

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan ruang lingkup bidang Ilmu Mikrobiologi, Ilmu Kimia, dan Ilmu Farmakologi.

#### **3.2. Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **3.2.1. Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium FMIPA UNNES Semarang dan Laboratorium Sentral Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

##### **3.2.2. Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai Juni 2018.

#### **3.3. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian *true experimental* dengan rancangan *post test only control group design*. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok eksperimental, yaitu 4 kelompok perlakuan (air rebusan KKM konsentrasi 1,25%, 2,5%, 5% dan 10% v/v) dan 1 kelompok kontrol positif. Penelitian dilakukan dengan mengamati pertumbuhan *S.aureus* dan *E.coli*.

### 3.4. Populasi dan Sampel

#### 3.4.1. Populasi Target

Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

#### 3.4.2. Populasi Terjangkau

Biakan *wild type* bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### 3.4.3. Sampel

Biakan *wild type* bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

#### 3.4.4. Besar Sampel

Sampel penelitian ini dihitung dengan rumus Ferderer sebagai perhitungan uji eksperimental :

$$[(t - 1)(n - 1)] > 15$$

Dimana (n) adalah jumlah pengulangan per kelompok perlakuan, dan (t) adalah kelompok perlakuan.

$$[(t - 1)(n - 1)] > 15$$

$$[(5 - 1)(n - 1)] > 15$$

$$4n - 4 > 15$$

$$4n > 19$$

$$n > 4,75$$

$$n = 5$$

Dalam penelitian ini sampel dibagi menjadi 5 kelompok dimana perlakuan setiap kelompok dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali.

### 3.4.5. Kriteria Inklusi

*S.aureus* dan *E.coli* yang tumbuh pada media pertumbuhan setelah diberi perlakuan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

### 3.4.6. Kriteria Eksklusi

Ada kontaminasi jamur atau bakteri lain pada media pertumbuhan.

## 3.5. Variabel Penelitian

### 3.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi bertingkat air rebusan KKM (konsentrasi 1,25%, 2,5%, 5%, 10% v/v).

### 3.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini pertumbuhan bakteri *S.aureus* dan *E.coli*.

## 3.6. Definisi Operasional

Tabel 5. Definisi Operasional

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala	Keterangan
Variabel Bebas	Larutan Antibakteri	Air rebusan KKM konsentrasi 100% b/v adalah sari yang dihasilkan dari perebusan 100 gram kulit kayu manis dalam 100 ml air sebagai volume akhir pada suhu 90°C selama 15 menit.	Nominal	1. Air Rebusan KKM 10%
		Air rebusan KKM konsentrasi 10%v/v, 5%v/v, 2,5%v/v, dan 1,25%v/v	Nominal	2. Air Rebusan KKM 5% 3. Air Rebusan KKM 2,5% 4. Air Rebusan KKM 1,25%

Tabel 5. Definisi Operasional (lanjutan).

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala	Keterangan
		adalah konsentrasi bertingkat yang dihasilkan dengan melakukan prosedur standar dilusi bertingkat air rebusan KKM 100% b/v secara serial.		5. KKM + MHB 6. MHB + bakteri
		Kejernihan awal sampel adalah air rebusan KKM dengan MHB steril tanpa inokulasi bakteri sebagai indikator pembandingan kejernihan dan digunakan sebagai kontrol +.	Nominal	
		MHB dengan inokulasi bakteri merupakan kontrol dalam kualitas pengerjaan penelitian sehingga digunakan sebagai kontrol -.	Nominal	
Variabel Terikat	Pertumbuhan Bakteri	Pertumbuhan bakteri dinyatakan statis apabila larutan perlakuan tampak jernih secara visual setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Konsentrasi terendah dengan penampakan jernih setelah inkubasi disebut Kadar Hambat Minimum.	Nominal	1. Jernih 2. Keruh
		Pertumbuhan bakteri dinyatakan steril apabila tidak ada pertumbuhan kuman pada tiap 0,1 ml larutan yang ditumbuhkan di media MHA setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Konsentrasi yang menghasilkan keadaan steril disebut Kadar Bunuh Minimum.	Nominal	1. Steril 2. Ada pertumbuhan

### **3.7. Cara Pengumpulan Data**

#### **3.7.1. Alat**

Timbangan analitik, penggerus, panci infusa, pisau, korek api, tabung erlenmeyer, *waterbath*, cawan petri, gelas ukur, *beaker glass*, tabung reaksi, ose, autoklaf, inkubator, sarung tangan, *vortex*, mikropipet, kertas pH.

#### **3.7.2. Bahan**

Kulit Kayu Manis, Aquadest, Alkohol 70%, *Mueller Hinton Broth* (MHB), dan *Mueller Hinton Agar* (MHA).

#### **3.7.3. Jenis Data**

Data yang dikumpulkan adalah data primer hasil penelitian yaitu kejernihan visual larutan perlakuan yang telah dilakukan inokulasi bakteri dan inkubasi, serta sterilitas pertumbuhan bakteri dari masing-masing kelompok perlakuan jernih tersebut.

#### **3.7.1 Cara Kerja**

1. Pembuatan Larutan Kayu Manis
  - a. Larutan Induk dibuat dengan menimbang kulit kayu manis yang sudah dicuci dan dihaluskan sebanyak 100 gram dan kemudian memasukkan dalam *beaker glass* steril kemudian ditambahkan aquadest steril sebanyak 1000 ml (rasio 1 : 10) dan direbus pada suhu 90° C selama 15 menit. Air rebusan disaring selagi panas dengan penyaring steril berupa kain flannel steril dilanjutkan dengan filter bakteri 0,5 mikron kemudian

ditampung dalam botol kaca steril dan disimpan pada suhu kulkas (2°C - 8°C).

- b. Larutan induk air rebusan kulit kayu manis selanjutnya dilakukan uji fitokimia untuk menguji keberadaan kandungan senyawa yang antibakteri yang akan diteliti.

Tabel 6. Uji fitokimia untuk membuktikan senyawa pada kulit kayu manis.<sup>36</sup>

Uji Fitokimia	Cara Kerja & Intepretasi
Flavonoid	Menambahkan Mg-HCl pada larutan sampel, hasil positif apabila terbentuk warna cokelat.
Tannin ( <i>Proanthocyanidin</i> )	Menambahkan gelatin 10% pada larutan sampel, hasil positif apabila terbentuk endapan putih.
Polifenol	Menambahkan FeCl <sub>3</sub> 1% pada larutan sampel, hasil positif apabila terbentuk warna hijau kehitaman.
Saponin	Mengocok larutan sampel selama 10 detik, hasil positif apabila busa yang terbentuk tidak hilang dengan penambahan HCl 0,1.

- c. Pembuatan berbagai konsentrasi air rebusan kulit kayu manis dilakukan secara dilusi serial.

I : Larutan induk terdiri dari 5 cc air rebusan kulit kayu manis.

P1 : Kayu manis 10% terdiri atas 1 ml larutan induk.

P2 : Kayu manis 5% terdiri atas 1 ml larutan P1 dan 1 ml aquadest.

P3 : Kayu manis 2,5% terdiri atas 1 ml larutan P2 dan 1 ml aquadest.

P4 : Kayu manis 1,25% terdiri atas 1 ml larutan P3 dan 1 ml aquadest.

d. Mengisi tabung Kontrol (+) dengan 1 ml KKM tiap konsentrasi dan 1 ml MHB serta tabung Kontrol (-) dengan 1 ml KKM dan 1 ml aquadest sebagai *quality control*.

## 2. Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Masing-masing biakan bakteri yang telah ditanam pada *Tryptic Soy Agar* (TSA) dilakukan dengan cara mengambil sedikit koloni dari media dengan ose steril, dimasukkan dan dihomogenkan ke dalam 5 ml MHB menggunakan *vortex* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri tersebut kekeruhannya disetarakan dengan larutan standar McFarland 0,5 yang setara dengan  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml kemudian dilakukan dilusi serial hingga didapatkan konsentrasi bakteri  $10^6$  CFU/ml.

## 3. Inokulasi Bakteri

Menambahkan 1 ml suspensi bakteri ke dalam masing-masing tabung P1, P2, P3, dan P4. Percobaan dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan pada setiap nomor tabung. Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

## 4. Penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM)

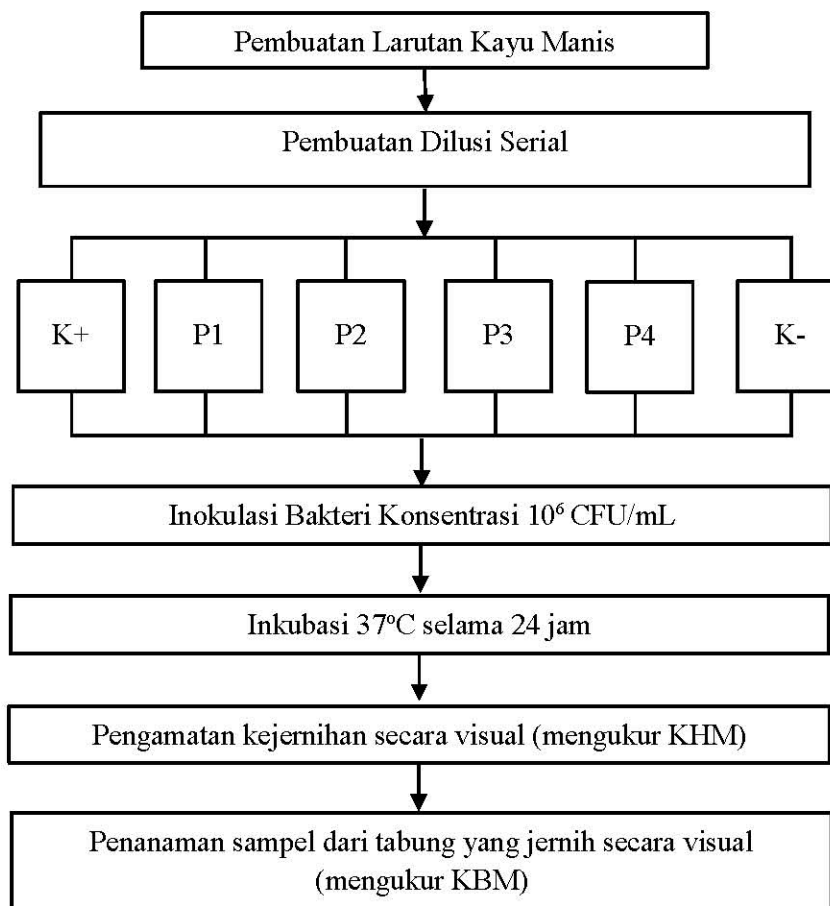
Mengamati kejernihan tabung perlakuan setelah diinkubasi. Tabung dengan konsentrasi terkecil yang menghasilkan keadaan jernih secara visual

dinyatakan sebagai KHM. Pernyataan jernih secara visual adalah dengan dibandingkan pada tabung K+.

5. Penentuan Kadar Bunuh Minimum (KBM)

Menggoreskan 0,1 ml sediaan tabung-tabung yang secara visual tampak jernih setelah perlakuan pada MHA dengan metode *streak plate* dan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Lakukan pengamatan pada konsentrasi terkecil yang menghasilkan kondisi steril untuk kemudian ditetapkan sebagai KBM.

### 3.8. Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian

K+ : Air rebusan KKM tiap konsentrasi + MHB steril

P1 : Air rebusan KKM 10%

P2 : Air rebusan KKM 5%

P3 : Air rebusan KKM 2,5%

P4 : Air rebusan KKM 1,25%

K- : MHB dengan inokulasi bakteri

### 3.9. Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian dilakukan uji hipotesis menggunakan uji non parametrik *Kruskal-wallis* untuk menguji hubungan

