

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Pada penelitian ini digunakan metode *true experimental design* dengan *post test only control group design*. Dalam penelitian ini dilakukan uji laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan efek antimikroba dari ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca*) terhadap pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Adapun uji kepekaan antimikroba yang dipakai untuk menentukan KBM adalah uji kepekaan antimikroba dengan metode dilusi tabung.

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua bakteri *Staphylococcus aureus* penyebab infeksi. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang diambil dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan \pm 1 minggu.

4.4 Jumlah Pengulangan

Untuk menghitung jumlah pengulangan dapat diketahui dengan rumus (Indra, 1999):

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

Keterangan:

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan ada 8 (1 kontrol bakteri, 7 perlakuan dosis ekstrak etanol Kulit pisang karena jumlah perlakuan (p) adalah 8, maka:

$$8(n-1) \geq 15$$

$$8n - 8 \geq 15$$

$$8n \geq 15 + 8$$

$$8n \geq 23$$

$$n \geq 2,87 \approx 3$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca*) yaitu 0%, 37,5%, 38%, 38,5%, 39%, 39,5%, 40%, dan 40,5%

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah tingkat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* untuk menentukan KBM.

4.6 Definisi Operasional

Di dalam penelitian ini ada beberapa hal yang perlu diketahui, yaitu:

- a. Sediaan ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca*) yang diperoleh dari Balai Metria Medica Batu Malang diperoleh dari hasil ekstrak kulit pisang kepok matang yang berwarna kuning dan diekstrak melalui metode maserasi dengan etanol 70%.
- b. *Staphylococcus aureus* yang digunakan di dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus*, yang berasal dari darah 4 penderita yang berbeda, yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- c. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0%, 37,5%, 38%, 38,5%, 39%, 39,5%, 40%, dan 40,5% dengan perbandingan volume ekstrak dengan volume tabung.
- d. Hasil penelitian dinyatakan dalam bentuk scoring, yaitu +3, +2, +1, 0, yang berarti +3 adalah koloni tumbuh tebal dan tidak terhitung, +2 adalah koloni tumbuh tipis dan tidak terhitung, +1 adalah koloni tumbuh tipis dan terhitung, dan 0 berarti tidak ada pertumbuhan.
- e. Kadar Bunuh Minimal (KBM) yaitu konsentrasi terendah dari antimikroba yang mampu membunuh bakteri dengan metode dilusi tabung yang ditandai dengan tidak ada pertumbuhan koloni (*skor = 0*).

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1.1 Alat

4.7.1.1 Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca*), yaitu: penggiling, penimbang, tabung ekstraksi, pengaduk, *rotary evaporator*, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, tabung pendingin, pompa sirkulasi air dingin, bak penampung air dingin, pipa plastik, pipa vakum, penampung hasil penguapan, oven dan labu penampung ekstraksi

4.7.1.2 Alat yang digunakan dalam mengidentifikasi *Staphylococcus aureus*, yaitu: bunsen, gelas objek, mikroskop, minyak emersi, kertas penghisap

4.7.1.3 Alat yang digunakan untuk uji ekstrak kult pisang, yaitu: tabung reaksi, mikropipet steril ukuran 10 μ l, incubator, vortex, bunsen, korek api, ose, penggaris, Cawan kosong dan steril dan kapas.

4.7.2 Bahan

- Ekstrak etanol kulit pisang kepok
- Aquades
- Alkohol 96%
- Bakteri *Staphylococcus aureus*
- Bahan pewarna pewarnaan Gram: crystal violet, Lugol's iodine, 96% alkohol, safranin
- Media dilusi tabung

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pembuatan Bahan Uji (ekstrak etanol kulit pisang kepok)

Bahan uji diperoleh melalui proses ekstraksi, sebagai berikut:

- 500 gram kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca*) yang segar dan berwarna kuning dikeringkan terlebih dahulu dengan oven. Kemudian kulit pisang yang sudah kering dihaluskan hingga berbentuk serbuk dengan penggilingan.
- Kemudian kulit pisang kepok yang sudah dihaluskan dimasukkan ke tabung ekstraksi.
- Menuangkan etanol ke dalam tabung ekstraksi sampai tumpah ke dalam labu lalu ditambah lagi etanol setengahnya.
- Labu yang telah berisi pelarut etanol dipanaskan hingga mendidih dengan suhu 78,5°C.
- Proses terjadinya sirkulasi kontinyu pelarut etanol diamati hingga semua ekstraksi dianggap telah terekstraksi.
- Hasil ekstraksi lalu dievaporasi. Dari proses tersebut didapatkan 50 ml ekstrak kulit pisang kepok.

4.8.2 Identifikasi Ulang Bakteri *Staphylococcus aureus*

Sebelum digunakan dalam penelitian, *Staphylococcus aureus* yang akan digunakan harus diidentifikasi ulang. Identifikasi yang dilakukan meliputi pewarnaan Gram, kultur pada media *Manitol Salt Agar* (MSA), uji katalase, dan uji koagulase ulang.

4.8.2.1 Prosedur pewarnaan Gram

- a. Mengambil isolat bakteri yang telah dipreparasi sebelumnya ke atas permukaan objek glass kemudian dikeringkan dan dilakukan fiksasi dengan api.
- b. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- c. Sediaan ditetesi lagi dengan larutan lugol kemudian ditunggu selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- d. Alkohol 96% dituang ke atas sediaan dan dibiarkan selama 5-10 detik. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Kemudian safranin dituang di atas sediaan dan dibiarkan selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- f. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dapat dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa obyektif 100x. Dicari adanya sel bakteri bersifat Gram positif (berwarna ungu), berbentuk kokus dan bergerombol.

4.8.2.2 Prosedur penanaman pada medium MSA (*Manitol Salt Agar*)

- a. Bakteri yang akan diuji *distreaking* pada medium *Manitol Salt Agar* sehingga dihasilkan koloni yang terpisah dan diinkubasi selama 24-48 jam.
- b. Dari koloni tersebut diamati sifat fermentasi manitol berupa adanya daerah terang (halo) berwarna kuning di sekitar koloni *Staphylococcus aureus*.

4.8.2.3 Tes katalase

- a. Menyediakan perbenihan cair bakteri pada gelas obyek.
- b. Sediaan tersebut ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3%.

- c. Memperhatikan ada tidaknya gelembung udara yang terjadi. Bila terjadi gelembung udara, maka katalase positif.

4.8.2.3 Tes koagulase gelas obyek

- a. Mengambil dan membersihkan gelas obyek
- b. Suspensi kuman dibuat di atas gelas obyek dari 1 tetes larutan saline/ aquades steril dengan 1 koloni bakteri dari biakan padat (NAP).
- c. Satu tetes plasma darah diteteskan pada suspensi kuman dan diusahakan agar tercampur dengan cara mennggoyangkan gelas obyek dalam arah melingkar dalam waktu 5-10 detik.
- d. Memperhatikan keberadaan gumpalan putih (*clumping*) pada sediaan tersebut. Bila tampak gumpalan putih, maka koagulase positif.

4.8.3 Suspensi Bakteri Uji

- a. Ambil koloni *Staphylococcus aureus* dengan karakteristik sama dari media *Nutrient Agar Plate* dengan menggunakan ose.
- b. Masukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth*, kemudian lakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625nm, untuk mengetahui *optical density* (OD) dari suspensi tersebut.
- c. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 /mL yang setara dengan OD (*Optical Density*) =0,1, lakukan penghitungan sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan:

N_1 = Hasil spektrofotometri

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengencer

N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^8)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10mL)

- d. Sehingga diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /mL sebanyak 10 mL
- e. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 /mL sebanyak 10mL, dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan NaCl dan *nutrient broth*, sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 /mL. Sekarang bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

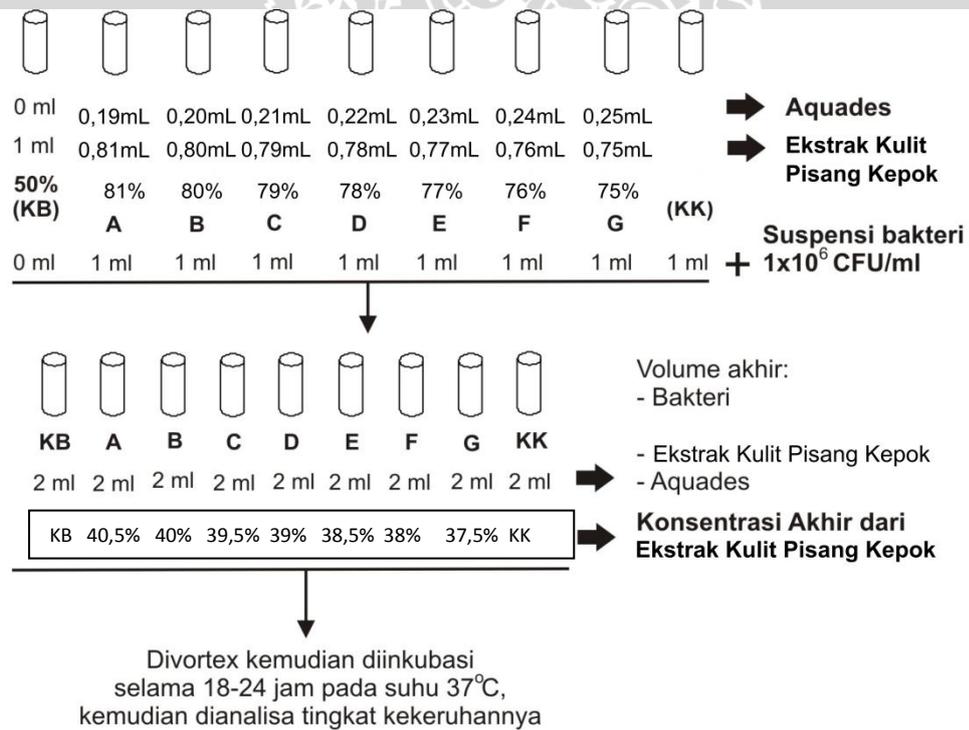
4.8.4 Uji Antimikroba Ekstrak Kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca*) terhadap *Staphylococcus aureus* (Uji Dilusi Tabung)

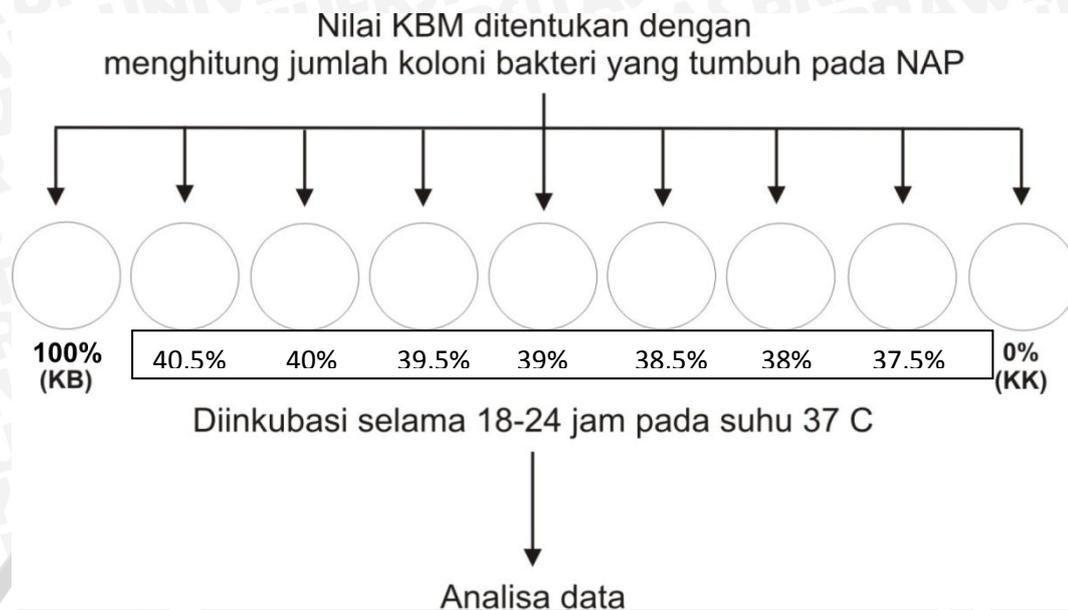
- a. Sediakan 9 tabung reaksi steril, 7 tabung sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol positif, dan 1 tabung sebagai kontrol negatif.
- b. Masukkan 0,81 ml ekstrak etanol kulit pisang kepok ke dalam tabung bertanda A lalu tambahkan 0,19 ml aquades steril sehingga mencapai konsentrasi bahan 40,5%.
- c. Masukkan 0,8 ml ekstrak etanol kulit pisang kepok ke dalam tabung bertanda B lalu tambahkan 0,20 ml aquades steril sehingga mencapai konsentrasi bahan 40%.
- d. Masukkan 0,79 ml ekstrak etanol kulit pisang kepok ke dalam tabung bertanda C lalu tambahkan 0,21 ml aquades steril sehingga mencapai konsentrasi bahan 39,5%.

- e. Masukkan 0,78 ml ekstrak etanol kulit pisang kepok ke dalam tabung bertanda D lalu tambahkan 0,22 ml aquades steril sehingga mencapai konsentrasi bahan 39%.
- f. Masukkan 0,77 ml ekstrak etanol kulit pisang kepok ke dalam tabung bertanda A lalu tambahkan 0,23 ml aquades steril sehingga mencapai konsentrasi bahan 38,5%.
- g. Masukkan 0,76 ml ekstrak etanol kulit pisang kepok ke dalam tabung bertanda A lalu tambahkan 0,24 ml aquades steril sehingga mencapai konsentrasi bahan 38%.
- h. Masukkan 0,75 ml ekstrak etanol kulit pisang kepok ke dalam tabung bertanda A lalu tambahkan 0,25 ml aquades steril sehingga mencapai konsentrasi bahan 37,5%.
- i. Masukkan 1 ml ekstrak etanol kulit pisang kepok ke dalam tabung bertanda KB (kontrol bahan).
- j. Tambahkan 1 ml biakan cair *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi bakteri 1×10^6 CFU/ml ke dalam setiap tabung kecuali tabung kontrol bahan (KB).
- k. Ambil bakteri dari tabung bertanda KN sebanyak 1 ose kemudian digoreskan pada NAP sebagai *original inoculum* kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C .
- l. Selurus tabung dikocok, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C .
- m. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KBM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung. Cara membaca derajat kekeruhan dengan membandingkan kejernihan tabung A-G dan tabung kontrol (KK dan KB) dengan bantuan kertas putih bergaris hitam tebal berbeda-beda.

- n. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada NAP yang berbeda. Kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C.
- o. Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada NAP atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di *original inoculum*.

4.9 Skema Prosedur





4.10 Analisis Data

Dari data yang diperoleh dapat dibuat analisa statistiknya. Selanjutnya dibuat grafik yang menggambarkan adanya hubungan antara ekstrak etanol kulit pisang kepok dalam berbagai konsentrasi dengan tingkat kekeruhan suspensi bakteri uji, diharapkan semakin tinggi konsentrasi larutan yang digunakan, maka semakin jernih larutan suspensi bakteri uji.

Data hasil perhitungan rerata koloni dianalisa dengan uji statistik parametrik metode *One way Anova*. Batas kepercayaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 95% ($\alpha < 0,05$). Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol kulit pisang kepok terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Analisis data menggunakan SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 16.0.