

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

##### **A. Jenis dan rancangan penelitian**

Penelitian ini merupakan eksperimental murni dengan menggunakan metode *difusi disk*. Metode *difusi disk* untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Kertas cakram yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut (Pratiwi, 2008).

##### **B. Alat dan Bahan**

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah panci, nampan/wadah, pisau, cawan petri, oven, ose, lampu bunsen, *vortex*, gelas ukur, *beaker glass*, timbangan, baskom/ember. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih hijau (*Piper battle* L.) dan daun sirih merah (*Piper croatum*), bakteri murni *Klebsiella pneumoniae*, media MHA dan NA, BHI, antibiotik ciprofloxacin, kertas *disk* kosong, aquades.

##### **C. Determinasi Tanaman**

Bahan yang akan di determinasi adalah tanaman daun sirih hijau dan daun sirih merah. Determinasi tanaman ini dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan dalam penelitian. Determinasi harus sesuai dengan ciri-ciri morfologi tanaman terhadap kepustakaan yang dibuktikan di Laboraturium Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta dan Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu.

#### **D. Pengumpulan Bahan Uji**

Daun sirih didapatkan dari daerah Jatisrono, Wonogiri. Daun sirih yang diambil yang berumur sekitar 4 bulan dengan melihat dari ciri lebar daun yang berkisar antara 15 – 20 cm, daun tidak terlalu muda ataupun tua ditujukan dengan warna daun yang tidak terlalu terang atau gelap (Werdhany, *et al.*, 2008), karena apabila daun terlalu muda belum ada kandungan kimianya sebaliknya apabila daun terlalu tua kandungan kimianya sudah hilang jadi dibutuhkan daun yang sedang saja (tidak terlalu muda juga tidak terlalu tua) (Katno, 2008).

#### **E. Pembuatan Infusa Daun Sirih**

Pembuatan infusa mengacu pada standar dalam acuan sediaan herbal yang ditetapkan oleh BPOM (2012). Masing masing daun sirih segar ditimbang sebanyak 100 gram (Yuliani *et al.*, 2015), selanjutnya daun sirih segar dicuci lalu dilakukan perajangan, kemudian hasil rajangan dimasukkan kedalam panci infusa lalu ditambahkan aquades sebanyak 200 ml, kemudian dipanaskan dengan suhu mencapai 90<sup>0</sup>C selama 15 menit sambil sesekali diaduk. Selanjutnya cairan infusa di saring menggunakan kain flannel. Infusa daun sirih yang didapat memiliki konsentrasi 100% b/v.

Selanjutnya masing-masing infusa dibuat seri konsentrasi yaitu 60%, 80% dan 100% dari infusa daun sirih hijau dan daun sirih merah. Tujuannya untuk mengetahui seberapa besar zona hambat pada konsentrasi tersebut. Selain itu juga sebagai pembanding pada daya hambat infusa sirih tersebut.

## **F. Pembuatan Suspensi pada Bakteri *Klebsiella pneumoniae***

Pengujian daya hambat atau aktivitas antibakteri mengacu (Das *et al*, 2009), (Hermawan, 2007), dan (Risqina, 2014) kultur murni *Klebsiella Pneumoniae* disubkultur (diremajakan) dengan cara menginokulasikan 1 ose biakan murni bakteri *Klebsiella pneumoniae* kedalam media BHI yang telah disterilisasi menggunakan *autoclave*, kemudian media di inkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 24 jam. Selanjutnya media cair BHI di *vortex* dan disamakan kekeruhannya dengan McFarland nomor 2 (6,10<sup>8</sup> CFU/ml). Selanjutnya diambil sebanyak 1 ose dari stok bakteri dan di biakkan pada media NA yang telah memadat.

## **G. Identifikasi Bakteri *Klebsiella pneumonia***

### **1. Pengamatan Morfologi**

Pada morfologi bakteri *Klebsiella pneumoniae* diamati dari hasil inkubasi media NA. *Klebsiella pneumoniae* dengan cara kultur murni *Klebsiella pneumoniae* disubkultur (diremajakan) dengan cara menginokulasikan 1 ose biakan murni bakteri *Klebsiella pneumoniae* kedalam media NA yang telah disterilisasi menggunakan autoklaf lalu dibiarkan memadat, kemudian media diinkubasikan pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Sub kultur pada media dengan cara menginokulasikan 1 ose biakan murni bakteri ke dalam NA, lalu diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Setelah itu media NA yang sudah diinkubasi selama 24 jam diamati mulai dari bentuk, warna dan banyaknya bakteri yang tumbuh pada media tersebut.

## 2. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram digunakan untuk membedakan gram positif dan gram negatif, karena merupakan tahapan penting dalam langkah awal identifikasi. Pewarnaan ini didasarkan pada tebal atau tipisnya lapisan peptidoglikan di dinding sel dan banyak sedikitnya lapisan lemak pada membrane sel bakteri. Jenis bakteri berdasarkan pewarnaan gram dibagi menjadi dua yaitu gram positif dan negatif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan membrane sel selapis. Sedangkan bakteri gram negatif mempunyai dinding sel tipis berada diantara dua lapis membrane sel.

Langkah-langkah pewarnaan gram pada bakteri *Klesiella pneumoniae* yaitu dibuat preparat ulas yang telah difiksasi, selanjutnya ditetesi dengan Kristal violet sebagai pewarna utama ditunggu kurang lebih 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir. Setelah itu ditetesi kembali dengan mordant (*lugol's iodine*) dan ditunggu kembali kurang lebih 1 menit, dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya diberikan larutan pemucat (ethanol 96%/aseton) setetes demi setetes hingga etanol yang jatuh berwarna jernih. Penetesan tidak boleh banyak-banyak, kemudian dicuci dengan air mengalir. Yang terakhir ditetesi dengan safranin ditunggu kurang lebih 45 detik, dan dicuci kembali dengan air mengalir, kemudian keringkan preparat dengan kertas tissue yang ditempelkan disisi ulasan (jangan samapi merusak ulasan) lalu dibiarkan mengering diudara (Lay, 1994).

## 3. Uji Biokimia

Uji biokimia merupakan salah satu uji yang digunakan untuk menentukan spesies bakteri yang tidak diketahui sebelumnya. Media biokimia juga memiliki 3

sifat dari media dimana ada media cair, padat, semi solid. Teknik ujia biokimia yang akan digunakan adalah SIM, KIA, LIA dan CITRAT.

a. KIA (Kliger Iron Agar)

KIA adalah media gabungan yang mengandung glukosa, laktosa, phenol merah dan ferri sulfat. Bagian dasar menunjukkan bagian fermentasi glukosa, sedangkan bagian tebing menunjukkan bagian fermentasi laktosa. Gelembung udara dalam medium menunjukkan adanya pembentukan gas dari fermentasi glukosa. Warna hitam menunjukkan produksi  $H_2S$  oleh bakteri.

Langkah-langkah KIA yaitu dipijarkan ose diatas nyala lampu spirtus. Dipastikan ose tidak terlalu panas, diambil biakan kuman *Klebsiella pneumoniae* dari media cawan petri/hasil kultur. Kemudian buka tutup tabung media KIA, lalu ditusukkan gores pada media KIA. Selanjutnya kembali tutup tabung media KIA lalu ose dipijarkan lagi. Interpretasi hasil media KIA adalah apabila hasil positif hasilnya bakteri yang memfermentasikan glukosa atau laktosa akan menghasilkan asam (Bagus, 2015).

b. SIM (sulfida indol motil)

Media SIM berbentuk semi solid yaitu setengah padat setengah cair, berwarna putih didalam tabung rata. Teknik isolasinya menggunakan teknik tusuk, tujuannya sulfide untuk mengetahui apakah bakteri mampu menguraikan asam amino yang menguraikan sulfur membentuk asam sulfide ( $H_2S$ ) bereaksi denga besi (Fe) menjadi endapan Ferri sulfide ( $FeS$ ). Indol untuk mengetahui apakah bakteri menghasilkan triptopanase, menghasilkan triptopan menjadi indol dan asam piruvat, indol bereaksi dengan kovak (DAB) menghasilkan cincin merah. Motil

digunakan untuk mengetahui apakah bakteri aktif melakukan motilitas/pergerakan (Bagus, 2015).

Langkah-langkah uji biokimia SIM yaitu dengan dipijarkan ose diatas nyala lampu spirtus. Ose yang dipijarkan tidak boleh terlalu panas, selanjutnya diambil biakan bakteri *Klebsiella pneumoniae* dari media cawan petri/hasil kultur. Kemudian dibuka tutup media SIM, lalu ditusukkan pada media SIM. Ditutup kembali tabung media SIM, lalu ose dipijarkan lagi. Iterpretasi hasil SIM apabila positif sulfide/H<sub>2</sub>S endapan H<sub>2</sub>S/endapan hitam. Kemudian apabila hasil positif ciri indol/cincin merah yaitu terdapat cincin merah setelah ditambah reagen kovak pada pertemuan kedua zat tersebut. Apabila motil hasilnya positif terdapat selaput putih seperti kapas pada bagian atas media. Jadi selain hasil diatas dianggap negatif (Bagus, 2015).

#### c. LIA (Lysis Iron Agar)

Media LIA berbentuk padat, berwarna ungu didalam tabung miring. Teknik isolasinya menggunakan teknik tusuk dan gores *zig-zag*. Tujuannya untuk mengetahui apakah bakteri *Klebsiella pneumoniae* mengandung enzim decarboxilase yang akan menguraikan lysine menjadi caqaverin yang bersifat basa, karena adanya indikator *Brom Cresol Purpel* (BCP) tetap berwarna ungu.

Langkah-langkah uji LIA yaitu dipijarkan ose diatas nyala lampu spirtus. Dipastikan ose tidak terlalu panas, diambil biakan kuman *Klebsiella pneumoniae* dari media cawan petri/hasil kultur. Kemudian buka tutup tabung media LIA, lalu ditusukkan pada media LIA. Selanjutnya kembali tutup tabung media LIA lalu ose dipijarkan lagi. Iterpretasi hasil LIA yaitu apabila positif berwarna ungu apabila negatif selain warna ungu/tidak berwarna (Bagus, 2015).

#### d. Citrat

Media citrate berbentuk padat berwarna hijau didalam tabung miring. Teknik isolasinya menggunakan teknik gores *zigzag*. Tujuannya untuk mengetahui apakah bakteri *Klebsiella pneumoniae* mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal, dengan adanya indikator *Brom Tymol Blue* (BTB) media menjadi biru.

Langkah-langkah uji citrate yaitu dipijarkan ose diatas nyala lampu spirtus. Dipastikan ose tidak terlalu panas, diambil biakan kuman *Klebsiella pneumoniae* dari media cawan petri/hasil kultur. Kemudian buka tutup tabung media Citrat, lalu ditusukkan pada media Citrat. Selanjutnya kembali tutup tabung media Citrat lalu ose dipijarkan lagi. Interpretasi hasil media Citrat adalah apabila hasil positif hasilnya berwarna biru, tetapi apabila hasil negatif selain warna yang ada (Bagus, 2015).

### H. Pengujian daya hambat menggunakan metode *difusi disk*

Pengujian daya hambat pertumbuhan bakteri dilakukan dengan metode difusi *disk*. *Disk* kosong (*paper disk blank*) berukuran 5 mm masing-masing direndam infusa daun sirih merah ataupun hijau keduanya dilakukan secara terpisah, selanjutnya aquades sebagai kontrol negatif. Aquades digunakan sebagai kontrol negatif karena pelarut yang digunakan adalah aquades. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik ciprofloxacin berbentuk *disk*. Selanjutnya *paper disk* yang telah perlakuan pada masing-masing sampel dan pada masing-masing konsentrasi diletakkan diatas permukaan media MHA dengan teknik aseptis. Selanjutnya diinkubasikan dalam *incubator* pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Setiap

Pengukuran zona hambat dilakukan pada zona radikal, yaitu zona disekitar kertas cakram (*paper disk*) yang dihambat pertumbuhan bakterinya tetapi tidak

dimatikan (Inayatullah, 2012). Pengukuran zona hambat dilakukan dengan diukur sebanyak 1 kali yaitu pengukuran berdasarkan garis tengah *vertical*.

### **J. Analisis Data**

Analisis data yang dilakukan terhadap data hasil uji aktivitas antibakteri *Klebsiella pneumoniae* daun sirih hijau (*Piper betle* L.). Pada pengujian ini dilakukan dengan mengklasifikasikan diameter zona hambat yang terbentuk. Analisis diameter zona hambat yang didapat diuji distribusi normalitasnya menggunakan uji *Anova*.