

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini menggunakan daun mimba (*Azadiracta indica* A) yang didapatkan dari Kelurahan Rhee, Kabupaten Sumbawa, Nusa Tenggara Barat.

Sampel penelitian menggunakan daun mimba (*Azadiracta inidica* A), dengan ciri-ciri daun berwarna hijau dan tidak terlalu tua, yang diambil pada pagi hari pada saat daun melakukan fotosintesis, tidak rusak atau berlubang, dan tidak berjamur dan tidak mengandung kuman yang dapat menyebabkan kerusakan pada daun serta diambil secara acak pada satu kawasan pada beberapa pohon di daerah Kelurahan Rhee, Kabupaten Sumbawa, Nusa Tenggara Barat.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian yang dilakukan ialah variasi konsentrasi yaitu 30%, 36%, dan 42% dari ekstrak daun mimba (*Azadiractha indica* A).

Variabel kedua yang dilakukan dalam penelitian ialah aktivitas antibakteri ekstrak daun mimba dengan variasi konsentrasi terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada isolat sputum pasien pneumonia dengan metode difusi cakram mengukur diameter hambat pertumbuhan bakteri.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dapat dikelompokkan pada berbagai variasi variabel independen, variabel terkontrol serta variabel dependen.

Variabel dependen merupakan variabel yang dapat dirubah untuk mengetahui pengaruh suatu variabel tergantung. Dalam penelitian ini variabel bebas menggunakan ekstrak daun mimba (*Azadiracta indica* A) dengan variasi konsentrasi 30%, 36%, dan 42%.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel dependen serta perlu adanya penetapan klasifikasi, sehingga tidak menyebabkan tersebarnya hasil serta mudah untuk diulang dengan cepat. Variabel terkontrol pada penelitian ini ialah kemurnian bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada isolat sputum pada pasien pneumonia, keadaan laboratorium, kondisi lingkungan, alat serta bahan

yang steril, media dalam penelitian, serta ekstraksi maserasi daun mimba.

Variabel tergantung merupakan suatu titik permasalahan yang menjadi variabel dalam suatu penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan atau daya hambat bakteri *Klebsiella pneumoniae* dari berbagai variasi konsentrasi ekstrak daun mimba (*Azadiracta indica* A) yang dilihat dari diameter daya hambat yang dihasilkan dengan metode difusi cakram.

C. Definisi Operasional

Pertama, daun mimba (*Azadiracta indica* A) adalah daun yang diambil dari Kelurahan Rhee, Kabupaten Sumbawa, Nusa Tenggara Barat. Daun yang diambil berwarna hijau tidak terlalu tua atau muda, yang diambil pagi hari pada saat daun melakukan fotosintesis, tidak berjamur dan tidak mengandung kuman yang dapat menyebabkan kerusakan pada daun serta diambil secara acak pada satu kawasan pada beberapa pohon dan tidak rusak atau berlubang.

Kedua, serbuk daun mimba (*Azadiracta indica* A) merupakan hasil dari daun mimba yang sudah dengan prosedur klasifikasi basah, pencucian sampel dengan air mengalir agar kotoran yang menempel dapat hilang, lalu pengeringan gunakan oven pengering dengan suhu tidak melebihi 60°C, klasifikasi kering, kemudian semprot dengan mixer dan ayakan dengan pengayak nomor 40 hingga menghasilkan serbuk halus.

Ketiga, ekstrak daun mimba ialah hasil ekstraksi diperoleh dari serbuk daun mimba melalui proses maserasi dengan pelarut etanol 96% lalu dipisahkan dengan *vacum rotary evaporator*.

Keempat, uji aktivitas antibakteri merupakan uji aktivitas dengan metode difusi cakram mengukur diameter zona hambat.

Kelima, konsentrasi efektif adalah konsentrasi yang optimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumonia* yang setara dengan pemberian ciprofloxacin.

Keenam, Ciprofloxacin adalah obat yang digunakan dalam mengatasi infeksi pneumonia oleh bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan digunakan sebagai kontrol obat pada penelitian.

Ketujuh, sputum pasien pneumonia adalah lendir yang diproduksi oleh paru-paru dan tenggorokan yang diambil dari pasien terdiagnosa pneumonia dan sudah diketahui terinfeksi bakteri

Klebsiella pneumoniae di Rumah Sakit Umum Daerah Dr.Moewardi, Jawa Tengah.

D. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun mimba yang dibagi dalam beberapa konsentrasi yang diperoleh dari pengenceran : 30%, 36%, 42%, dan sebagai kontrol yang terdiri dari kontrol positif ciprofloxacin 500 mg dan kontrol negatif DMSO 10%, setiap perlakuan diulang sebanyak lima kali ulangan. Bahan utama lain yaitu isolat sputum pasien pneumonia yang terdeteksi bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Bahan kimia untuk melakukan identifikasi secara kualitatif adalah NaCl 0,9%, etanol 96%, HCl 2 N, *Bourchard LP* dan *Mayer*, sebuk magnesium (Mg), amil alkohol (C₅H₁₅O), FeCl₃ 1%, bahan MHA (*Mueller Hinton Agar*), H₂SO₄ 1%, dan BaCl₂. 2H₂O 1,175%, kristal violet, larutan safarin, larutan mordant, bahan MCA (*Mac Conkey Agar*).

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan analitik, blender, gelas ukur, tabung reaksi, erlemeyer, beker gelas, corong, batang pengaduk, toples atau botol coklat, cawan petri, kertas saring, ayakan *mesh* no 40, jarum ose, pecadang, inset, mikropipet, *waterbath*, autoklav, incubator, *aluminium foil*, *Hot plate*, mistar berskala, kertas lebel, spiritus, mikroskop, kurs porselin, pipet tetes, kertas perkamen, *moisture balance*, tisu, labu destilasi, kondensor, tabung *sterling bidwell*, spidol marker, *anaerobic jar*, kaca arloji, *sterile wooden cutton*, cawan petri, kain flanel dan *rotary evaporator*.

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Pada tahap ini dilakukan determinasi pada tumbuhan daun mimba (*Azadiacta indica* A). Tujuan dari determinasi adalah menetapkan keaslian tumbuhan yang ditinjau dari ciri morfologi, makroskopis, mikroskopis daun mimba sesuai dengan pustaka dan dibuktikan melalui Laboratorium Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah.

2. Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk

Daun mimba diperoleh dari Kelurahan Rhee, Nusa Tenggara Barat. Sampel yang diambil digunakan untuk pembuatan ekstrak yaitu daun yang berwarna hijau dan tidak terlalu tua. Daun mimba yang telah dipanen akan disortir terlebih dahulu atau melalui proses sortir basah untuk memisahkan bagian yang tidak diinginkan, kemudian proses pencucian di bawah air bersih mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun, lakukan pencucian 2 sampai 3 kali lalu tiriskan. Selanjutnya daun mimba yang sudah bebas kotoran dan bersih dilakukan penimbangan untuk mendapat bobot atau berat basah. Selanjutnya daun mimba dilakukan proses pengeringan menggunakan oven dengan suhu tidak lebih dari 60°C atau menggunakan panas sinar matahari dan dialasi serta ditutup menggunakan kain hitam. Simplisia kering dilanjutkan dengan sortasi kering guna memisahkan benda-benda asing selama pengeringan, setelah itu dilakukan penimbangan kembali untuk mendapatkan bobot atau berat kering. Simplisia daun mimba dikeringkan kemudian dihaluskan menggunakan pollinator atau blender. Setelah halus simplisia daun mimba diayak menggunakan ayakan dengan *mesh* nomor 40. Selanjutnya simplisia diawetkan dalam resin untuk mencegah kelembaban dan kontaminasi dari pengotor lainnya sebelum diekstraksi (Depkes RI, 2017).

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun mimba

Susut pengeringan dilakukan pada serbuk daun mimba dengan menimbang serbuk 2 gram, lalu dilakukan pengukuran dengan *Moisture Balance*. Serbuk daun mimba hasil pengeringan kemudian ditimbang dan dihitung susut pengeringannya (Kemenkes RI, 2013).

4. Penetapan kadar air pada serbuk daun mimba

Penentuan kadar air digunakan untuk mengetahui jumlah air yang tersisa setelah proses pengeringan, penentuan kadar air dilakukan dengan metode pengeringan Sterling Bidwell. Metode ini dilakukan dengan menimbang sampel serbuk sebanyak 20 g, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut solvent (toluen, n-heksan) 200 ml dan 10 ml. Hubungkan labu steril bidwell dengan labu destilasi dan kondensor, panaskan labu destilasi dengan hati-hati selama 15 menit, ketika sampel sudah menggelembung penyulingan diatur dengan kecepatan 2 tetes/detik, dilanjutkan 4 tetes/detik. Setelah semua air tersulingkan, bagian dalam labu dicuci menggunakan toluen air jenuh. Volume air dibaca setelah pemisahan

sempurna antara air dengan toluen, hitung kadar air dalam % v/b (Depkes RI, 2017).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume Terbaca}}{\text{Bobot Bahan Uji}} \times 100\%$$

5. Pembuatan ekstrak daun mimba

Serbuk daun mimba ditimbang 1000 gram masukkan dalam bejana maserasi dan tambahkan pelarut etanol 96% 10 liter dengan perbandingan 1:10. Daun mimba yang sudah dicampur dengan etanol kemudian direndam selama 6 jam pertama serta digojok sesekali lalu diamkan selama kurang lebih 18 jam. Selanjutnya maserat atau filtrat disaring dengan kain flanel, kemudian penyaringan diulang dialasi kertas saring. Hasil maserat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C lalu diuapkan hingga menjadi ekstrak kental kemudian dihitung rendemennya (Depkes RI, 2017).

6. Penetapan kadar air pada ekstrak daun mimba

Penetapan kadar air ekstrak dilakukan dengan metode gravimetri menara botol kurs porselin terlebih dahulu kemudian menimbang ekstrak sebanyak 10 gram, lalu masukkan ke dalam oven dengan temperatur 105°C dengan durasi 5 jam dan ditimbang. Masukkan kembali kedalam oven dengan jeda 1 jam hingga memperoleh penimbangan atau hasil yang konstan dengan tidak lebih dari 0,25% atau 0,0005 g (Depkes RI, 2017).

7. Tes bebas etanol daun mimba

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara memasukkan sampel ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat, kemudian dipanaskan. Hasil uji positif apabila pada saat dipanaskan tidak tercium bau ester dan jika masih tercium bau ester maka ekstrak tersebut belum bebas etanol dan perlu diuapkan kembali. Bau khas ester ditandai dengan bau seperti buah-buahan atau wangi sedap (Wulandari, 2017).

8. Identifikasi kandungan kimia dari ekstrak daun mimba

Tujuan penentuan kandungan senyawa adalah untuk memastikan keakuratan zat yang terdapat dalam daun mimba. Penentuan kandungan kimia daun mimba meliputi penentuan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, dan triterpenoid. Identifikasi dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

8.1. Identifikasi alkaloid. Ekstrak daun mimba ditimbang 1 gram lalu masukkan ekstrak pada tabung reaksi, tambahkan 1 ml HCl 2

N dan 9 ml air, kemudian dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit. Setelah dingin, filtrasi disaring dan ditambahkan 2 tetes *Bourchard LP* dan *Mayer* pada masing-masing tabung. Hasil positif jika terdapat alkaloid ditandai pada *Mayer* terbentuk endapan gumpalan putih atau kuning larut dalam metanol, sedangkan pada *Bourchard LP* membentuk endapan coklat sampai hitam (Sulistiyani, 2018).

8.2. Identifikasi flavonoid. Ekstrak daun mimba ditimbang 1 gram lalu dimasukkan dalam tabung reaksi dan tambahkan 10 ml aquadest, dididihkan selama 5 menit kemudian saring. Filtrat ditambahkan 0,5 mg serbuk Mg secukupnya, tambahkan 3 tetes HCl lalu digojok dengan kuat. Hasil positif adanya flavonoid dilihat dari terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga (Sulistiyani, 2018).

8.3. Identifikasi saponin. Uji saponin dilakukan menimbang sebanyak 0,5 gram serbuk daun mimba, masukkan ke dalam tabung lalu tambahkan 10 ml air panas, tunggu hingga dingin, digojok dengan kuat sekitar 10 detik. Hasil uji saponin dikatakan positif jika terdapat busa selama ± 10 menit dengan tinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, busa tidak hilang (Depkes RI, 2013).

8.4. Identifikasi tanin. Tambahkan hingga 0,5 g ekstrak daun mimba ke dalam 5 ml air, masukkan ke dalam tabung reaksi, panaskan selama 3 sampai 5 menit kemudian tambahkan 2 tetes NaCl 10%. Tambahkan beberapa tetes FeCl_3 1% kemudian gojok hingga homogen. Hasil positif tanin ditunjukkan dengan warna hijau kehitaman (tanin katekol) atau biru kehitaman (tanin galat) (Sasrawan *et al.*, 2013).

8.5. Identifikasi steroid/triterpenoid. Identifikasi steroid dijalankan dengan memasukkan ekstrak daun mimba sebanyak 1 gram dalam tabung reaksi, lalu tambahkan *n*-heksana dan didiamkan selama 1-2 jam, lalu tambahkan asam asetat anhidrat dan 2 tetes HCl pekat. Adanya warna biru atau hijau ditandai dengan positif steroid, sedangkan terdapat warna merah hingga ungu menandakan positif triterpenoid (Taena, 2022).

9. Pengambilan sampel sputum

Sampel sputum diambil pada seorang pasien dengan diagnosa pneumonia, kriteria pasien yaitu termasuk pneumonia HAP, terdapat faktor resiko MDR, terdapat aspirasi, terdapat batuk produktif atau non produktif yang mampu menghasilkan sputum, sputum berwarna karat, terdapat nyeri dada, leukosit >10.000 , suara nafas bronkial dan ronki,

radiografi dengan akurasi diagnostik 75% serta 47% efusi pleura. Pengambilan sputum dengan cara mula-mula berkumur dengan air, kemudian pasien diminta batuk berdahak dengan batuk yang dalam diulang hingga sputum terkumpul \pm 5 mL. Sampel sputum yang didapatkan dalam wadah steril anti bocor. Induksi dahak dapat menimbulkan risiko infeksi tambahan bagi petugas layanan kesehatan yang bertugas (Depkes RI, 2010). Pengambilan sampel sputum dilakukan pada bulan Februari-Maret tahun 2023 di Rumah Sakit Umum Daerah Dr.Moewardi, Jawa Tengah.

10. Kultur bakteri

Kultur bakteri dilakukan pada medium agar MCA dengan menggunakan cawan petri yang dibagi menjadi 3 bagian atau dengan metode kuadran 3, dengan menggunakan spidol, kemudian jarum ose tersebut dipanaskan di atas api (spiritus) menunggu hingga dingin. Selanjutnya, ambil sampel kultur bakteri untuk inokulasi pada daerah pertama, kedua, dan ketiga dengan cara goresan zig-zag di media agar, lalu di inkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C (Soraya *et al.*, 2011).

11. Suspensi bakteri

Bakteri uji yang telah diregenarasi diambil dengan oce bulat dan disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisi 5 mL NaCl 0,9% untuk melakukan suspensi bakteri. Campuran suspensi kemudian digojok hingga mencapai kekeruhan larutan standar *Mc Farland* 0,5 $1,5 \times 10^8$ sel/mL (Poetry *et al.*, 2019).

12. Identifikasi bakteri uji

12.1. Identifikasi morfologi bakteri. Identifikasi dilakukan dengan menggoreskan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada media MCA secara penuh lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Amati pertumbuhan koloni yang terpisah (Nelci *et al.*, 2021).

12.2. Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk menentukan bahwa *Klebsiella pneumoniae* adalah Gram-negatif, ditandai dengan sel bakteri berbentuk batang berwarna merah atau merah muda. Pewarnaan Gram dilakukan dengan membuat apusan fiksatif, kemudian menempatkan crystal violet (Gram A) sebagai pewarna primer pada komposisi sampai semua bagian terwarnai, didiamkan kurang dari satu menit. Cuci dengan larutan aquadest, tambahkan mordan (lugol, siodine/Gram B) untuk memperbaiki warna, diamkan selama \pm 1 menit, lalu bilas dengan

larutan aquadest dan keringkan. Kemudian sediaan dilarutkan dengan Gram C (alkohol) dan didiamkan selama ± 45 detik, dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Biarkan larutan safarin (Gram D) selama tiga menit, lalu bilas dengan air mengalir dan keringkan. Berikan minyak imersi diatas kaca preparat bakteri, amati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 10x100 kali (Nelci *et al.*, 2021).

13. Uji biokimia

13.1. SIM (Sulfide Indol Motilitas). Melalui inokulasi tusukan, biakan bakteri murni dimasukkan ke dalam media agar kemudian dinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk memastikan apakah terdapat indol sulfida dan motilitas bakteri. Warna hitam menunjukkan hasil positif dan uji indol dianggap berhasil, setelah menerima Erhlich A dan B, terbentuk cincin merah. Pertumbuhan bakteri pada media menunjukkan uji motilitas positif (Nelci *et al.*, 2021).

13.2. KIA (Kliger Iron Agar). Bakteri murni diinokulasikan ke dalam media agar, dengan menusuk serta guratan kemudian dibiakkan selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk menentukan apakah ada fermentasi sulfida dan karbohidrat. Identifikasi ini dilihat dengan kemiringan dasar yang ditandai dengan adanya gas dan terbentuknya warna hitam di dalam media (Nelci *et al.*, 2021).

13.3. SIC (Simmon Citrat Agar). Kultur bakteri murni diinokulasikan ke media agar dengan cara menusuk dan goresan dan diinokulasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan agar mengetahui apakah bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Hasil positif ditandai dengan warna biru (Nelci *et al.*, 2021).

13.4. LIA (Lysine Iron Agar). Kultur bakteri murni diinokulasikan ke media agar dengan cara menusuk dan mengikis, kemudian dibiakkan selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengukuran ini dimaksudkan untuk mengukur fermentasi karbohidrat (glukosa, fruktosa) dan sulfida. Pengamatan dilakukan pada lereng media, dasar media, ada tidaknya gas ditandai warna hitam. Bagian lereng media ditandai dengan warna merah, bagian dasar media ditandai dengan warna kuning, adanya gas ditandai dengan media peach terangkat ke atas, sedangkan sulfida ditandai dengan terbentuknya warna hitam (Nelci *et al.*, 2021).

14. Pembuatan larutan

14.1. Larutan stok ekstrak. Larutan stok dibuat dari hasil ekstraksi yang diperoleh konsentrasi 100% kemudian diencerkan dengan aquadest sebanyak tiga kali pengenceran dengan masing-masing konsentrasi 30%, 36%, dan 42% dengan menggunakan rumus (Poetry *et al.*, 2019) :

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Keterangan :

C_1 : Konsentrasi awal larutan

V_1 : Volume awal larutan

C_2 : Konsentrasi akhir larutan

V_2 : Volume akhir larutan

14.2. Larutan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif hanya berisi medium yang sudah di gores suspensi bakteri serta ciprofloxacin 500 mg, dan kontrol negatif hanya berisi medium yang sudah digoresi suspensi bakteri serta DMSO 10% (Poetry *et al.*, 2019).

15. Pengujian aktivitas antibakteri daun mimba

Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram. Pada tahap pertama, kapas steril direndam pada suspensi bakteri yang setara dengan larutan standar yaitu larutan *Mc Farland 0,5*. Tekan kapas steril ke dinding tabung untuk mencegah cairan menetes. Kemudian, dengan menggunakan teknik swab, olesi semua area disetiap permukaan MHA dengan suspensi bakteri dan diamkan selama 5 menit. Kemudian *disc* cakram direndam pada masing-masing larutan stok konsentrasi ekstrak daun mimba yaitu 30%, 36%, dan 42%, ciprofloxacin sebagai kontrol positif, serta DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Selanjutnya konsentrasi ekstrak, kontrol positif dan negatif yang diendapkan pada media MHA yang mengandung suspensi bakteri, jarak antar pelat kertas harus cukup lebar agar bagian dalam tidak tergerus. Kertas cakram ditekan dengan pinset ke permukaan dudukan agar kertas piring dan dudukan jeli bersentuhan dengan baik. Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Setelah 24 jam lakukan pengukuran zona bening pada setiap konsentrasi ekstrak dan bahan kontrol menggunakan jangka sorong dengan satuan mm (Soraya *et al.*, 2011). Hasil pengukuran zona bening diinterpretasikan berdasarkan klasifikasi seperti pada tabel dibawah.

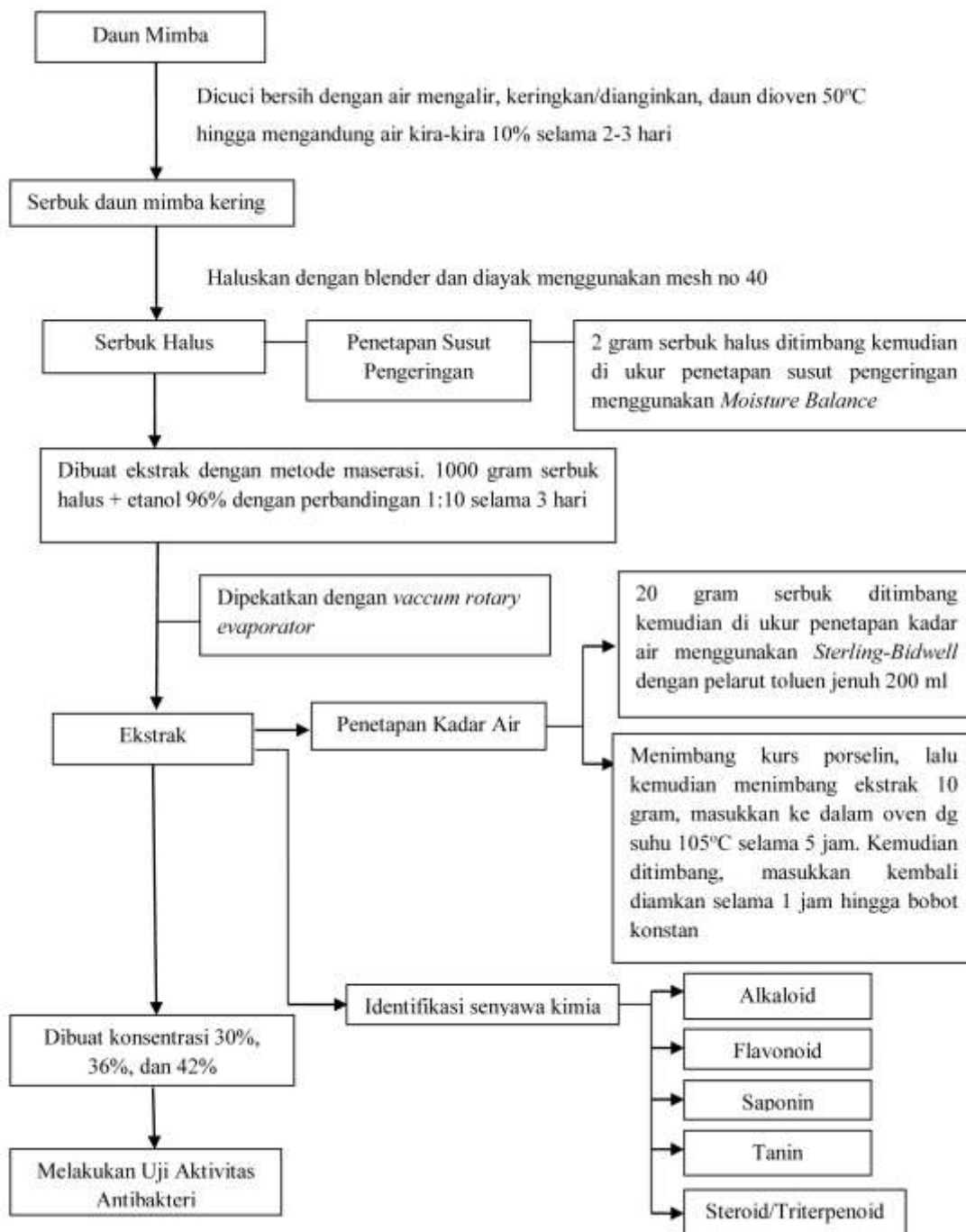
Tabel 3. Klasifikasi Respon Hambat Pertumbuhan Bakteri Berdasarkan Ahn.
(Sumber: Soraya et al., 2011).

Diameter Zona Terang	Respon Hambat Pertumbuhan
>20 mm	Kuat
16-19 mm	Sedang
10-15 mm	Lemah
<10 mm	Tidak Ada

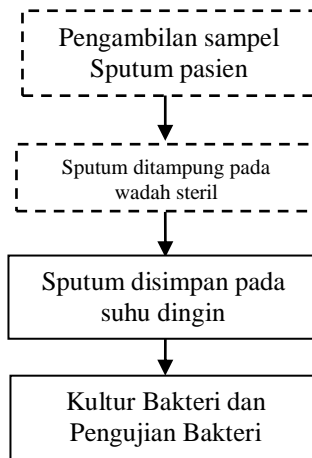
F. Analisis Data

Data hasil penelitian diperoleh diameter yang menghambat pertumbuhan organisme uji yang ditunjukkan dengan zona bening pada sekitar disc cakram yang tidak ditumbuhi bakteri, kemudian diameter diukur pada setiap sumuran di media agar. Kemudian data dianalisis secara statistik menggunakan *One Way Analysis of Variance* (ANOVA), dengan nilai $P < 0,05$ ditetapkan sebagai batas kemaknaan. Data yang tidak terdistribusi normal akan dianalisis menggunakan uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan antara masing-masing kelompok. Dilanjutkan dengan uji *Maan Whitney* untuk mengetahui signifikan perbedaan masing-masing kelompok.

G. Alur Penelitian

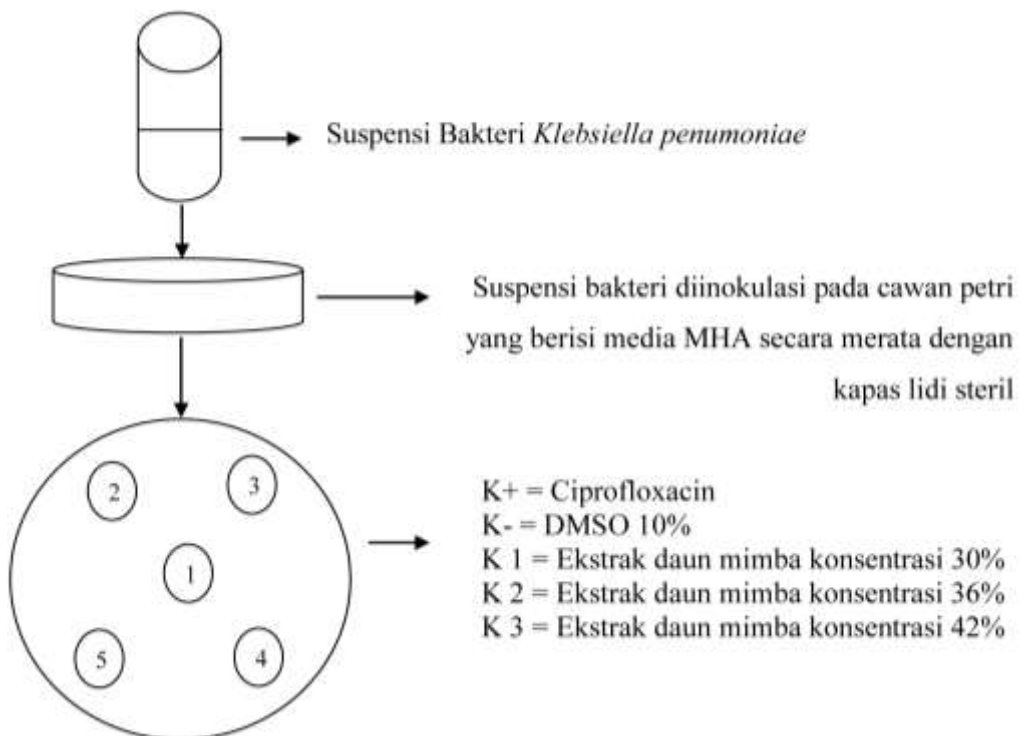
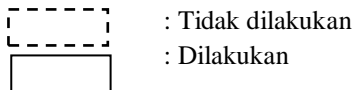


Gambar 4. Skema Pembuatan Ekstrak dan Pengujian Ekstrak Daun Mimba



Gambar 5. Skema Isolasi Sputum Bakteri

Keterangan :



Gambar 6. Skema Pengujian Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Cakram