

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan menggunakan rancangan eksperimental laboratorik dengan metode dilusi agar untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun Pacar Air (*Impatiens balsamina* L.) yang dapat mempengaruhi pertumbuhan isolat bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Rancangan penelitian menggunakan lima kelompok perlakuan, ditambah dengan kontrol bakteri (0% ekstrak daun Pacar Air) dan kontrol bahan ekstrak (100% ekstrak daun Pacar Air), dengan besar sampel 4 isolat *S.aureus* masing-masing 10^6 CFU/ml.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

4.2.1 Waktu

Penelitian dilaksanakan antara bulan April - Juni 2013

4.2.2 Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Proses ekstraksi dilakukan di Politeknik Negeri Malang.

4.3 Sampel Penelitian

Dalam penelitian ini, banyaknya pengulangan yang dilakukan ditentukan berdasarkan perhitungan rumus:

$$p(n-1) \geq 15 \quad (\text{Solimun, 2001})$$

Keterangan : n = jumlah pengulangan
p = jumlah perlakuan

Pada penelitian ini, digunakan 6 konsentrasi ekstrak daun Pacar air (0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1% v/v), sehingga perhitungan pengulangan sebagai berikut:

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5 \sim 4$$

Jadi pada penelitian ini masing-masing perlakuan dilakukan empat kali pengulangan. Pada penelitian ini digunakan 4 galur bakteri uji *S.aureus*.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun Pacar Air dengan konsentrasi 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1% v/v . Konsentrasi ditentukan berdasarkan eksplorasi awal atau penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada medium agar padat.

4.5 Definisi Operasional

- Staphylococcus aureus* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 isolat yang berasal dari spesimen pus 4 pasien. *S.aureus* diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, uji katalase, uji koagulase, dan inokulasi pada medium Manitol Salt Agar (MSA).
- Daun Pacar Air (*Impatiens balsamina* L.) yang digunakan adalah daun berwarna hijau tua, berukuran 10-15cm, dan telah dipisahkan dari bagian

batangnya. Tumbuhan Pacar Air dalam penelitian ini adalah dengan bunga merah dan didapat dari Materia Medika Malang.

- c. Ekstrak daun Pacar Air (*Impatiens balsamina* L.) adalah hasil ekstrak daun Pacar Air menggunakan cara maserasi dengan etanol 96%.
- d. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang tidak terdapat pertumbuhan *S.aureus* pada media agar.
- e. Penilaian pertumbuhan koloni menggunakan skoring, yaitu:
 - 0 : tidak ada pertumbuhan koloni
 - +1 : koloni tipis, jarak renggang, tepi tipis tidak meninggi
 - +2 : koloni tipis, jarak renggang, tepi tebal tidak meninggi
 - +3 : koloni tebal, jarak rapat, tepi tebal tidak meninggi
 - +4 : koloni tebal, jarak rapat, tepi tebal meninggi

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Pacar Air

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk membuat ekstrak daun Pacar Air antara lain:

- a. Alat

Blender, kertas saring, gelas ekstraksi, seperangkat *evaporator* vakum, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotator evaporator*, tabung pendingin dan pompa sirkulasi air dingin, bak penampung air dingin, pompa vakum, tabung penampung etanol, cawan penguap, dan oven

- b. Bahan

Serbuk daun Pacar Air, etanol 96%, dan *aquadest*

4.6.2 Alat dan Bahan Uji Antimikroba Ekstrak Daun Pacar Air

a. Alat

Plate untuk media agar, ose lengkung, mikropipet 1 ml, dan inkubator.

b. Bahan

Ekstrak daun Pacar Air, perbenihan cair bakteri *S.aureus*, dan agar untuk medium.

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Identifikasi dan Tes Kepekaan Bakteri

a. Alat

Cawan petri, ose, tabung reaksi, labu erlenmeyer, termometer, inkubator, gelas obyek, bunsen, korek api, spidol permanen, pipet steril 10 ml, mikroskop, penggaris, dan kapas steril.

b. Bahan

Isolat *Staphylococcus aureus*, *nutrient Broth*, medium NAP, *aquadest*, pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alcohol 96%, safranin), minyak emersi, staphaurex (untuk tes koagulase), H_2O_2 3%, dan medium *Manitol Salt Agar* (MSA).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Identifikasi Bakteri

4.7.1.1 Pewarnaan Gram

- a. Bersihkan gelas objek dengan kapas dan lewatkan di atas api bunsen untuk menghilangkan lemak. Biarkan dingin
- b. Satu ose *aquadest* steril diteteskan pada gelas objek, kemudian diambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan *aquadest* yang telah diletakkan di atas gelas objek. Biarkan kering di udara
- c. Suspensi bakteri yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkannya di atas api beberapa kali dan sediaan siap diwarnai
- d. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama 1 menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan air perlahan-lahan
- e. Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama 1 menit, lalu lugol tersebut dibuang dan dibilas dengan air
- f. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian alkohol dibuang dan dibilas dengan air
- g. Sediaan ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama 5 menit kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air
- h. Keringkan dengan kertas penghisap. Kemudian tetesi minyak emersi amati dengan mikroskop perbesaran 1000x. Bakteri *S.aureus* berbentuk kokus Gram Positif.

4.7.1.2 Tes Koagulase

- a. Ambil dan bersihkan gelas objek
- b. Dibuat suspensi kuman pada gelas objek tersebut
 - 1 tetes larutan salin/*aquadest* steril

- tambahkan satu koloni kuman dari biakan NAP

- c. Ditambahkan satu tetes staphaurex dan campuran dengan cara menggoyang objek gelas dengan arah melingkar selama 5-10 detik.

Cara membaca: positif apabila terdapat gumpalan-gumpalan putih (*clumping*).

4.7.1.3 Tes Katalase

- a. Ambil sebagian perbenihan cair letakkan pada gelas objek
- b. Tetesi dengan larutan H_2O_2 3%

Cara membaca: positif apabila terdapat gelembung udara

4.7.1.4 Penanaman pada Medium MSA (*Manitol Salt Agar*)

- a. Bakteri yang akan diuji digoreskan pada medium *Manitol Salt Agar* sehingga dihasilkan koloni yang terpisah
- b. Inkubasi selama 24-38 jam

Cara membaca: ada daerah terang (halo) berwarna kuning disekitar koloni *S.aureus*

4.7.2 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri 10^6 CFU/ml

- a. Biakan *S.aureus* dipindahkan dalam tabung yang berisi *nutrient broth* dan diinkubasi selama 18-24 jam
- b. Dilakukan pemeriksaan spektrofotometri terhadap suspensi kuman dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui nilai absorpsinya
- c. Untuk mengetahui volume dari suspensi bakteri sehingga mengandung 10^8 CFU/ml yang setara dengan OD (*Opstical Density*) = 0,1 (Mc Farland 0,5) digunakan rumus :

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

Keterangan :

V_1 = volume bakteri yang akan ditambahkan pengencer

N_1 = nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V_2 = volume suspensi bakteri uji (10 ml)

N_2 = OD 0,1 (setara dengan Mc Farland 0,5 setara dengan 10^8 CFU/ml)

- d. Setelah didapatkan suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml, dilakukan pengenceran 10x untuk mendapatkan konsentrasi kuman 10^7 CFU/ml, caranya dengan mencampur 1 ml suspensi dengan 9 ml *nutrient broth* sebagai pengencer. Kemudian diencerkan 10x lagi untuk mendapatkan konsentrasi kuman 10^6 CFU/ml
- e. Konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml siap digunakan untuk penelitian.

4.7.3 Pembuatan Ekstrak Daun Pacar Air

4.7.3.1 Proses Ekstraksi

Daun Pacar Air dikeringkan dibawah sinar matahari. Kemudian daun tersebut dihaluskan dengan menggunakan blender dan jika telah halus ditimbang 100 g lalu dibungkus menggunakan kertas saring dan direndam dalam 300 ml etanol 96% selama semalam (\pm 24 jam). Etanol 96% yang digunakan untuk merendam, diganti beberapa kali sampai air ekstrak jernih. Kemudian hasil ekstraksi dikumpulkan dan dievaporasi.

4.7.3.2 Proses Evaporasi

Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu penampung pada unit evaporator lalu dididihkan hingga mencapai suhu 80°C (sesuai titik didih etanol) dan etanol mulai menguap. Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampungan etanol sehingga tidak tercampur, sedangkan hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum. Proses ini dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap

kemudian di oven selama 2 jam pada suhu 80°C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstrak 100%.

4.7.4 Penelitian Pendahuluan

Untuk menentukan konsentrasi ekstrak yang akan dipakai pada penelitian yang sebenarnya, terlebih dahulu dilakukan penelitian pendahuluan tentang sensitivitas bakteri *S.aureus* terhadap ekstrak daun Pacar Air secara *in vitro* dengan metode yang sama yaitu metode dilusi agar. Adapun konsentrasi ekstrak yang dipakai pada eksplorasi dimulai dari 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1,8%, 1,6%, 1,4%, 1,2% $\%_v$. Dari eksplorasi tersebut tidak dijumpai adanya pertumbuhan koloni bakteri *S.aureus* pada konsentrasi manapun. Selanjutnya konsentrasi ekstrak terus diperkecil sampai ditemukan perkiraan konsentrasi ekstrak yang representatif yaitu 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1% $\%_v$.

4.7.5 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Daun Pacar Air

Dasar penghitungan untuk menentukan konsentrasi ekstrak daun Pacar Air dalam media agar yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$X = \frac{(V_{\text{ekstrak}})}{(V_{\text{ekstrak}} + V_{\text{agar}})}$$

Keterangan :

X = konsentrasi ekstrak daun Pacar Air yang digunakan pada penelitian

V = volume

Volume total dari *agar plate* sebesar 10 ml dengan diameter plate 10 cm.

Konsentrasi ekstrak daun Pacar Air yang digunakan pada percobaan ini adalah 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1% $\%_v$, maka :

- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak daun Pacar Air 0% dibutuhkan 0 ml ekstrak daun Pacar Air dan 10 ml agar
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak daun Pacar Air 0,2% dibutuhkan 0,02 ml ekstrak daun Pacar Air dan 9,98 ml agar

- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak daun Pacar Air 0,4% dibutuhkan 0,04 ml ekstrak daun Pacar Air dan 9,96 ml agar
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak daun Pacar Air 0,6% dibutuhkan 0,06 ml ekstrak daun Pacar Air dan 9,94 ml agar
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak daun Pacar Air 0,8% dibutuhkan 0,08 ml ekstrak daun Pacar Air dan 9,92 ml agar
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak daun Pacar Air 1% dibutuhkan 0,1 ml ekstrak daun Pacar Air dan 9,9 ml agar

4.7.6 Prosedur Uji Antimikroba Ekstrak Daun Pacar Air terhadap *S.aureus*

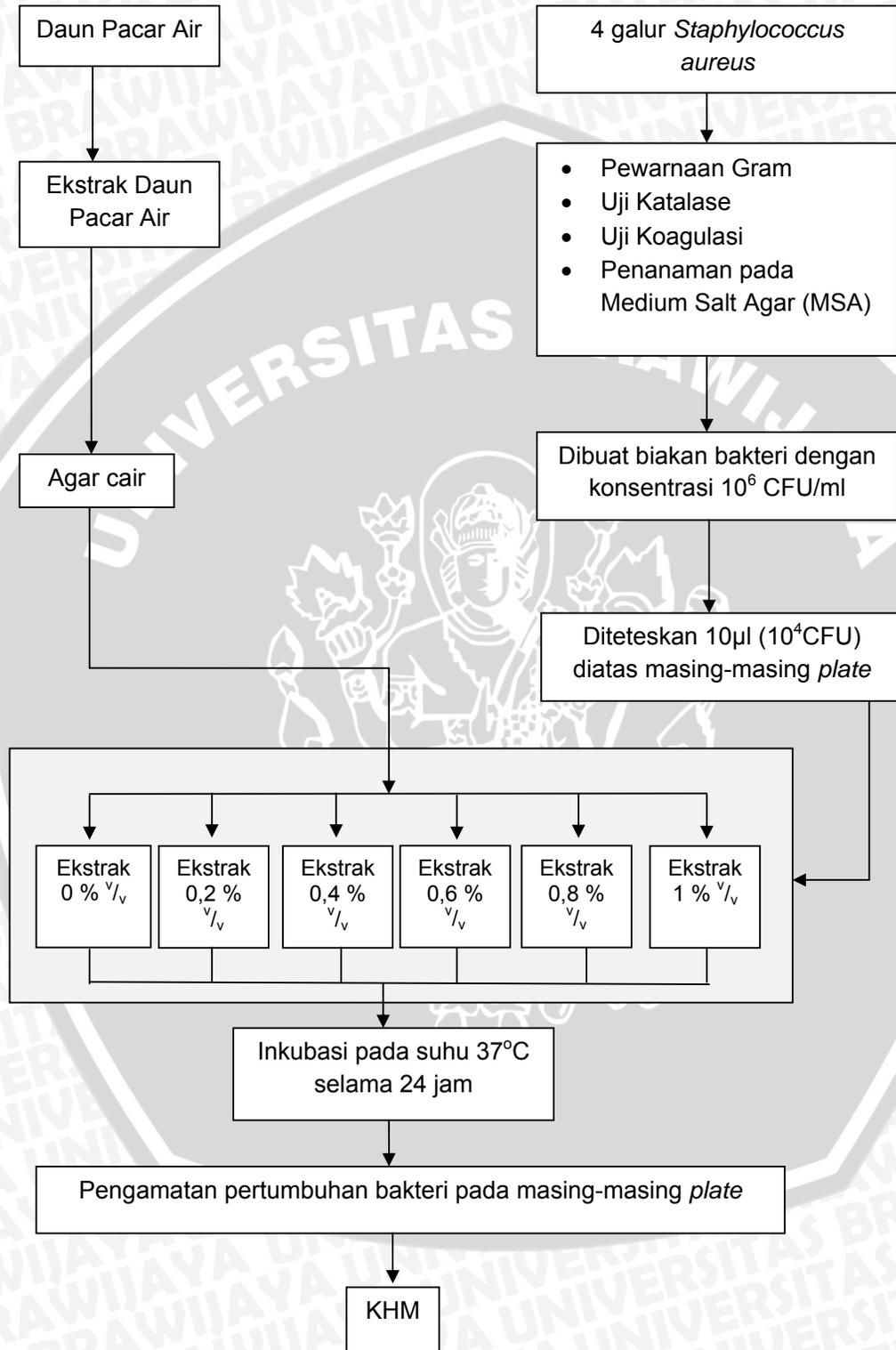
Uji kepekaan bakteri pada penelitian ini menggunakan metode dilusi agar.

Prosedurnya adalah sebagai berikut :

- a. Siapkan plate, sterilisasikan dengan autoklaf (suhu 121°C selama 15 menit). Setelah itu, dinginkan hingga mencapai suhunya 48°-50°C.
- b. Siapkan ekstrak daun Pacar Air dan agar.
- c. Campurkan sejumlah volume ekstrak Pacar Air dengan sejumlah volume agar sehingga didapatkan konsentrasi akhir ekstrak daun Pacar Air 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, dan 1% \forall .
- d. Tuang ke dalam *plate* steril dengan diameter 100 mm hingga kedalaman 3-4 mm dengan volume kurang lebih 10 ml.
- e. Pastikan pH tetap dikisaran 7,2-7,4.
- f. Dinginkan hingga memadat dan permukaannya menjadi kering.
- g. Bagi *plate* menjadi 4 bagian sama luas dengan spidol marker, untuk ditetesi 4 galur bakteri uji 10^6 CFU/ml sebanyak 10^4 CFU (Forbes, 2007).

- h. Proses penginkulasikan kuman pada NAP tidak boleh lebih dari 30 menit. Hal ini untuk menghindari perubahan konsentrasi suspensi kuman.
- i. Beri identitas konsentrasi dengan jelas pada setiap *plate*.
- j. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
- k. Lakukan pengamatan dengan menempatkan *plate* pada *background* gelap.
- l. Amati koloni *S.aureus* yang tumbuh. Konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak ada pertumbuhan koloni *S.aureus* adalah KHM.





Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data kualitatif dari jumlah koloni *S.aureus* pada medium *agar plate* yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya hasil penelitian dianalisis menggunakan uji Kruskall Wallis dan Uji Mann Whitney.

Selain itu, juga dilakukan Uji Korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian ekstrak daun Pacar Air dengan pertumbuhan koloni bakteri *S. aureus*. Dalam penelitian ini, besar kepercayaan yang dipakai adalah 95% ($\alpha=0,05$), sehingga disebut bermakna bila diperoleh $p<0,05$.

