

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan studi eksperimental laboratorik *in vitro* dengan rancangan *True experiment-post test only control group design* untuk membuktikan efek antimikroba ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Escherichia coli*. Untuk mengetahui hal itu, akan dilakukan dengan menggunakan dua metode yaitu metode dilusi tabung (*Tube Dilution Test*) untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan tahap penggosokan pada media NAP (*Natrium Agar Plate*) untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

4.2 Sampel dan Besar Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Escherichia coli* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah perlakuan dengan konsentrasi ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis yang diberikan ada lima, satu kontrol kuman, dan satu kontrol bahan. Jumlah pengulangan yang dilakukan dapat diketahui dengan rumus sebagai berikut (Lukito, 1998).

$$p(n-1) \geq 16$$

$$7(n-1) \geq 16$$

$$7n-8 \geq 16$$

$$7n \geq 24$$

$$n \geq 3,4$$

keterangan : n = jumlah pengulangan



p = jumlah perlakuan

Berdasarkan rumusan diatas, maka dalam penelitian ini diperlukan sedikitnya tiga kali pengulangan. Peneliti menggunakan empat kali pengulangan pada masing-masing perlakuan untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Februari sampai dengan Mei 2015.

4.4 Identifikasi variabel

4.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) 0%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, dan 100%. Konsentrasi tersebut didapatkan melalui eksplorasi (penelitian pendahuluan). (Catatan: hasil dari penelitian pendahuluan dapat dilihat pada lampiran).

4.4.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kekeruhan yang dapat diamati dengan menggunakan *Tube Dilution Test* dan jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* yang tumbuh pada medium NAP.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

1. Alat
 - a. Tabung reaksi
 - b. Ose

- c. Lampu spiritus atau Bunsen
 - d. Inkubator
 - e. Spektrofotometer
 - f. Korek api
2. Bahan
- a. *Escherichia coli*
 - b. Medium EMB (*Eosin Methylene Blue*)

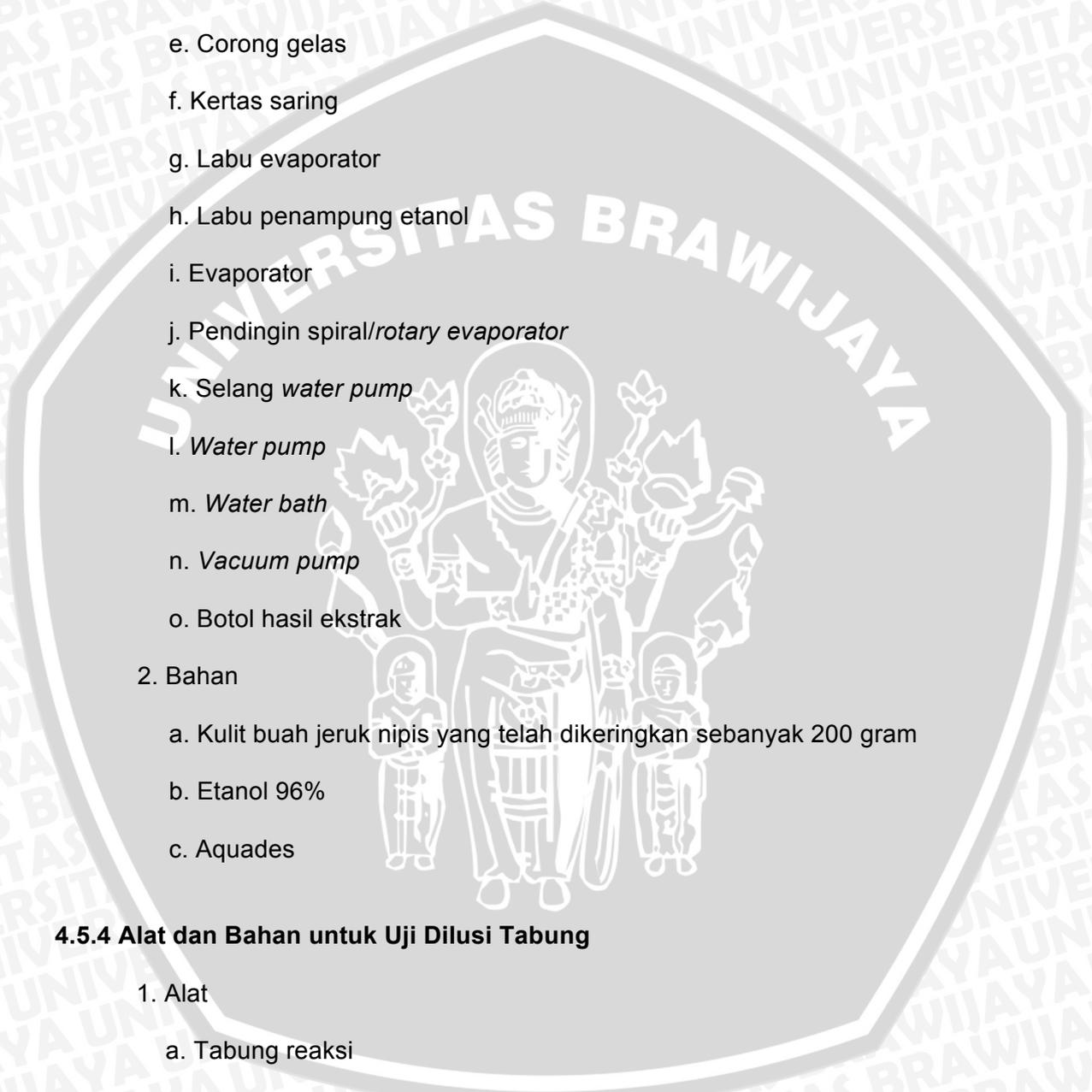
4.5.2 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram

1. Alat
 - a. *Object glass* dan kaca penutup
 - b. Lampu spiritus atau Bunsen
 - c. Ose
 - d. Mikroskop
 - e. Minyak emersi
 - f. Korek api
2. Bahan
 - a. Suspensi bakteri dari *Muller Hinton Broth*
 - b. Bahan pewarnaan Gram : Kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin
 - c. Aquades steril
 - d. Kertas penghisap atau tissue

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Buah Jeruk

Nipis

1. Alat
 - a. Oven

- 
- b. Blender
 - c. Timbangan
 - d. 2 buah gelas Erlenmeyer
 - e. Corong gelas
 - f. Kertas saring
 - g. Labu evaporator
 - h. Labu penampung etanol
 - i. Evaporator
 - j. Pendingin spiral/*rotary evaporator*
 - k. Selang *water pump*
 - l. *Water pump*
 - m. *Water bath*
 - n. *Vacuum pump*
 - o. Botol hasil ekstrak
2. Bahan
- a. Kulit buah jeruk nipis yang telah dikeringkan sebanyak 200 gram
 - b. Etanol 96%
 - c. Aquades

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Tabung

1. Alat
 - a. Tabung reaksi
 - b. Pipet steril ukuran 1 ml dan 10 ml
 - c. Karet penghisap
 - d. Inkubator
 - e. *Vortex*

- f. Bunsen
- g. Korek api
- h. *Object glass*
- i. Plate kosong dan steril
- j. Alat penjepit (skalpel) steril
- k. *Colony counter*
- l. Kapas
2. Bahan
 - a. Ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis
 - b. Suspensi bakteri dari *MH Broth*

4.6 Identifikasi Ulang Bakteri *Escherichia coli*

4.6.1 Pewarnaan Gram (Baron and Finegold, 1994)

Pada hari kedua, sampel bakteri *Escherichia coli* diidentifikasi dengan pewarnaan Gram. Kemudian beberapa ose ditanam pada medium EMB dan diinkubasi pada suhu 37°–37,5°C selama 18-24 jam. Prosedur pewarnaan Gram:

- a. Satu ose aquades steril ditetaskan pada *object glass*, kemudian diambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan aquades yang telah ditetaskan di atas *object glass*. Kemudian dibiarkan kering di udara.
- b. Suspensi bakteri yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkannya di atas api beberapa kali dan sediaan siap untuk diwarnai.

- c. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama satu menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.
- d. Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit, lalu lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian alkohol segera dibuang dan dibilas dengan air.
- f. Sediaan ditetesi safranin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- g. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat di bawah mikroskop.

4.6.2 *Microbact* 12A/E-24E (Baron and Finegold, 1994)

- a. Sebelum ditentukan menggunakan 12A/12E atau 24E, koloni bakteri dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negatif menggunakan *Microbact system* 12A/12E saja, sedangkan jika hasil oksidasenya positif maka menggunakan 24E.
- b. Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 5 mL NaCl 0,9% pada tabung reaksi steril dan di-*vortex* hingga homogen.
- c. Larutan bakteri yang telah homogen ditetaskan ke dalam sumur *Microbact* sebanyak 100 IU (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

- d. Pada *Microbact* sumur 1 – 6 dilakukan penilaian hasil positif atau negatif terhadap kandungan yang tercantum pada *microbact* tersebut.
- e. *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan 2 tetes reagen Nitrat A dan B pada sumur 7, pada sumur nomor 8 dengan *Indol Kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak satu tetes.
- f. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*.
- g. Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*).
- h. Nama spesies bakteri dilihat dengan *software microbact system* di komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat.

4.6.3 Perbenihan

Pada hari kedua, koloni bakteri *Esherichia coli* ditanam pada *MH Broth* dan diinkubasikan pada suhu 37°–37,5° C selama 18-24 jam.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Preparasi Uji Bakteri

Perbenihan cair bakteri dari *MH broth* dinilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada gelombang cahaya 610 nm. Melalui nilai absorbansi dapat diperkirakan jumlah kuman pada perbenihan cair dengan kalibrasi yang

sudah diketahui yaitu absorbansi 0,1 ekuivalen dengan jumlah kuman sebesar 10^8 CFU/ml. Dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan:

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometer)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

N_2 = Optical density (0,1= setara dengan 10^8 /ml)

N_1 sama dengan nilai absorbansi yang didapat sedangkan N_2 adalah absorbansi 0,1 yang ekuivalen dengan jumlah kuman 10^8 CFU/ml. V adalah volume suspensi kuman. Sehingga diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /ml sebanyak 10 ml. Konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml tersebut diencerkan dengan menambahkan 1 ml perbenihan (10^8 CFU/ml) ke dalam 9 ml *MH broth* untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10^7 CFU/ml. Kemudian dilakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1 ml perbenihan cair (10^7 CFU/ml) untuk ditambahkan pada 9 ml *MH broth* sehingga akhirnya didapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu sebesar 10^6 CFU/ml. Kini suspensi bakteri telah siap digunakan untuk penelitian (Susilowati, 2007).

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Buah Jeruk Nipis

a. Proses Ekstraksi (Metode Maserasi)

Sebanyak 2 kg kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dikeringkan dan dicuci bersih, kemudian dipotong kecil-kecil lalu dioven dengan suhu 40^0 - 60^0 C sehingga kandungan airnya berkurang (Tiwari *et al*, 2011). Setelah kering dan

kandungan airnya berkurang, diperoleh kulit buah jeruk nipis dengan berat sekitar 200-250 gram. Kulit buah jeruk nipis tersebut dihaluskan dengan blender sehingga bentuknya menyerupai bubuk, kemudian ditimbang dan diambil bubuk buah jeruk nipis sebanyak 200 gr dan dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1L lalu direndam dengan etanol 96% sampai volume 1L, kemudian dikocok sampai benar-benar tercampur, kurang lebih 30 menit dan diamkan satu malam sampai mengendap. Setelah satu malam, diambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif yang sudah terambil, proses perendaman ini dilakukan sampai sebanyak 3 kali dan dilanjutkan dengan proses evaporasi (Rita dkk, 2008).

b. Proses Evaporasi

Evaporator set dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan $30-40^{\circ}$ terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin. Kemudian air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui selang plastik.

Hasil maserasi dimasukkan dalam labu evaporasi sedangkan *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan. Pemanas aquades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih sampai dengan suhu 78° C (sesuai titik didih etanol 96%) dan etanol 96% mulai menguap (Sari, 2012).

Hasil penguapan etanol 96% dikondensasikan menuju labu penampung etanol 96% sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.

Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian dioven selama kurang lebih 1,5 sampai 2 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa. Setelah itu kita dapatkan hasil ekstraksi sebanyak 50 ml.

4.7.3 Pengujian Efek Antimikroba Ekstrak Etanol Kulit Buah Jeruk Nipis

Rangkaian uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis sebagai berikut:

1. Disediakan 7 tabung steril, 5 tabung sebagai uji antimikroba, 1 tabung sebagai kontrol bakteri, dan 1 tabung sebagai kontrol bahan.

2. Ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis (dalam bentuk cairan) dimasukkan pada tabung reaksi steril masing-masing dengan konsentrasi

Tabung 1: 0 ml

Tabung 5: 0,9 ml

Tabung 2: 0,75 ml

Tabung 6: 0,95 μ l

Tabung 3: 0,8 ml

Tabung 7: 1 ml

Tabung 4: 0,85 ml

Aquades steril dimasukkan pada masing-masing tabung, yaitu:

Tabung 1: 1 ml

Tabung 5: 0,1 ml

Tabung 2: 0,25 ml

Tabung 6: 0,05 ml

Tabung 3: 0,2 ml

Tabung 7: 0 ml

Tabung 4: 0,15 ml

3. Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung konsentrasi, masing-masing sebanyak 1 ml. Sehingga konsentrasi akhir ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis adalah:

Tabung 1: 0%

Tabung 5: 90%

Tabung 2: 75%

Tabung 6: 95%

Tabung 3: 80%

Tabung 7: 100%

Tabung 4: 85%

Menyiapkan perbenihan cair perbenihan bakteri dengan konsentrasi bakteri 1×10^6 CFU/ml.

4. Kontrol negatif bakteri (0%) digoreskan pada NAP sebagai *original inoculum*, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C .
5. Masing-masing tabung di-*vortex* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C .
6. Semua tabung dikeluarkan dari inkubator pada hari kedua. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung.
7. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada NAP. Kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C .
8. Data KBM didapatkan dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter* pada hari ketiga. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada NAP atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di OI.

4.8 Definisi Operasional

- a. Isolat bakteri *Escherichia coli* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- b. Kulit buah jeruk nipis yang digunakan diambil langsung di salah satu perkebunan di Kota Batu, Malang.

- c. Jenis kulit buah jeruk yang akan digunakan pada penelitian ini adalah kulit buah jeruk nipis.
- d. Pembuatan ekstrak kulit buah jeruk nipis menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.
- e. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hal ini ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada larutan yang berisi ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis dan suspensi bakteri tersebut dalam tabung setelah diinkubasikan 18-24 jam (Finegold *et al*, 1986). Definisi ini tidak berlaku jika ada reaksi antara bahan aktif ekstrak dengan media *nutrient Broth* yang menyebabkan kekeruhan pada seluruh tabung.
- f. Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi minimal ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hal ini ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni pada medium NAP setelah diinkubasikan selama 18-24 jam yang dibandingkan dengan kontrol positif.
- g. Kontrol kuman adalah konsentrasi ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis 0% yang digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain. Kontrol kuman berasal dari larutan bakteri uji yang telah distandarisasi dengan standar Mc Farland 0,5 sebanyak 2 ml.
- h. Kontrol bahan digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril. Kontrol bahan dibuat dengan cara mencampurkan antara ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis sebanyak 1 ml dengan aquades sebanyak 1 ml.

- i. *Original inoculum* adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi, dan digunakan untuk mencari kategori KBM.

4.9 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan variabel numerik dengan satu faktor yang ingin diketahui yaitu perbedaan jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* yang dihasilkan pada media NAP berdasarkan faktor perlakuan pemberian ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis. Uji statistik yang digunakan adalah uji *One way ANOVA* dengan program SPSS 13, dengan taraf signifikansi 0,05.

Langkah-langkah dalam uji *One way ANOVA* adalah sebagai berikut:

1. Memeriksa syarat uji ANOVA untuk > 2 kelompok yaitu:
 - Sebaran data harus normal (normalitas)
 - Varian data harus sama (homogenitas)
2. Untuk mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* maka digunakan uji statistik Regresi Linier. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for windows versi 13,0 (Dahlan, 2008).