

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian analitik laboratorik menggunakan metode difusi dengan teknik sumuran.

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

#### **3.2.1 Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Biologi Fakultas MIPA, serta Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

#### **3.2.2 Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober sampai dengan November 2015.

### **3.3 Bahan dan Alat Penelitian**

#### **3.3.1 Bahan Uji**

Bahan penelitian yang digunakan adalah bintang laut *Culcita sp.* yang didapatkan dari Perairan Ketapang, Kabupaten Pesawaran dan diekstraksi di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung.

#### **3.3.2 Bakteri Uji**

Bakteri yang dipergunakan adalah bakteri Gram negatif (*Escherichia coli*) sebagai bakteri uji yang berasal dari Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi Lampung.

#### **3.3.3 Media Kultur**

Media kultur yang digunakan pada penelitian ini adalah *nutrient agar* (media awal), media agar *Mac Conkey* dan *Eosin Methylene Blue* agar (EMBA) yang digunakan untuk mengkultur bakteri *Escherichia coli*. Kemudian digunakan media *Muller Hinton Agar* (MHA) sebagai media tempat dilakukannya uji daya hambat bakteri.

### 3.3.4 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: pisau, cawan petri, timbangan, *aluminium foil*, kompor listrik, kertas saring *Whatman 42*, kapas swab, pipet mikro, labu *Erlenmeyer* 250 ml dan 500 ml, evaporator, *Muller Hinton Agar*, *Eosin Methylene Blue* agar (EMBA), ose bulat, gelas ukur, *blender*, corong kaca, botol gelas, gelas piala, tabung reaksi, pipet tetes, pipet mikro, sendok plastik, pipa kapiler (sumuran), pinset, aquades, *hammer mills*, gelas, inkubator, *handscoon*, Seftriakson serbuk injeksi, dan alat tulis.

### 3.4 Besar Sampel

Dalam penelitian ini sampel yang digunakan adalah ekstrak bintang laut *Culcita sp.* dengan kadar 16000 ppm, 8000 ppm, 4000 ppm, 2000 ppm, dan 1000 ppm serta Seftriakson (kontrol positif) dan aquades (kontrol negatif) yang diberikan untuk mempengaruhi pertumbuhan *Escherichia coli*. Untuk menentukan besar sampel pada penelitian ini digunakan rumus federer (Sastroasmoro, 2014):

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

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

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

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

$$n \geq 3,5$$

Keterangan :

n = banyaknya sampel (pengulangan)

k = banyaknya perlakuan

Berdasarkan rumus diatas maka besar sampel yang digunakan adalah 3,5.

Untuk menghindari terjadinya kesalahan, maka dibulatkan ke atas menjadi

4. Besar sampel ini digunakan sebagai acuan dilakukanya pengulangan pada penelitian ini.

### **3.5 Prosedur Penelitian**

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, yaitu tahapan pengambilan dan preparasi bahan baku, sterilisasi alat, tahapan pembuatan ekstrak senyawa aktif dari bintang laut, identifikasi ulang bakteri, pembuatan *Nutrient Broth* (NB), pembuatan media *Muller Hinton Agar*, pembuatan sumuran, dan uji aktivitas antibakteri.

#### **3.5.1 Tahapan Pengambilan dan Preparasi Bahan Baku**

Pada tahap pengambilan sampel, bintang laut *Culcita sp.* berasal dari Perairan Ketapang, Kabupaten Pesawaran. Bintang laut kemudian dikeringkan dengan suhu rendah menggunakan *freeze dryer* dengan suhu kurang dari  $-40^{\circ}\text{C}$ . Tujuan dari proses pengeringan ini adalah untuk mengurangi kadar air dalam bahan

yang dikandungnya. Kadar air yang rendah bertujuan untuk menghindari terjadinya proses pembusukan, hidrolisis komponen aktif dan oksidasi dalam sampel selama dilakukan maserasi (Winarno, 2008).

Bintang laut yang telah kering kemudian dihaluskan dengan *hammer mills*, sehingga didapat tekstur yang halus. Ukuran sampel yang lebih kecil (bubuk atau tepung) diharapkan dapat memperluas permukaan bahan yang dapat berkontak langsung dengan pelarut, sehingga proses ekstraksi komponen aktif dapat berjalan dengan maksimal. Bubuk atau tepung bintang laut akan digunakan dalam proses ekstraksi (Agustina, 2012).

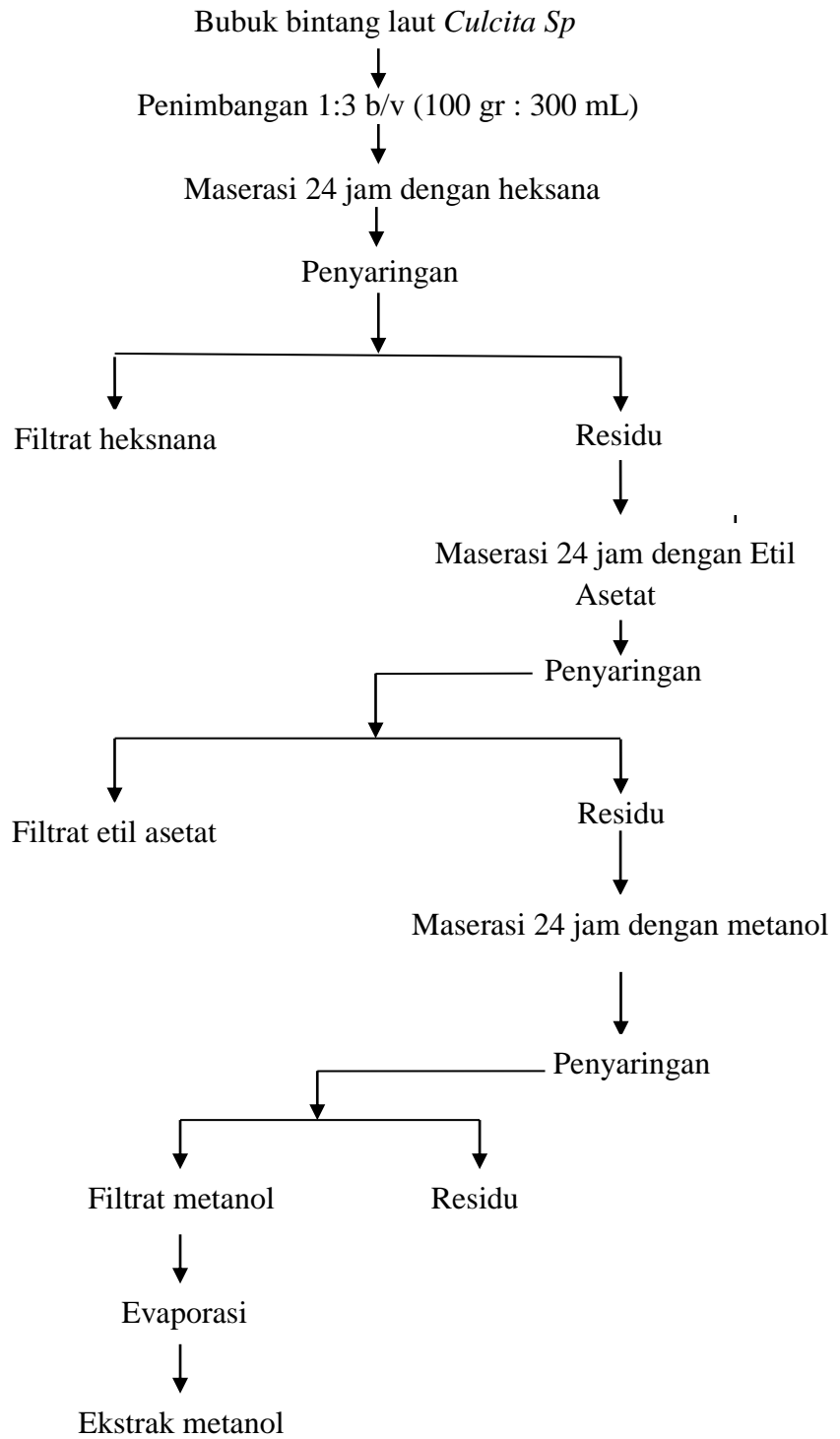
### **3.5.2 Sterilisasi Alat**

Seluruh alat yang digunakan pada penelitian ini dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus menggunakan kertas pembungkus lalu disterilisasi menggunakan oven pada suhu 160°C selama kurang lebih satu jam (Soemarno, 2000).

### **3.5.3 Pembuatan Ekstrak Senyawa Aktif Dari Bintang Laut *Culcita sp.***

Proses ekstraksi komponen bioaktif yang digunakan adalah metode ekstraksi bertingkat. Metode ini menggunakan proses maserasi

(perendaman) untuk menarik seluruh komponen bioaktif yang terdapat pada bintang laut *Culcita sp.* Proses maserasi menggunakan tiga jenis pelarut, yaitu pelarut heksana, etil asetat, dan metanol. Pertama, bubuk bintang laut *Culcita sp.* sebanyak 100 gram dimaserasi selama 24 jam dengan 300 mL pelarut heksana yang dihitung dengan perbandingan 1:3 (b/v atau gr/mL), setelah 24 jam dilakukan penyaringan dengan kertas saring *Whatman 42*, sehingga didapatkan hasil berupa filtrat heksana dan residu. Kedua, residu yang didapatkan dari hasil penyaringan pertama digunakan untuk dimaserasi dengan 300 mL etil asetat selama 24 jam, kemudian dilakukan penyaringan kembali menggunakan kertas saring *Whatman 42*. Hasil dari penyaringan didapatkan berupa filtrat etil asetat dan residu. Ketiga, residu hasil penyaringan kedua digunakan untuk proses maserasi menggunakan 300 mL pelarut metanol selama 24 jam. Setelah dilakukan maserasi selama 24 jam, dilanjutkan dengan penyaringan sehingga didapatkan filtrat metanol dan residu. Filtrat metanol kemudian dievaporasi sehingga semua pelarut terpisah dari ekstrak menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada temperatur 50°C dan tekanan 500 mmHg (Agustina, 2012). Proses ini akan menghasilkan ekstrak metanol yang kental. Proses ekstraksi bertingkat dengan tiga jenis pelarut ini ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 1. Diagram alir ekstraksi bertingkat bintang laut *Culcita sp*.  
(Sumber : Agustina, 2012)

Proses ini akan menghasilkan ekstrak metanol yang kental dengan kadar 100% setara dengan larutan konsentrasi  $10^6$  ppm. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi dengan besaran *parts per million* (ppm). *Parts per million* merupakan istilah kimia yang digunakan untuk mendeskripsikan konsentrasi yang sangat kecil dari sebuah larutan. Konsentrasi yang digunakan merujuk pada penelitian Juariah (2014) sebesar 16000 ppm, 8000 ppm, 4000 ppm, 2000 ppm, dan 1000 ppm. Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan rumus (Hage, David, & Carr, 2011; Chang, 2010):

$$M = 10^3 \times \frac{V_{\text{ekstrak}}}{V_{\text{ekstrak} + \text{pelarut}}}$$

Keterangan :

M = Konsentrasi hasil pengenceran (ppm)

$V_{\text{ekstrak}}$  = Volume awal ekstrak yang akan di encerkan (ml)

$V_{\text{ekstrak} + \text{pelarut}}$  = Volume akhir hasil pengenceran (L)

Sehingga berdasarkan rumus di atas, didapatkan perhitungan konsentrasi sebagai berikut :

$$M_1 = 10^3 \times \frac{1,6 \text{ ml}}{0,1 \text{ L}} = 16000 \text{ ppm}$$

$$M_2 = 10^3 \times \frac{0,8 \text{ ml}}{0,1 \text{ L}} = 8000 \text{ ppm}$$

$$M_3 = 10^3 \times \frac{0,4 \text{ ml}}{0,1 \text{ L}} = 4000 \text{ ppm}$$

$$M_4 = 10^3 \times \frac{0,2 \text{ ml}}{0,1 \text{ L}} = 2000 \text{ ppm}$$



$$M_5 = 10^3 \times \frac{0,1 \text{ ml}}{0,1 \text{ L}} = 1000 \text{ ppm}$$

### 3.5.4 Identifikasi Ulang Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan pewarnaan dan tes - tes biokimiawi, diantaranya adalah sebagai berikut:

#### 1. Pewarnaan Gram

Dari bahan pemeriksaan akan dibuat sediaan pada bahan kaca *object glass*, lalu diwarnai dengan prinsip pewarnaan Gram dengan zat warna *Crystal violet*, *iodine solution*, *ethanol*, *safranin*, dan diamati di bawah mikroskop untuk mengetahui apakah bakteri tersebut bakteri Gram positif atau bakteri Gram negatif (Brooks *et al.*, 2008).

#### 2. Kultur Bakteri

Media kultur yang digunakan adalah agar *Mac Conkey* dan *Eosin Methylene Blue* agar yang digunakan untuk mengkultur bakteri *Escherichia coli* (Brooks *et al.*, 2008).

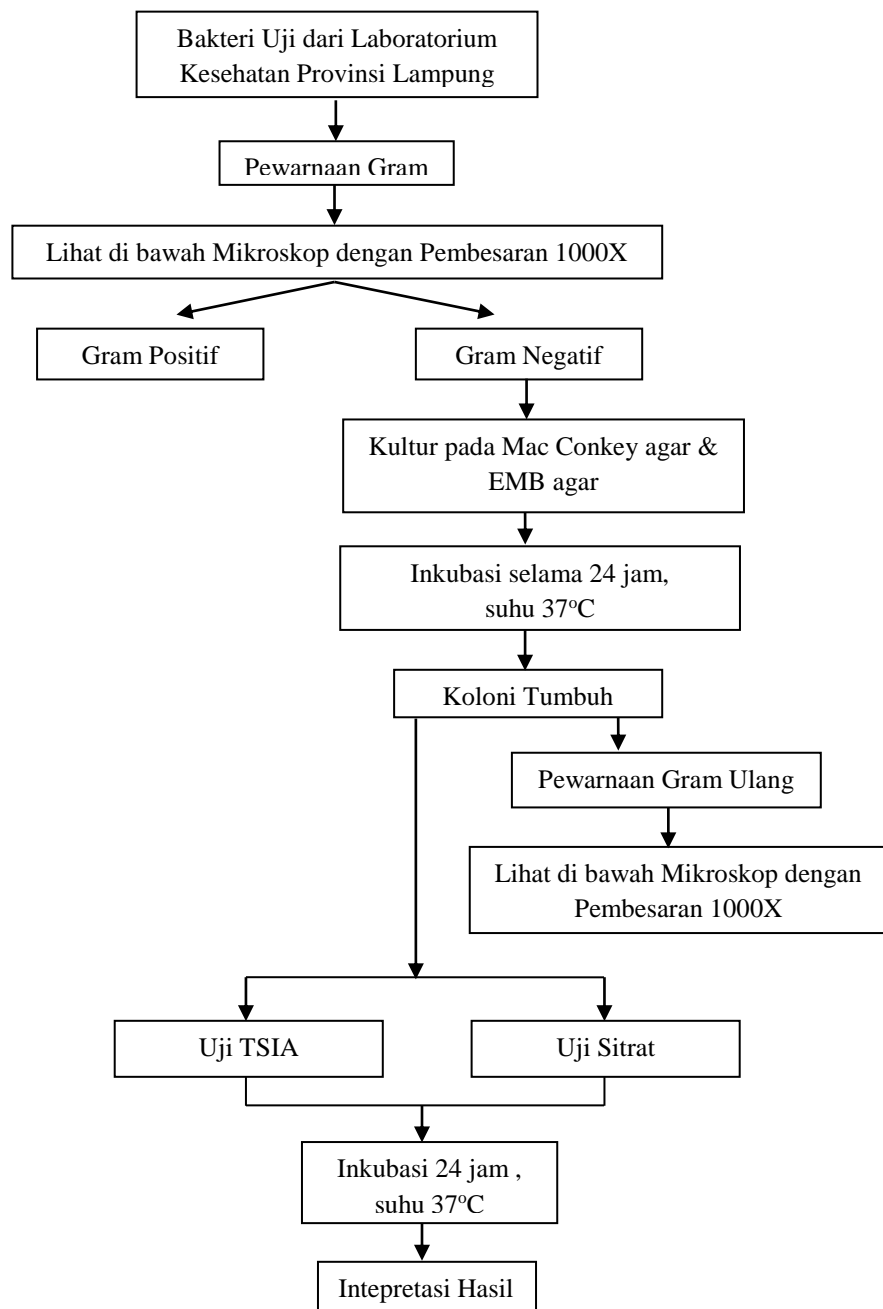
#### 3. Tes Biokimiawi Bakteri Gram Negatif

##### a. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Berupa agar miring yang mengandung 3 jenis gula yaitu glukosa, laktosa, dan sakarosa. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri memfermentasi gula dan menghasilkan sulfur (Safitri, 2012).

### b. Uji Sitrat

Merupakan tes biokimiawi untuk melihat kemampuan suatu organisme untuk menggunakan natrium sitrat sebagai sumber utama metabolisme dan pertumbuhan. Positif bila berubah warna menjadi warna biru yang bermakna timbul warna basa (Safitri, 2012).



Gambar 2. Diagram alur identifikasi bakteri

### **3.5.5 Pembuatan *Nutrient Broth* (NB)**

Pembuatan dengan cara melarutkan 1 gram *Nutrient Broth* ke dalam 125 mL aquades, kemudian dipanaskan sampai mendidih disertai pengadukan sampai bubuk benar-benar larut. Media ini kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 50 menit.

### **3.5.6 Pembuatan Media Agar *Muller-Hinton***

Media dibuat dengan melarutkan sebanyak 8,5 gram Agar *Muller-Hinton* dalam aquades sebanyak 250 mL, kemudian dipanaskan hingga mendidih disertai pengadukan sampai bubuk benar-benar larut. Media ini kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 50 menit (Silvikasari, 2011; Silaban, 2009).

### **3.5.7 Pembuatan Sumuran**

Pembuatan sumuran dilakukan dengan meletakkan pipet steril yang memiliki ukuran diameter sama dengan diameter cakram disk pada cawan petri steril dengan menggunakan pinset sebelum agar dimasukkan. Setelah agar memadat angkat pipet yang telah diletakkan pada cawan petri (Pratiwi, 2013). Penggunaan metode

difusi dengan teknik sumuran masih jarang digunakan untuk penelitian dengan alasan sulitnya proses perlakuan, dan banyak peneliti yang menggunakan teknik difusi disk untuk penelitiannya. Namun berdasarkan banyak teori, hasil dari teknik sumuran akan lebih mudah terlihat dan lebih menampakkan hasil yang nyata (Prayoga, 2013). Pada teknik sumuran ekstrak langsung dimasukkan ke setiap lubang sehingga efek untuk menghambat bakteri menjadi lebih kuat. Menggunakan metode sumuran dapat menghasilkan diameter zona hambat yang besar dikarenakan pada teknik sumuran terjadi proses osmolaritas dari konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi dari teknik difusi disk.

### **3.5.8 Uji Aktivitas Antibakteri**

Urutan pengujian aktivitas antibakteri yaitu sebagai berikut:

#### **a. Pembuatan Suspensi dan Media Uji**

Suspensi bakteri dibuat dengan cara biakan bakteri diambil sebanyak 1 – 2 ose dan disuspensikan ke dalam larutan *Nutrient Broth* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Media uji dibuat dengan cara suspensi bakteri diambil sebanyak 40 µL kemudian dicampurkan ke 20 mL MHA pada cawan petri yang telah diletakkan pipet steril dengan jarak ±15 mm, lalu didiamkan selama 30 menit agar memadat dan terbentuk sumuran (Magdalena dan Kusnadi, 2015).

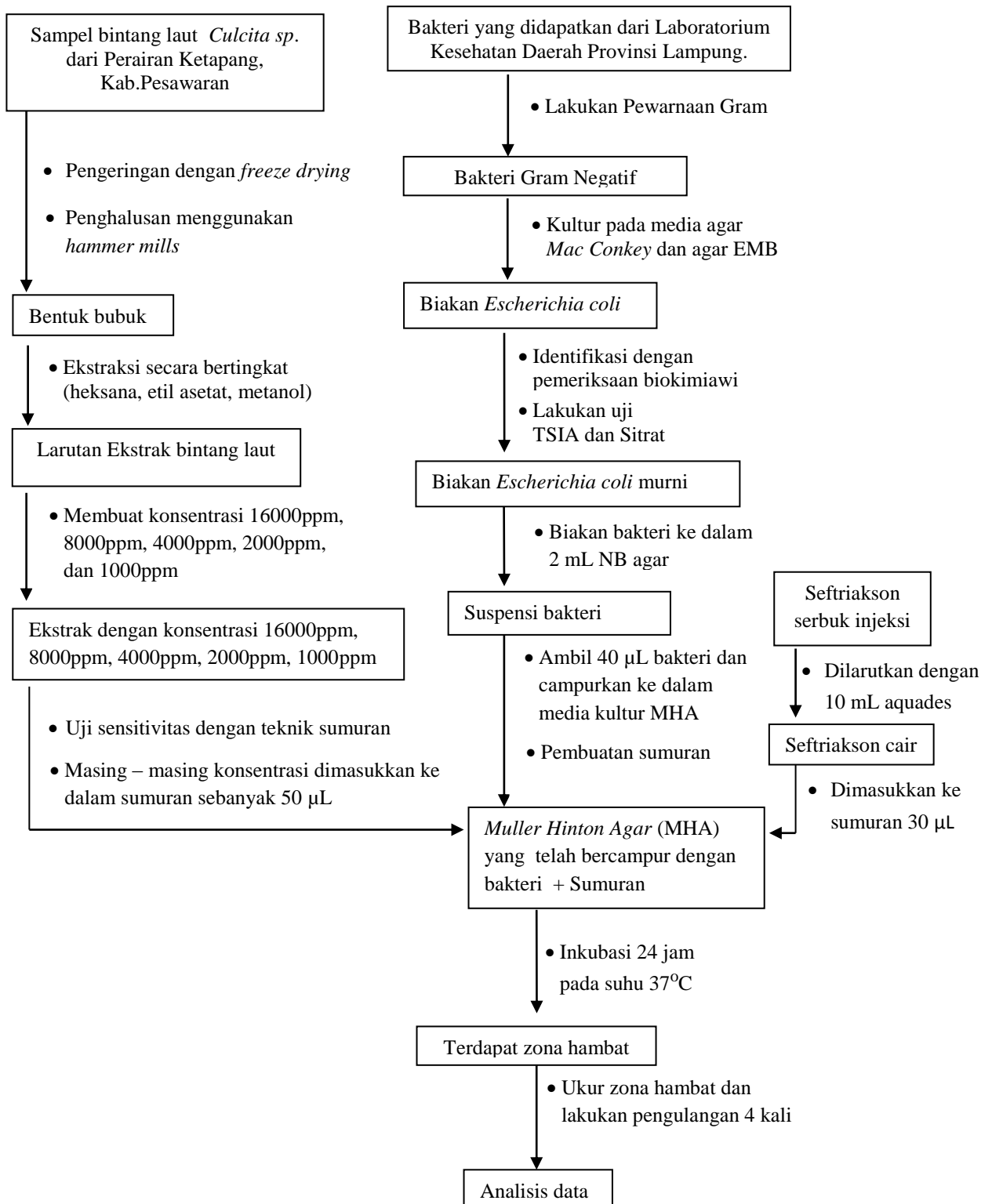
**b. Pengisian Sumuran Dengan Ekstrak Bintang Laut *Culcita sp.***

Sumuran tersebut jika sudah mengeras diisi dengan ekstrak bintang laut *Culcita sp.* dengan konsentrasi 16000 ppm, 8000 ppm, 4000 ppm, 2000 ppm, dan 1000 ppm menggunakan mikro pipet sebanyak 50  $\mu$ L. Setelah itu, media dimasukkan kedalam inkubator pada suhu 37°C dan diamati setelah 24 jam kemudian diukur zona hambat dengan penggaris.

**c. Pemberian Seftriakson**

Seftriakson dibuat dengan cara melarutkan 1 gram Seftriakson serbuk injeksi dengan 10 mL aquades. Seftriakson dimasukkan ke dalam sumuran yang terdapat pada media uji sebanyak 30  $\mu$ L menggunakan mikropipet. Kemudian, masukkan kedalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati zona hambat yang terbentuk lalu ukur dengan penggaris.

### 3.6 Alur Penelitian



Gambar 3. Diagram alur penelitian

### **3.7 Variabel Penelitian**

#### **3.7.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak bintang laut *Culcita sp.* dengan konsentrasi 16000 ppm, 8000 ppm, 4000 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm dan Seftriakson.

#### **3.7.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat untuk penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

### **3.8 Definisi Operasional**

Adapun definisi dari variabel bebas dan variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut yang terdapat pada Tabel 2.

Tabel 1. Definisi operasional penelitian

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Ekstrak Bintang Laut <i>Culcita sp.</i>	Sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari bintang laut <i>Culcita sp.</i> menggunakan pelarut yang sesuai kemudian diuapkan dan disesuaikan konsentrasinya .	Gelas Ukur	Melarutkan ekstrak sebesar 1,6 mL untuk M <sub>1</sub> ; 0,8 mL untuk M <sub>2</sub> ; 0,4 mL untuk M <sub>3</sub> ; 0,2 mL untuk M <sub>4</sub> ; dan 0,1 mL untuk M <sub>5</sub> masing – masing ke dalam 100 mL pelarut.	M <sub>1</sub> = 16000 ppm M <sub>2</sub> = 8000 ppm M <sub>3</sub> = 4000 ppm M <sub>4</sub> = 2000 ppm M <sub>5</sub> = 1000 ppm	Rasio
2	Seftriakson	Antibiotika golongan sefalosporin generasi ketiga dengan mekanisme kerja menghambat sintesis mukopeptida di dinding sel bakteri.	Penggaris	Mengukur diameter yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.	Diameter zona hambat (cm)	Rasio
3	Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli.</i>	Diameter zona hambat pertumbuhan mikroba yang terbentuk setelah diberikan variabel bebas dan kontrol dengan teknik sumuran.	Penggaris	Mengukur diameter yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.	Diameter zona hambat (cm)	Rasio

### 3.9 Analisis Data

Analisis data dari penelitian ini dilakukan secara analitik komparatif numerik lebih dari dua kelompok tidak berpasangan. Pengamatan diuji analisis menggunakan *software* statistik. Uji yang pertama dilakukan adalah



uji normalitas (*Shapiro-Wilk*), kemudian dilakukan transformasi data untuk mendapatkan data yang berdistribusi normal. Distribusi dikatakan normal bila  $p > 0,05$  dan jika  $p < 0,05$  distribusi dikatakan tidak normal. Dikarenakan terdapat data yang berdistribusi tidak normal, maka tidak dapat dilakukan uji parametrik *One-way Anova* dan uji *Post hoc Bonferroni*. Maka dilakukan uji alternatif yakni uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan uji *Post hoc Mann-Whitney* (Dahlan, 2014).

### **3.10 Etika Penelitian**

Penelitian sudah diajukan ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan telah memperoleh surat kelayakan etik. Persetujuan etik diterbitkan melalui surat 2738/UN26/8/DT/2015.