

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah *True Experimental – Post Test only Control Group Design* dengan menggunakan metode difusi cakram untuk mengetahui zona hambat ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) terhadap *Staphylococcus aureus* kode isolat 100-SV. Ekstrak kayu secang didapat dengan cara ekstraksi metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus - Oktober 2015.

4.3 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus aureus* kode isolat 100 berasal dari swab vagina yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Pengulangan

Untuk menghitung pengulangan dengan rumus (Lukito, 1998).

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

Keterangan: n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan

Pada penelitian ini akan menggunakan 7 konsentrasi ekstrak etanol kayu secang, maka pengulangannya:

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

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

Jadi, pengulangan yang harus dilakukan pada penelitian ini adalah minimal 4.

Pada penelitian ini, pengulangan dilakukan sebanyak 7 kali.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kayu secang yang dibuat dalam berbagai konsentrasi tertentu.

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah diameter zona hambat yang tampak di sekitar kertas cakram.

4.6 Definisi Operasional

Dalam penelitian ini ada beberapa hal yang perlu diketahui yaitu:

1. Simplisia kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) dibeli dari Balai Materia Medica Batu.
2. Ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) dibuat melalui ekstraksi metode maserasi dengan pelarut etanol 96% di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

- c. Isolat *S.aureus* yang digunakan berjumlah 1 isolat dengan kode isolat 100-SV dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Isolat *S.aureus* 100-SV berasal dari spesimen swab vagina pasien ke 100 yang melakukan kultur dan teridentifikasi *S.aureus* di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Saiful Anwar Malang.
- d. Zona hambat adalah zona bening yang terbentuk di sekitar cakram dan termasuk diameter kertas cakram. Diameter kertas cakram sebesar 6 mm. Diameter zona hambat diukur dalam satuan mm (millimeter) dengan menggunakan jangka sorong. Semakin besar zona hambat maka semakin peka bakteri tersebut terhadap ekstrak etanol kayu secang

4.7 Instrumen Penelitian

4.7.1 Alat dan bahan pembuatan ekstrak etanol batang kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.)

4.7.1.1 Alat

timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu penampung etanol, evaporator, *rotary evaporator*, *water pump*, *water bath*, aluminium foil, kulkas, gelas ukur, *vacum pump*.

4.7.1.2 Bahan

Serbuk kayu secang, etanol 96%, akuades, botol hasil ekstrak.

4.7.2 Alat dan Bahan untuk Uji Fitokimia

4.7.2.1 Alat

timbangan, *water heater*, tabung reaksi, lempeng tetes, pipet, kertas saring, gelas ukur.

4.7.2.2 Bahan

ekstrak etanol kayu secang, asam klorida, air suling, serbuk Mg, etanol, FeCl₃, NaOH, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner.

4.7.3 Alat dan Bahan untuk Difusi Cakram

4.7.3.1 Alat

Cawan petri, pinset, kapas lidi, inkubator, label, penggaris.

4.7.3.2 Bahan

Hasil ekstraksi kayu secang, bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁸ CFU/ml, blank disc, agar Muller Hinton, aquades.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pembuatan ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan* L)

4.8.1.1 Proses Ekstraksi

- 1) Serbuk kayu secang ditimbang sebanyak 100 gram dengan menggunakan timbangan dan masukkan dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
- 2) Kemudian rendam serbuk kayu secang dengan larutan etanol 96% hingga volume 1000 ml pada gelas erlenmeyer dan ditutup aluminium foil.
- 3) kemudian dishaker atau dikocok sampai benar-benar tercampur.
- 4) Diamkan selama 24 jam sampai mengendap.
- 5) Saring sampel dengan kertas saring dan tampung pada gelas ukur.

Lakukan remaserasi pada ampas dengan cara yang sama kemudian dievaporasi.

4.8.1.2 Proses Evaporasi

- 1) Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu evaporasi.

- 2) Memasang labu evaporasi pada evaporator.
- 3) Mengisi *water bath* dengan air sampai penuh.
- 4) Memasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath*, kemudian menyambungkan dengan aliran listrik.
- 5) Membiarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- 6) Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung.
- 7) Didapatkan hasil ekstrak berbentuk kental dan masukkan dalam botol hasil ekstraksi.
- 8) Simpan dalam lemari pendingin (*freezer*).

4.8.2. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Kayu Secang

4.8.2.1 Uji Flavonoid

- 1) Memasukkan serbuk Mg 5 mg dan 1 ml HCl pekat ke dalam 0.5 gram ekstrak etanol kayu secang.
- 2) Menambahkan etanol lebih kurang $\frac{1}{2}$ dari larutan.
- 3) Mengocok dengan kuat dan membiarkan larutan hingga memisah.
- 4) Mengamati perubahan yang terjadi.
- 5) Jika terbentuk warna merah orange dalam etanol menandakan adanya flavonoid (Yunita *et al.*, 2010).

4.8.2.2 Uji Saponin

- 1) Timbang ekstrak sebanyak 0,5 gram.
- 2) Masukkan ke dalam tabung reaksi.
- 3) Tambahkan 10 ml air panas, didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik.

- 4) Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Tarigan *et al.*, 2008).

4.8.2.3 Uji Tanin

- 1) Timbang ekstrak sebanyak 0,5 gram.
- 2) Dididihkan dalam tabung reaksi yang berisi 20 ml air, kemudian disaring.
- 3) Tambahkan beberapa tetes FeCl 0,1% pada filtrate dan hasilnya diamati.
- 4) Uji tanin dalam sampel positif apabila hasil menunjukkan warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman (Tarigan *et al.*, 2008).

4.8.2.4 Uji Alkaloid

- 1) Timbang ekstrak sebanyak 0,5 gram.
- 2) Tambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling.
- 3) Panaskan di atas pemanas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring.
- 4) Filtrat yang diperoleh di pakai untuk test alkaloida sebagai berikut :
 - a) Filtrat sebanyak 3 tetes ditambah dengan 2 tetes pereaksi Dragendorff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga.
 - b) Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes larutan Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.
 - c) Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Wagner, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat (Tarigan *et al.*, 2008).

4.8.3 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

Identifikasi yang dilakukan meliputi pewarnaan Gram, uji katalase, dan uji koagulase.

4.7.3.1 Prosedur Pewarnaan Gram

Langkah-langkah pewarnaan Gram adalah sebagai berikut:

- 1) Gelas obyek dibersihkan dengan menggunakan kapas steril. Lewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak, lalu biarkan dingin.
- 2) Teteskan satu tetes *aquadest* steril pada gelas obyek.
- 3) Ambil sedikit koloni *S. aureus* yang tumbuh pada medium agar dengan menggunakan ose yang sudah disterilkan dengan pembakaran. Lalu disuspensikan dengan satu tetes aquades steri yang sudah ditetaskan terlebih dahulu pada gelas obyek.
- 4) Tuangi sediaan dengan kristal violet selama 1 menit, kemudian buang dan bilas dengan air.
- 5) Tuangi sediaan dengan lugol selama 1 menit, kemudian buang dan bilas dengan air.
- 6) Tuangi sediaan dengan alkohol 96% sampai warna luntur sekitar 5-10 detik, kemudian buang dan bilas dengan air.
- 7) Tuangi sediaan dengan safranin selama 30 detik, kemudian buang dan bilas dengan air.
- 8) Keringkan sediaan dengan kertas penghisap.
- 9) Lihat di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 100x. hasil positif: *S. aureus* berbentuk bulat tercat ungu (Gram positif) (Dzen *et al.*, 2013).

4.8.3.2 Tes Katalase

- 1) Sediakan suspensi bakteri pada gelas obyek.
- 2) Tambahkan larutan H₂O₂ 3% sebanyak 1-2 tetes atau secukupnya pada obyek gelas.
- 3) Amati ada tidaknya gelembung. Bakteri *Staphylococcus* menunjukkan terbentuknya gelembung-gelembung udara pada obyek gelas.

4.8.3.3 Tes Koagulase

- 1) Ambil dan bersihkan gelas obyek.
- 2) Pada gelas obyek berikan 1 tetes aquades steril dan tambahkan 1 koloni bakteri, tambahkan 1 tetes lateks.
- 3) Perhatikan adanya gumpalan putih (*clumping*). Apabila tampak gumpalan-gumpalan putih maka bakteri uji merupakan *Staphylococcus aureus* koagulase positif.

4.8.4 Pembuatan *Staphylococcus aureus* 10⁸ CFU/ml

Suspensi bakteri uji untuk difusi cakram harus sama dengan 0.5 McFarland standard, yaitu 1x10⁸ CFU/ml. Pembuatan *Staphylococcus aureus* 10⁸ CFU/ml dapat dilakukan dengan cara:

- 1) Beberapa koloni *S. aureus* dipindahkan ke tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth* (NB) dengan menggunakan ose.
- 2) Tabung reaksi lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24jam.
- 3) Suspensi bakteri *S. aureus* pada medium *Nutrient broth* dispektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm sehingga diketahui kepadatan bakterinya (OD = *Optical Density*).

- 4) Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml yang setara dengan *Optical Density* (OD) = 0.1 (Murray *et al.*, 1999), maka dilakukan perhitungan sebagai berikut:

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

Keterangan:

N1: Nilai Absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V1 : Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N2 : Optical Density = 0.1 (setara dengan 10^8 CFU/ml)

V2 : Volume suspensi bakteri uji (10ml)

Dari perhitungan tersebut diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10ml.

4.8.5 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L)

1. 100% (b/v) = 0.5 gram ekstrak + 0.5 ml aquadest
2. 50% (b/v) = 0.5 gram ekstrak + 1 ml aquadest
3. 25% (b/v) = 0.5 ml ekstrak 50% + 0.5 ml aquadest
4. 12,5% (b/v) = 0.5 ml ekstrak 25% + 0.5 ml aquadest
5. 6,25% (b/v) = 0.5 ml ekstrak 12,5% + 0.5 ml aquadest
6. 3,125%(b/v) = 0.5 ml ekstrak 6,25% + 0.5 ml aquadest
7. 0% (b/v) = 0.5 ml aquadest

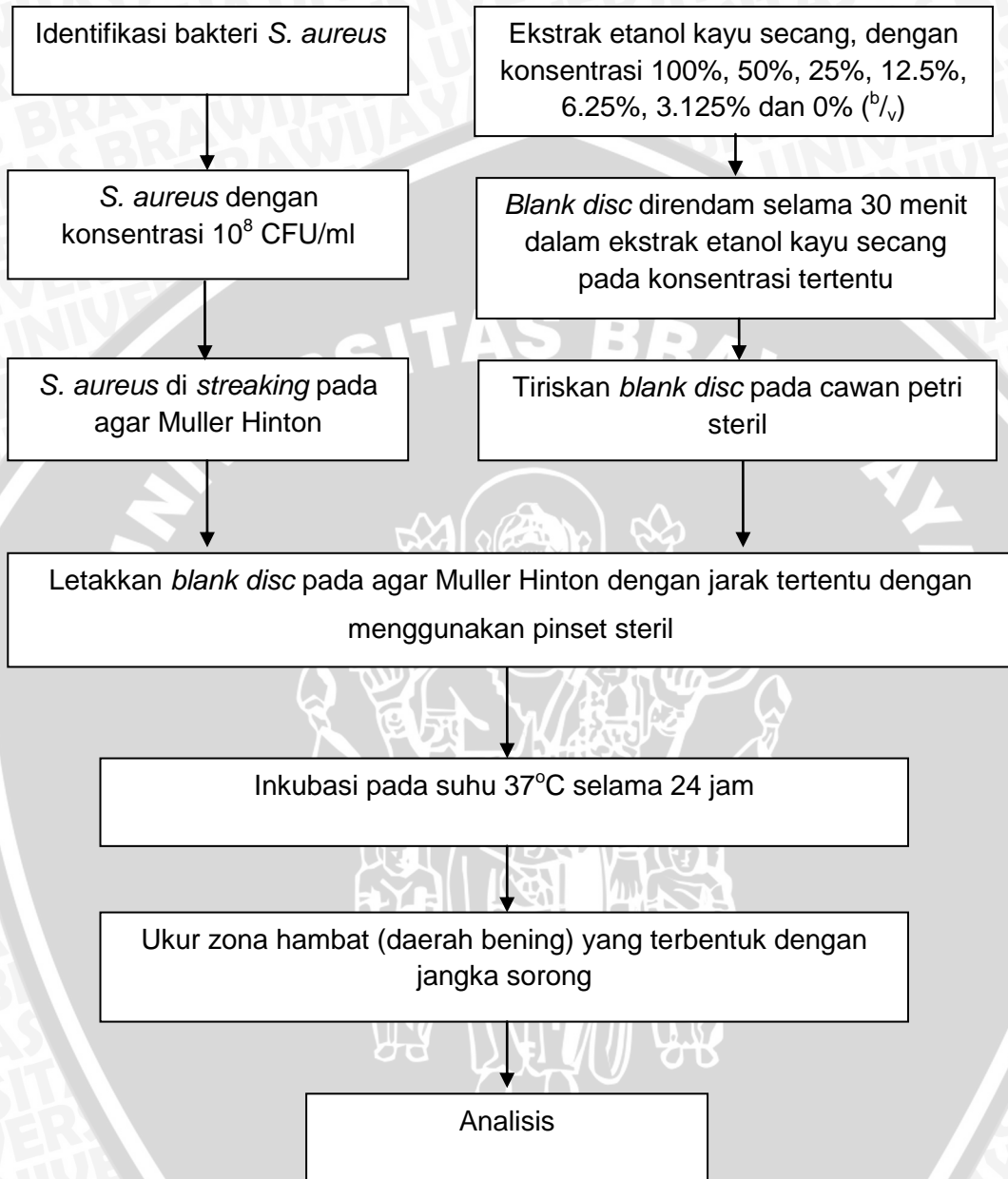
4.8.6 Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L) terhadap *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi cakram

Sebelum memulai penelitian, perlu dilakukan penelitian pendahuluan. Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk menentukan dosis yang akan digunakan pada penelitian utama.

Berikut merupakan rangkaian uji kepekaan antimikroba ekstrak kayu secang dengan metode difusi cakram (Selvamohan *et al.*, 2012; Hudzicki, 2013):

- 1) Siapkan alat dan bahan.
- 2) Siapkan cawan petri steril sebanyak tujuh buah.
- 3) Tuang 20 ml agar Muller Hinton pada cawan petri, tunggu hingga mengeras.
- 4) Buat larutan ekstrak dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 0%.
- 5) Rendam *blank disc* selama 30 menit pada larutan ekstrak etanol kayu secang dengan konsentrasi tersebut.
- 6) Setelah 30 menit, ambil *blank disc* dengan pinset kemudian tiriskan di cawan petri steril kurang lebih 30 menit.
- 7) *Streaking* bakteri diatas agar Muller Hinton dengan menggunakan kapas lidi hingga tersebar di seluruh permukaan.
- 8) Kemudian letakkan *blank disc* yang telah ditiriskan pada media agar Muller Hinton dengan jarak tertentu dengan menggunakan pinset steril.
- 9) Cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu 37°C.
- 10) Ukur diameter zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram dengan menggunakan penggaris dalam satuan millimeter.

4.8.7 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

4.9 Analisis Data

Data diameter zona hambat bakteri dari 7 kali percobaan dianalisis dengan menggunakan uji statistik One way ANOVA dan uji statistik korelasi-regresi.

Uji statistik *One Way ANOVA* digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol kayu secang terhadap zona hambat pertumbuhan *S. aureus*. Uji statistik korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui apakah terdapat hubungan konsentrasi ekstrak etanol kayu secang terhadap zona hambat pertumbuhan *S. aureus* dan untuk mengetahui seberapa besar hubungan tersebut serta untuk mengetahui apakah peningkatan berbagai konsentrasi akan mengakibatkan peningkatan terhadap zona hambat pertumbuhan *S. aureus* atau tidak terjadi peningkatan.

Syarat menggunakan uji statistik *One Way ANOVA* adalah data memiliki distribusi yang normal yaitu bila nilai signifikansi lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) dan mempunyai varian data yang homogen yaitu bila nilai signifikansi lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Oleh karena itu, sebelum dilakukan uji statistik *One Way ANOVA* perlu dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan *Levene Statistic*. Apabila syarat ANOVA tidak terpenuhi, maka dapat dilakukan uji statistik *Kruskall-Wallis*.