2%, 2,4%, 2,6% dan 2,8%. Pada konsentrasi tersebut tidak memenuhi syarat sebagai penelitian utama karena pertumbuhan bakteri hilang secara signifikan antara konsentrasi 1,6% dan 1,8%, sehingga penelitian dilanjutkan dengan konsentrasi yang dirapatkan diatas 1,8%.

Eksplorasi berikutnya dilakukan pada konsentrasi 1,8%, 1,82%, 1,84%, 1,86%, 1,88%, 1,9%, 1,92%, 1,94%, 1,96%, dan 1,98%. Pada konsentrasi tidak memenuhi syarat sebagai konsentrasi utama dikarenakan bakteri tumbuh di semua tingkatan konsentrasi, sehingga eksplorasi dilanjutkan dengan konsentrasi diatas 1,98%. Karena telah melakukan beberapa kali eksplorasi dengan menggunakan konsentrasi kecil namun tidak ditemukan konsentrasi utama, maka eksplorasi selanjutnya dilanjutkan dengan melebarkan rentang konsentrasi yang dicoba yaitu konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 90% dan 100%. Pada konsentrasi tersebut tidak memenuhi syarat sebagai penelitian utama karena pertumbuhan bakteri hilang secara signifikan antara konsentrasi 10% dan 20%, sehingga penelitian dilanjutkan dengan konsentrasi yang dirapatkan antara 10% hingga 20%.

Eksplorasi berikutnya dilakukan pada konsentrasi 4%, 6%, 8%, 9%, 10%, 12%, 14%, dan 16%. Pada konsentrasi tidak memenuhi syarat sebagai konsentrasi utama dikarenakan bakteri tumbuh di semua tingkatan konsentrasi, sehingga eksplorasi dilanjutkan dengan konsentrasi diatas 16%. Eksplorasi berikutnya dilakukan pada konsentrasi 14%, 16%, 18%, 20%, 22%, 24%, dan 26%. Pada konsentrasi tersebut tidak memenuhi syarat sebagai penelitian utama karena pertumbuhan bakteri hilang secara signifikan antara konsentrasi 16% dan

18%, sehingga selanjutnya akan dilakukan eksplorasi menggunakan konsentrasi dibawah 16%.

Eksplorasi berikutnya dilakukan pada konsentrasi 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, dan 21%. Pada eksplorasi kali ini, dapat dijadikan sebagai konsentrasi utama karena terjadi penurunan jumlah bakteri yang tumbuh pada media NAP. Sehingga konsentrasi 12% hingga 16% dapat diulang sebanyak 4 kali

4.9.5 Uji Kepekaan Antimikroba Ekstrak Daun *Uncaria gambir* Metode Tube Dilution

1. Menyiapkan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan konsentrasi sebesar 10^6 bakteri/ml.
2. Disediakan 7 tabung reaksi masing-masing dibuat kadar ekstrak daun *Uncaria gambir* 12%, 13%, 14%, 15%, 16% dan 2 tabung kontrol yaitu 1 kontrol bakteri dan 1 kontrol bahan.
3. Tabung reaksi 1 diisi dengan 1 ml ekstrak daun *Uncaria gambir* sehingga konsentrasi ekstrak daun *Uncaria gambir* adalah 100% sebagai kontrol negatif.
4. Tabung reaksi 2 diisi dengan 0,12 ml ekstrak daun *Uncaria gambir* + 0,88 ml air suling steril, sehingga konsentrasi ekstrak daun *Uncaria gambir* adalah 12%
5. Tabung reaksi 3 diisi dengan 0,13 ml ekstrak daun *Uncaria gambir* + 0,87 ml air suling steril, sehingga konsentrasi ekstrak daun *Uncaria gambir* adalah 13%

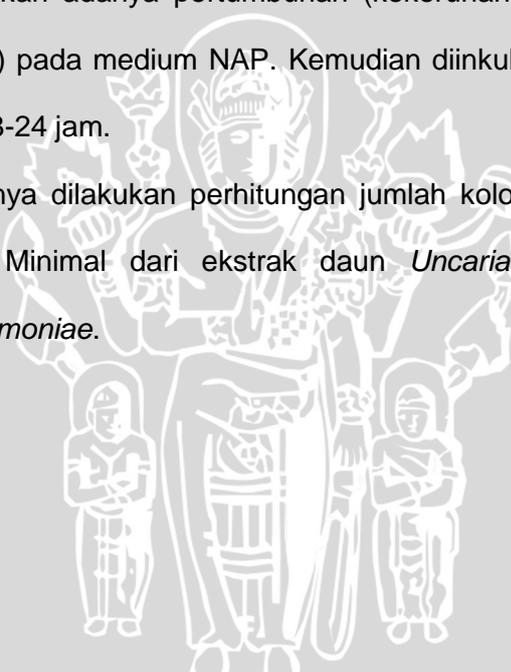
6. Tabung reaksi 4 diisi dengan 0,14 ml ekstrak daun *Uncaria gambir* + 0,86 ml air suling steril, sehingga konsentrasi ekstrak daun *Uncaria gambir* adalah 14%
7. Tabung reaksi 5 diisi dengan 0,15 ml ekstrak daun *Uncaria gambir* + 0,85 ml air suling steril, sehingga konsentrasi ekstrak daun *Uncaria gambir* adalah 15%
8. Tabung reaksi 6 diisi dengan 0,16 ml ekstrak daun *Uncaria gambir* + 0,84 ml air suling steril, sehingga konsentrasi ekstrak daun *Uncaria gambir* adalah 16%
9. Tabung reaksi 7 diisi 1 ml Aquades + 1 ml bakteri *Klebsiella pneumoniae* untuk kontrol positif.
10. Tabung reaksi 2-5 ditambahkan dengan bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan konsentrasi 10^6 bakteri/ml dalam tabung, masing-masing sebanyak 1 ml. Sehingga kadar ekstrak daun *Uncaria gambir* dalam setiap tabung reaksi seperti pada tabel 4.1 berikut.

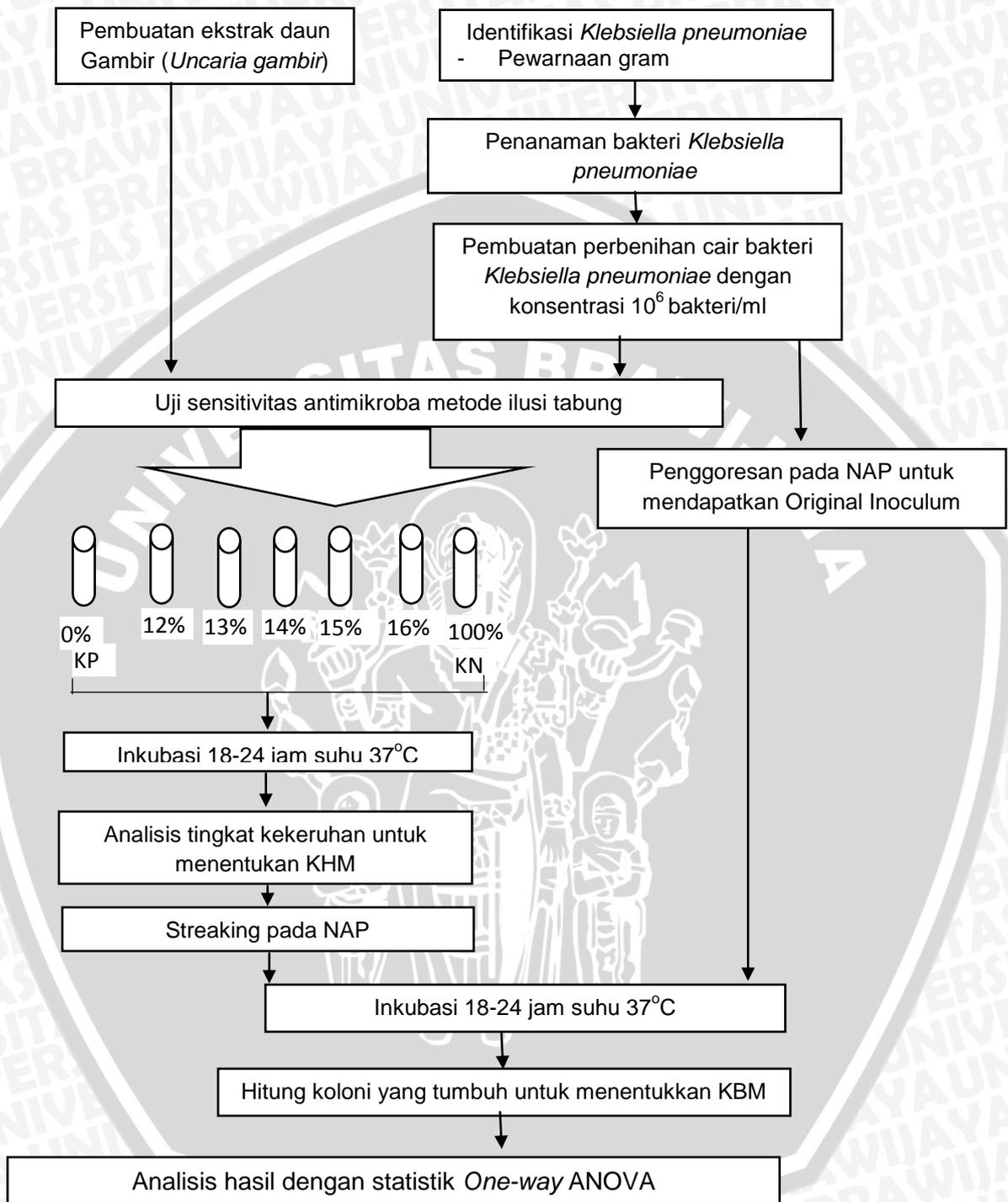
Tabel 4.1 Persiapan Konsentrasi Ekstrak Daun Gambir (*Uncaria gambir*)

No.	Tabung 1	Tabung 2	Tabung 3	Tabung 4	Tabung 5	Tabung 6	Tabung 7
Konsentrasi	Kontrol bahan	12%	13%	14%	15%	16%	Kontrol bakteri
Volume bahan (ml)	2	0,12	0,13	0,14	0,15	0,16	0
Volume air suling (ml)	0	0,88	0,87	0,86	0,85	0,84	1
Perbenihan	0	1	1	1	1	1	1

bakteri (ml)							
--------------	--	--	--	--	--	--	--

10. Tabung reaksi 1-6 diinkubasi pada suhu 37°C – $37,5^{\circ}\text{C}$ selama 18-24 jam.
11. Keesokan harinya dilakukan pencatatan terhadap tabung yang mulai terjadi kekeruhan. Kadar terendah pada tabung yang menunjukkan tidak adanya kekeruhan merupakan KHM.
12. 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.
13. Keesokan harinya dilakukan perhitungan jumlah koloni, ditentukan nilai Kadar Bunuh Minimal dari ekstrak daun *Uncaria gambir* terhadap *Klebsiella pneumoniae*.





Gambar 4.1 Alur Keria Penelitian

KP : Kontrol Positif, KN : Kontrol Negatif, NAP : Nutrient Agar Plate, KHM : Kadar Hambat Minimal, KBM : Kadar Bunuh Minimal

4.9.5 Pengumpulan dan Analisa Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari hasil penghitungan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* pada NAP yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Data tersebut kemudian dimasukkan dalam tabel dibawah ini.

Tabel 4.2 Hasil Penghitungan Jumlah Koloni *Klebsiella pneumoniae*

Konsentrasi	Jumlah koloni (Pengulangan)				Jumlah Koloni	Rerata Koloni	Standard Deviasi
	I	II	III	IV			

Seluruh teknik pengolahan data hasil penelitian akan dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan software *Statistical Product and Service Solutions 17 (SPSS 17) for windows* dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

Pada penelitian ini, variabel yang akan dianalisis yaitu jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* yang dihasilkan pada NAP berdasarkan tingkat konsentrasi ekstrak daun Gambir (*Uncaria gambir*). Untuk mengetahui apakah terdapat keragaman antar perlakuan dilakukan uji hipotesis komparatif. Metode

yang dapat digunakan, yaitu uji parametrik *One-way ANOVA* (*Analysis of Variance*) , analisa regresi, dan uji korelasi dengan alternatifnya yaitu uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*.

