

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *laboratory experimental* – *post test only control group design* dengan menggunakan metode difusi sumuran. Proses ekstraksi daun tanaman tahi ayam (*Lantana camara* L.) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Besarnya konsentrasi yang digunakan ditetapkan melalui penelitian pendahuluan.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Proses ekstraksi maserasi daun tanaman tahi ayam (*Lantana camara* L.) dengan etanol 96% dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, pada bulan Juni 2016, untuk memperoleh ekstrak etanol daun tanaman tahi ayam. Proses pengujian ekstrak etanol daun tanaman tahi ayam terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dengan waktu penelitian yaitu bulan Juni sampai dengan Agustus 2016.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bakteri bakteri *Staphylococcus aureus* yang berasal dari pus penderita infeksi *Staphylococcus aureus* yang merupakan koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Adapun kode isolat yang digunakan adalah P 257.

4.4 Jumlah Sampel

Penentuan banyaknya pengulangan pada penelitian ini menggunakan rumus (Lukito, 1998):

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

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

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

Keterangan:

n : jumlah pengulangan

p : jumlah perlakuan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka banyaknya pengulangan uji antibakteri ekstrak etanol daun tahi ayam terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4 pengulangan.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun tanaman tahi ayam 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% v/v.

4.5.2 Variabel Dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah lebar diameter zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* yang terbetuk pada media MHA.

4.6 Definisi Operasional

1. Konsentrasi bakteri yang dituang atau dicampur dalam biakan MHA adalah 10^8 CFU/ ml dari biakan cair segar yang diinkubasi selama 18 - 24 jam.
2. Kelompok perlakuan merupakan hasil biakan bakteri *Staphylococcus aureus* kode isolat P 257 yang dicampurkan pada medium pertumbuhan MHA dan diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol daun tahi ayam dan aquades sebagai kontrol.
3. Kontrol bakteri adalah hasil biakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang dicampurkan pada medium pertumbuhan tanpa diberi perlakuan menggunakan ekstrak etanol daun tahi ayam. Kontrol bakteri difungsikan untuk membedakan pertumbuhan bakteri secara normal dengan yang diberikan perlakuan.
4. Zona hambat merupakan area di sekitar lubang sumuran yang tidak terdapat pertumbuhan bakteri, dimana menunjukkan bahan antibakteri dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri. Semakin besar zona hambat ekstrak etanol daun tahi ayam menunjukkan bahwa efektivitas daya antibakterinya semakin bagus. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm).

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Tahi Ayam

Alat : cawan porselin steril untuk menampung hasil ekstraksi, oven, timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas, labu evaporator, labu penampung etanol, *rotary evaporator*, *water pump*, *water bath*, dan *vacuum pump*.

Bahan : bubuk kering daun tahi ayam (*Lantana camara* L.) dan etanol 96%.

4.7.2 Uji Kandungan Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Tahi Ayam

Alat : Tabung reaksi, kertas *label*, penangas air, pipet tetes, dan cawan porselin.

Bahan: Ekstrak etanol daun tanaman tahi ayam, reagensia Dragendorff, reagensia Mayer, 2% HCl, aquades, HCl pekat, dan logam Mg.

4.7.3 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Alat : Pipet tetes, bunsen, korek api, gelas obyek, gelas penutup, spidol permanen, kertas penghisap, mikroskop, dan kertas tahan air.

Bahan : Biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, NAP, aquades steril, pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), minyak emersi, H₂O₂ 3% dan lateks.

4.7.4 Uji Antibakteri Metode Difusi Sumuran

Alat : tabung reaksi, inkubator, *vortex*, bunsen (lampu spiritus), korek api, *plate* kosong dan steril, alat penjepit (*scalpel*) steril, kapas, mikropipet, alat untuk melubangi agar, mistar, dan jangka sorong.

Bahan : ekstrak etanol daun tahi ayam (*Lantana camara* L.), pembenihan cair *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 10⁸ CFU/ml, dan MHA.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Persiapan Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian dipersiapkan dalam keadaan steril terlebih dahulu.

4.8.2 Persiapan Bahan

- 1) Daun tahi ayam yang sudah halus atau dalam bentuk serbuk.
- 2) Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* kode P 257 dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya ditanam pada SDA kemudian diinkubasi selama 18 - 24 jam pada suhu 35°C.

4.8.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Tahi Ayam dengan Metode Maserasi

4.8.3.1 Tahap Ekstraksi

- 1) Daun tahi ayam (*Lantana camara* L.) dikeringkan dengan pemanasan sinar matahari selama 2 hari lalu dihaluskan sampai berbentuk serbuk. Serbuk daun tahi ayam ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik sebanyak 200 gram.
- 2) Sampel halus sebanyak 200 gram kemudian dimasukkan dalam toples kaca.
- 3) Kemudian direndam dengan etanol 96% dengan perbandingan sampel daun tahi ayam dan etanol 96% adalah 1:10.
- 4) Dikocok sampai benar – benar tercampur menggunakan mesin *stirrer* selama \pm 1 jam.

- 5) Campuran dibiarkan selama 3x24 jam dan dibiarkan sampai mengendap.
- 6) Pisahkan cairan dari endapan dengan menggunakan kain saring.

Kemudian hasil dari proses ekstraksi tersebut siap untuk dievaporasi.

4.8.3.2 Tahap Evaporasi

- 1) Masukkan cairan dalam labu evaporasi berukuran 1 liter.
- 2) Labu evaporasi dipasang pada evaporator.
- 3) *Water bath* diisi dengan air sampai penuh.
- 4) Kemudian semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (diatur sampai suhu 40°C dengan pertimbangan menggunakan suhu sedang agar tidak merusak kandungan fitokimia dari ekstrak daun tahi ayam.
- 5) Larutan etanol dibiarkan sampai menguap seluruhnya sampai tidak ada lagi etanol yang menetes pada labu penampungan untuk mendapatkan ekstrak etanol daun tahi ayam saja tanpa ada kandungan pelarut etanol di dalamnya.
- 6) Ekstrak kemudian ditimbang dengan timbangan analitik dan dihasilkan ekstrak etanol daun tahi ayam (*Lantana camara* L.).

- 7) Hasil evaporasi dimasukkan ke dalam cawan porselin yang kemudian ditutup rapat menggunakan *aluminium foil* dan disimpan dalam refrigotor.

4.8.4 Uji Kandungan Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Tali Ayam

a) Uji Kandungan Flavonoid

Filtrat dibagi 3 bagian A, B, dan C. Filtrat A sebagai blangko, filtrat B ditambahkan 0,5 mL HCl pekat kemudian dipanaskan pada penangas air, jika terjadi perubahan warna merah tua sampai ungu menunjukkan hasil yang positif (metode Bate Smith-Metchalf). Filtrat C ditambahkan 0,5 ml HCl dan logam Mg kemudian diamati perubahan warna yang terjadi (metode Wilstater). Warna merah sampai jingga diberikan oleh senyawa flavon, warna merah tua diberikan oleh flavonol atau flavonon, warna hijau sampai biru diberikan oleh aglikon atau glikosida (Marliana *et al.*, 2005).

b) Uji Kandungan Terpenoid

Skrining fitokimia tidak dikerjakan untuk terpenoid karena tidak ada pereaksi yang spesifik untuk terpenoid. Uji Lieberman-Burchard yang biasa dikerjakan untuk terpenoid hanya mendeteksi gugus steroid, padahal selain terdapat pada terpenoid, gugus ini juga terdapat pada saponin, kardenolin dan bufadienol (Marliana *et al.*, 2005).

c) Uji Kandungan Saponin

Uji saponin dilakukan dengan metode Forth yaitu dengan cara memasukkan 2 mL sampel ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL akuades lalu dikocok selama 30 detik, diamati perubahan yang terjadi. Apabila terbentuk busa yang mantap (tidak hilang selama 30 detik) maka identifikasi menunjukkan adanya saponin (Marliana *et al.*, 2005).

d) Uji Kandungan Alkaloid

Ekstrak diuapkan sampai kering, 2% HCl dan larutan dibagi–kemudian residu ditambah 1,5 dalam tiga tabung. Tabung 1 larutan ditambah 0,5 ml larutan asam encer sebagai pembanding, tabung 2 ditambah 2-3 tetes reagensia Dragendorff, dan tabung 3 ditambah 2 tetes reagensia Mayer. Jika tabung 2 terbentuk endapan jingga dan pada tabung 3 terbentuk endapan kekuning-kuningan menunjukkan adanya alkaloid (Indrayani *et al.*, 2006).

e) Uji Kandungan Minyak Atsiri

Larutan uji sebanyak 1 mL dipipet lalu diuapkan di atas cawan porselin hingga diperoleh residu. Hasil positif minyak atsiri ditandai dengan bau khas yang dihasilkan oleh residu tersebut (Ciulei, 1984).

4.8.5 Identifikasi Bakteri

Dilakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu dengan menanam bakteri yang diduga *Staphylococcus aureus* pada NAP, diinkubasi dalam inkubator selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C. Dilakukan uji

konfirmasi, masing – masing dilakukan pewarnaan Gram, tes katalase dan tes koagulase. Masing – masing uji konfirmasi adalah sebagai berikut:

4.8.5.1 Pewarnaan Gram

1. Gelas obyek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
2. Satu ose (1 μ L) aquades steril atau larutan saline diletakkan pada gelas obyek.
3. Dengan ose yang sudah steril melalui pembakaran, diambil satu ose koloni yang diduga *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada medium padat. Disuspensikan dengan satu tetes aquades steril atau larutan saline yang sudah diteteskan terlebih dahulu pada gelas obyek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.
4. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian difiksasi dengan memberikan pemanasan di atas api secukupnya, sediaan siap untuk diwarnai.
5. Sediaan ditetesi dengan kristal violet, lalu didiamkan selama satu menit, kemudian buang sisanya dan bilas dengan air mengalir.
6. Sediaan ditetesi dengan larutan lugol, lalu didiamkan selama satu menit, kemudian buang sisa lugol dan bilas dengan air mengalir.

7. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 10 detik atau sampai warna cat luntur, kemudian buang sisa alkohol dan bilas dengan air mengalir.
8. Sediaan ditetesi dengan safranin, lalu didiamkan selama 30 detik, kemudian buang sisa safranin dan bilas dengan air mengalir.
9. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap untuk mengeringkan permukaan sediaan.
10. Dilakukan pengamatan pada sediaan di bawah mikroskop menggunakan lensa obyektif dengan perbesaran 100 kali.
11. Hasil positif bakteri *Staphylococcus aureus* jika terlihat sel bakteri berbentuk kokus tercat ungu yang menunjukkan merupakan bakteri Gram positif.

4.8.5.2 Tes Katalase

1. Membersihkan gelas obyek dan disterilkan dengan memanaskan di atas nyala api spiritus.
2. Menggoreskan 1 ose koloni *Staphylococcus aureus*.
3. Menambahkan 3 tetes larutan H_2O_2 3% pada gelas obyek.
4. Mengamati ada tidaknya gelembung udara. Hasil positif menunjukkan terbentuknya gelembung udara.

4.8.5.3 Tes Koagulase

1. Membersihkan gelas obyek dan disterilkan dengan memanaskan di atas nyala api spiritus.
2. Meneteskan 1 tetes aquades steril pada gelas obyek.

3. Menggoreskan 1 ose koloni *Staphylococcus aureus* pada ke aquades pada gelas obyek, kemudian ditambahkan juga 1 tetes lateks.
4. Mengamati ada tidaknya endapan putih. Hasil positif menunjukkan terbentuknya gumpalan putih.

4.8.6 Persiapan Suspensi Uji Antibakteri *Staphylococcus aureus*

1. Koloni diambil dari NAP ke dalam tabung reaksi yang berisi *Nutrient Broth*. Tabung reaksi tersebut lalu diinkubasi dalam inkubator selama 18 – 24 jam dengan suhu 37°C.
2. Dilakukan pemeriksaan spektrofotometri pada tabung tersebut dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui kepadatan optis bakteri atau *Optical Density* (OD) dari suspensi. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10⁸ CFU/ ml yang setara dengan OD = 0,1 (Murray *et al.*, 1999), maka dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$$

Keterangan:

- n_1 : hasil spektrofotometri
 v_1 : volume bakteri yang akan ditambah pengencer
 n_2 : OD (0,1 setara dengan 10⁶ CFU/ml)
 v_2 : volume suspensi bakteri uji (10 ml)

3. Dari perhitungan tersebut, diperoleh volume (dalam ml) bakteri yang akan ditambah pengencer (*Nutrient Broth*) untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10⁸ CFU/ ml sebanyak 10 ml. Kini suspensi bakteri telah siap digunakan untuk uji antibakteri menggunakan metode difusi sumuran.

4.8.7 Prosedur Penelitian Pendahuluan

Sebelum dilakukan penelitian uji antibakteri, dilakukan uji pendahuluan dengan menggunakan metode penggoresan. Penelitian pendahuluan digunakan untuk menentukan rentang konsentrasi ekstrak etanol daun tahi ayam (*Lantana camara* L.) yang dapat mempengaruhi pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus*, dimana nantinya digunakan untuk penelitian uji antibakteri. Dalam penelitian pendahuluan, dilakukan penggoresan 1 ose tebal suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakan koloni pada *Nutrient Broth* konsentrasi 10^8 CFU/ml pada *plate*, kemudian konsentrasi ditetesi ekstrak etanol daun tahi ayam dengan konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75%, dan 100%, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18 - 24 jam. Setelah itu, diamati pertumbuhan koloni pada *plate*. Konsentrasi yang digunakan untuk penelitian yaitu pada *plate* dengan terdapat sedikit pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan pada *plate* yang tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus*.

Dari hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun tahi ayam (*Lantana camara* L.) mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi antara *plate* yang terdapat sedikit pertumbuhan bakteri dan sampai konsentrasi *plate* yang tidak ada pertumbuhan bakteri.

4.8.8 Prosedur Uji Antibakteri Metode Difusi Sumuran

Besarnya konsentrasi ekstrak etanol daun tahi ayam (*Lantana camara* L.) yang digunakan adalah 5 macam konsentrasi dengan rentang 10% dan konsentrasi 0% sebagai kontrol bakteri. Langkah – langkah dalam menyiapkan dosis konsentrasi bahan uji adalah sebagai berikut:

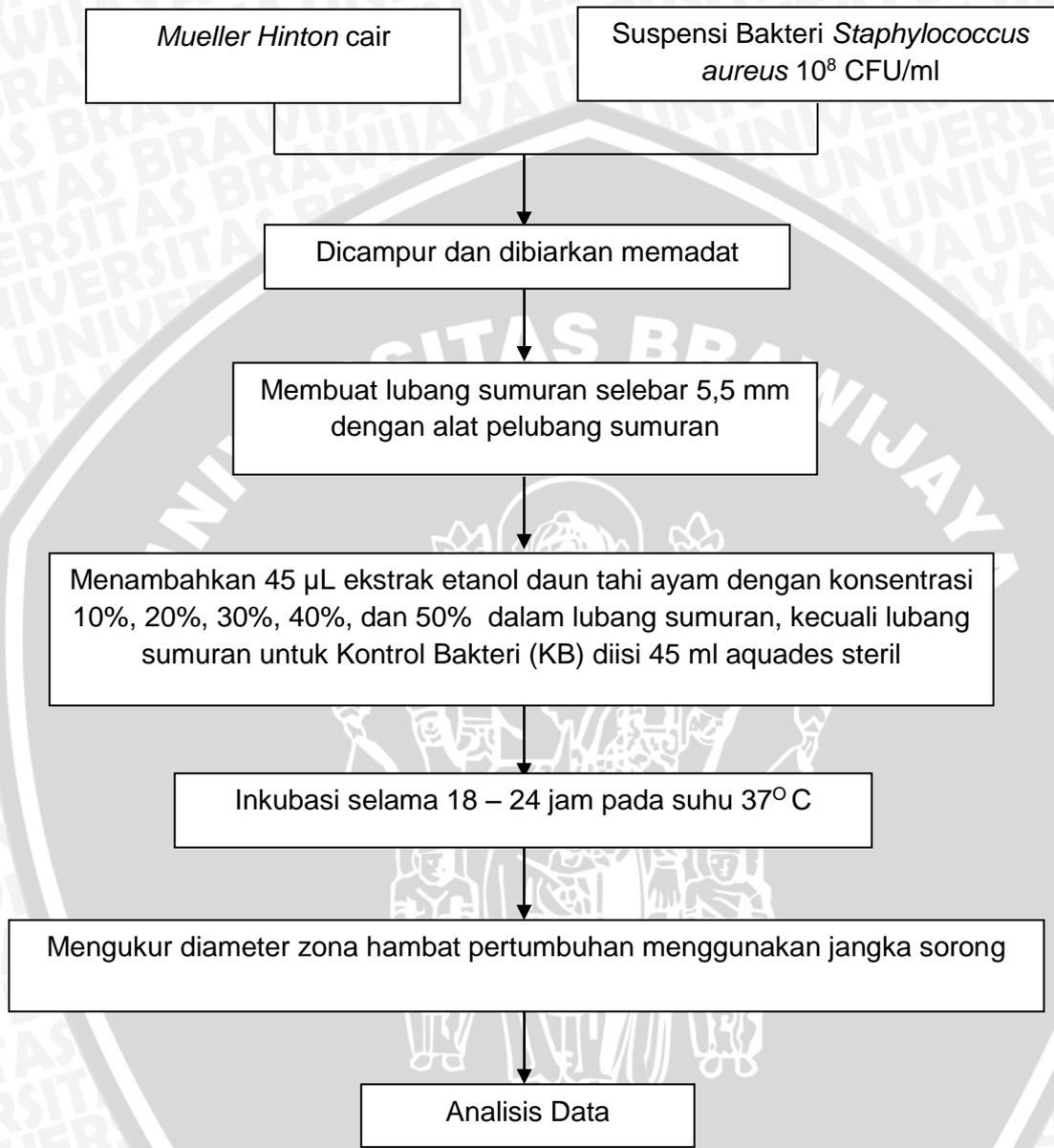
- a) Disediakan 4 *plate* steril untuk masing – masing perlakuan diberi tanda A, B, C, dan D.
- b) Membuat sediaan ekstrak etanol daun tanaman tahi ayam konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%.
- c) Menuang 20 ml *Mueller Hinton* cair ke dalam *plate* kaca steril yang telah disediakan.
- d) Menambahkan 1 ml suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml ke dalam *plate* dan dicampurkan dengan *Mueller Hinton* cair lalu *plate* sedikit digoyang-goyang agar suspensi *Staphylococcus aureus* tercampur baik dengan medium *Mueller Hinton*.
- e) Kemudian *plate* dibiarkan sampai campuran *Mueller Hinton* dan suspensi *Staphylococcus aureus* mengeras menjadi bentuk agar.
- f) Setelah mengeras, lubang sumuran dibuat dengan diameter lubang 5,5 mm pada campuran medium MHA dan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/ml.
- g) Meneteskan ekstrak etanol daun tahi ayam konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% menggunakan mikropipet sebanyak 45 μ L ke dalam masing – masing lubang sumuran. Pada lubang

sumuran yang digunakan sebagai kontrol pertumbuhan bakteri tidak ditambahkan ekstrak etanol daun tahi ayam, melainkan 45 μ L aquades steril.

- h) Memasukkan *plate* ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18 – 24 jam.
- i) Daya antibakteri dinilai dengan mengukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm) dikurangi diameter lubang sumuran.
- j) Dilakukan analisis data.



4.9 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian

4.10 Analisis Data

Analisis statistik yang digunakan dalam penelitian ini adalah *One Way ANOVA* pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Uji Anova dilakukan karena variabel independen terdiri dari lebih dari tiga kelompok. Uji ANOVA satu arah berfungsi untuk mengetahui signifikansi hasil zona hambat yang terbentuk karena perlakuan pemberian ekstrak etanol daun tahi ayam. Melalui uji ANOVA yang dilakukan terhadap 6 kelompok konsentrasi (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% v/v), maka dapat dilihat apakah pemberian ekstrak etanol daun tanaman tahi ayam menghasilkan zona hambat pertumbuhan bakteri. Sebelum dilakukan uji ANOVA satu arah, terdapat beberapa persyaratan, yaitu data harus terdistribusi normal dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk* karena data yang digunakan < 50 , dan diuji homogenitas karena data yang digunakan harus homogen. Berikutnya, untuk mengetahui signifikansi perbedaan efek yang ditimbulkan antar konsentrasi terhadap zona hambat yang terbentuk dilakukan uji *Post Hoc-Tukey*, untuk menguji kekuatan dan keeratan hubungan pemberian perlakuan konsentrasi ekstrak etanol daun tahi ayam terhadap terbentuknya zona hambat bakteri maka dilakukan uji korelasi dan regresi.