

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah *true experimental design* dengan *posttest only control group design*. Dalam penelitian ini dilakukan uji laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan efek antimikroba dari ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill) terhadap pertumbuhan koloni *S. aureus* secara *in vitro*. Adapun uji kepekaan antimikroba yang dipakai untuk menentukan KHM adalah uji kepekaan antimikroba dengan metode dilusi agar karena KHM tidak dapat diketahui melalui metode *tube dilution test*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juni – Juli 2013.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri uji *S. aureus* yang diperoleh dari *stock kultur* di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya

4.4 Jumlah Sampel

Rumus untuk menghitung estimasi jumlah sampel adalah (Notobroto, 2005) :

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel yang diperlukan

Penelitian ini menggunakan 6 konsentrasi dari ekstrak etanol biji alpukat dan satu kontrol bakteri ($p= 6+1=7$) sehingga didapatkan jumlah sampel

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

$$6n - 6 > 15$$

$$6n > 21$$

$$n > 3,5 \approx 4$$

Jadi jumlah sampel pada penelitian ini adalah empat isolat *S. aureus*.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas (*independent variable*) dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol biji alpukat yaitu 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%^{v/v}. Penentuan konsentrasi ekstrak berdasarkan penelitian pendahuluan.

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel tergantung (*dependent variabel*) adalah tingkat pertumbuhan bakteri *S.aureus* untuk menentukan KHM

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Biji alpukat yang digunakan berasal dari buah alpukat matang yang diperoleh dari UPT Materia Medika kota Batu, Malang.

4.6.2 *S. aureus* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari isolat pus empat penderita dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml

4.6.3 Sediaan ekstrak etanol biji alpukat yang digunakan dalam penelitian adalah biji alpukat yang sudah dikeringkan dan dihaluskan, lalu diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi.

- 4.6.4 Uji Kepekaan Antimikroba menggunakan metode dilusi agar.
- 4.6.5 Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol biji alpukat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *S. aureus* ditandai dengan tidak ada pertumbuhan koloni (skoring 0).
- 4.6.6 Jumlah koloni *S. aureus* yang tumbuh dinyatakan dalam bentuk skoring, yaitu +3, +2, +1, 0. Skor +3 adalah koloni tumbuh tebal pada seluruh permukaan, +2 adalah koloni tumbuh tebal pada tepi permukaan, +1 adalah koloni tumbuh tipis, dan 0 berarti tidak ada pertumbuhan.

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan untuk identifikasi bakteri adalah ose, vortex, object glass, korek api, pembakar bunsen, kertas penghisap, mikroskop, inkubator, dan tabung reaksi kosong steril.

Alat pembuatan ekstrak etanol biji alpukat adalah oven, timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, labu penampung etanol, pendingin spiral, selang water pump, water bath, vacuum pump.

Alat uji kepekaan ekstrak etanol biji alpukat terhadap *S. aureus* terdiri dari plate kosong steril, vortex, ose, mikropipet steril ukuran 10 µl, bunsen, korek api, penggaris, inkubator, spidol permanen.

4.7.2 Bahan Penelitian

Bahan untuk identifikasi bakteri *S. aureus* adalah alkohol 70%, bahan pewarna Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), minyak emersi, MSA

plate (*Manitol Salt Agar*), larutan hidrogen peroksida, dan 0,5 ml plasma darah kelinci.

Bahan untuk pembuatan ekstrak etanol biji alpukat adalah biji alpukat, etanol 70%, aquades. Sedangkan bahan untuk tes kepekaan bakteri adalah ekstrak etanol biji alpukat, bakteri *S. aureus*, media dilusi agar *Muller Hinton*.

4.8 Operasional Penelitian

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Alpukat (Materia medika, 2012)

- a. Biji alpukat yang diperoleh dari UPT Materia Medika dibersihkan dari kulit luarnya lalu dipotong-potong, dikeringkan dibawah sinar matahari. Lalu dioven dengan suhu 60°C. Kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender.
- b. Serbuk biji alpukat ditimbang sebanyak 100 gram dimasukkan kedalam erlenmeyer
- c. Direndam dengan pelarut etanol 70% sampai tanda 1000 ml selama 48 jam
- d. Rendaman disaring menggunakan kertas saring
- e. Ampas direndam lagi dengan pelarut etanol 70% selama 24 jam
- f. Rendaman disaring kembali menggunakan kertas saring
- g. Rendaman yang diperoleh dipekatkan dengan evaporator dengan suhu $\pm 65^{\circ}\text{C}$ lalu dioven untuk menghilangkan etanol
- h. Ekstrak siap digunakan. Selanjutnya konsentrasi ekstrak dianggap 100%

4.8.2 Identifikasi Bakteri *S. aureus*

Dilakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu dengan menanam bakteri yang diduga *S. aureus* pada NAP, diinkubasi dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C .

Dilakukan identifikasi sebagai konfirmasi, masing-masing dilakukan pewarnaan Gram, tes katalase, tes koagulase dan penanaman pada medium *Manitol Salt Agar (MSA)*. Masing-masing uji konfirmasi adalah sebagai berikut:

4.8.2.1 Pewarnaan Gram (Forbes *et al*, 2007)

- a. Buatlah sediaan apusan bakteri pada gelas obyek
- b. Tuangi sediaan dengan Kristal Violet selama 1 menit. Buang sisa Kristal Violet dan bilas dengan air. Kristal violet berfungsi sebagai bahan warna dasar
- c. Tuangi adonan sediaan dengan lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air
- d. Tuangi sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas dengan dengan air.
- e. Tuangi sediaan dengan Safranin selama 0,5 menit. Buang sisa Safranin dan bilas dengan air. Safranin berfungsi sebagai warna pembanding
- f. Keringkan sediaan menggunakan kertas penghisap
- g. Lihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x.
Didapatkan *Staphylococcus sp.* berbentuk bulat dan bersifat Gram positif (berwarna ungu)

4.8.2.2 Tes Katalase (*Health Protection Agency, 2010*)

- a. Ambil sisa perbenihan cair sebagian yang sebagian telah dipergunakan untuk tes koagulase pada tabung.
- b. Tetesi dengan larutan H₂O₂ 3%.
- c. Amati pembentukan gelembung dalam waktu 10 detik.
- d. *Staphylococcus sp.* menunjukkan hasil positif (ada gelembung)

4.8.2.3 Tes Koagulase (*Forbes et al, 2007*)

- a. Ambil gelas objek
- b. Teteskan plasma darah (0,5 ml)
- c. Tambahkan perbenihan cair kuman (0,1 ml)
- d. Diamkan pada suhu 37°C, diamati setiap 0,5 jam selama 4 jam. Bila belum terjadi reaksi penggumpalan, didiamkan lagi selama 24 jam.
- e. *S.aureus* menunjukkan hasil koagulase positif (terjadi penggumpalan / *clumping*)

4.8.2.4 Penanaman pada medium *Manitol Salt Agar* (*Forbes et al, 2007*)

- a. Bakteri yang akan diuji *distreaking* pada medium *Manitol Salt Agar* sehingga dihasilkan koloni yang terpisah
- b. Diinkubasi selama 24-48 jam.
- c. *S. aureus* menunjukkan hasil adanya daerah terang (halo) berwarna kuning di sekitar koloni.

4.8.3 Pembuatan Suspensi Bakteri (10⁶CFU/ml)

- a. Beberapa koloni bakteri *S. aureus* dari NAP dipindahkan ke nutrient broth (NB) menggunakan ose

- b. Kemudian dilakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui *optical density* (OD) dari suspensi. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 ml yang setara dengan OD=0,1 (Murray, 2007) dilakukan perhitungan sebagai berikut

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Keterangan

V1 : Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N1 : Nilai Absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V2 : Volume suspensi bakteri uji yang sudah diencerkan

N2 : OD (0,1 = setara dengan 10^8 /ml)

- c. Sehingga diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /ml sebanyak 10 ml.
- d. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 /ml sebanyak 10 ml, selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan NaCl dan *nutrient broth* sehingga kuman menjadi 10^6 /ml.
- e. 1 ml kultur (dari konsentrasi bakteri 10^8 / ml) ditambahkan ke dalam 9 ml NaCl untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 10^7 /ml. Lalu proses pengenceran diulang lagi dengan menambahkan 1 ml kultur (dari konsentrasi bakteri 10^7 /ml) ke dalam 9 ml NaCl untuk mendapatkan pengenceran akhir yang mengandung konsentrasi bakteri 10^6 /ml. Konsentrasi bakteri 10^6 /ml tersebut yang digunakan dalam penelitian.
- f. Selanjutnya bakteri telah siap untuk penelitian.

4.8.4 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 biji alpukat secara *in vitro* dengan metode yang sama yaitu metode dilusi agar. Adapun konsentrasi ekstrak yang dipakai pada eksplorasi dimulai dari 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5% v/v . Dari eksplorasi tersebut tidak dijumpai adanya pertumbuhan koloni bakteri *S. aureus* pada konsentrasi manapun. Selanjutnya konsentrasi ekstrak terus diperkecil sampai ditemukan perkiraan konsentrasi yang representatif yaitu 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6% v/v .

4.8.5 Uji Efek Antimikroba Biji Alpukat Terhadap *S.aureus*

Tes dilusi agar dilakukan untuk menentukan KHM yang tidak dapat diketahui menggunakan metode dilusi tabung. Hal ini disebabkan ekstrak etanol biji alpukat berwarna keruh dan menggumpal sehingga mengganggu visualisasi untuk menentukan KHM.

Prosedur tes dilusi agar:

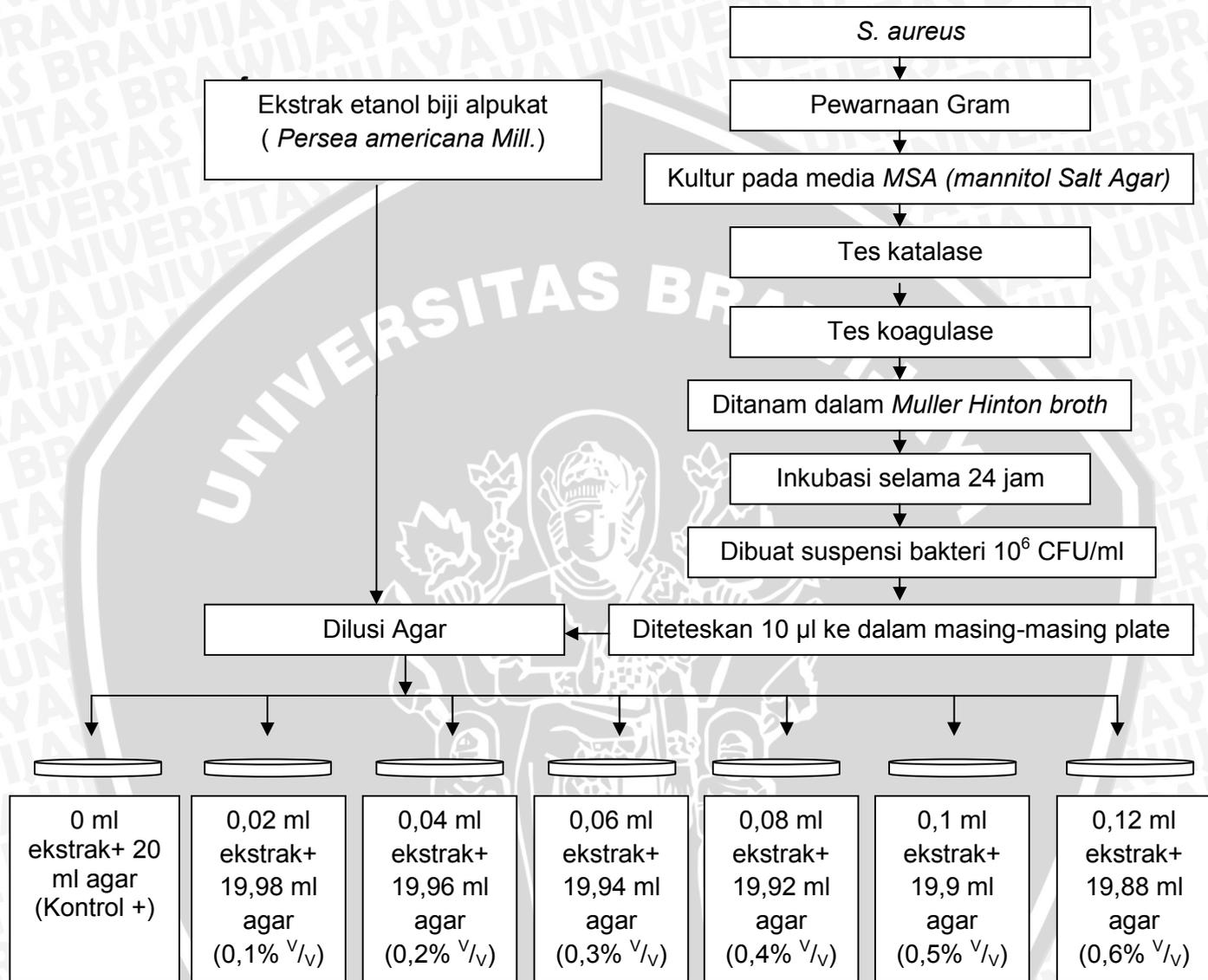
- a. Disediakan 7 *plate* steril berdiameter 9 cm dan telah diberi tanda berdasarkan persentase larutan ekstrak yang dicampur dalam dilusi agar, yaitu 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, dan 0,6% Setelah dicampur larutan ekstrak agar kemudian dipanaskan, lalu ditunggu hingga agarnya dingin.
- b. Volume yang dipakai dalam setiap *plate* untuk mencampur agar adalah 20 ml, jadi volume ekstrak yang dimasukkan ke dalam *plate* 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, dan 0,6% adalah berturut-turut 0 ml, 0,02ml,

0,04 ml, 0,06 ml, 0,08 ml, 0,1 ml, dan 0,12 ml. Sedangkan sisanya adalah volume agar yang telah dipanaskan.

- c. Bakteri uji yang dipakai adalah bakteri yang diencerkan sampai 10^6 CFU/ml.
- d. Setelah agar dingin, setiap *plate* tersebut ditandai menjadi menjadi 4 bagian yang pada setiap bagian ditetesi bakteri uji sebanyak 10^4 bakteri/10 μ l. Kemudian semua *plate* diinkubasikan selama 24 jam.
- e. Setelah itu koloni yang tumbuh pada agar *plate* dibaca. Konsentrasi ekstrak pada dilusi agar *plate* yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni dapat disebut sebagai KHM larutan ekstrak



4.8.6 Skema Prosedur



4.9 Analisis Data

Data Hasil penelitian ini adalah data kualitatif yang telah dikuantitatifkan dengan skoring dari hasil pertumbuhan *S. aureus* pada agar plate yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam berupa data konsentrasi ekstrak etanol biji alpukat dan pertumbuhan *S. aureus*. Analisis yang digunakan adalah uji statistik Kruskal Wallis, uji Mann Whitney dan uji korelasi Spearman. Dengan

menggunakan uji Kruskal Wallis, maka dapat diketahui apakah ada perbedaan pengaruh dari konsentrasi ekstrak etanol biji alpukat terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Uji Mann Whitney dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan pengaruh efek antimikroba ekstrak etanol biji alpukat dari masing masing konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Setelah itu dilakukan uji statistik korelasi spearman yang bertujuan untuk menentukan besarnya pengaruh dan arah hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol biji alpukat terhadap pertumbuhan *S. aureus* secara *in vitro*. Dalam penelitian ini, tingkat kepercayaan yang dipakai adalah 95% signifikansi (α) = 0,05.

- H_0 : Tidak terdapat perbedaan efek antimikroba pada pemberian ekstrak etanol biji alpukat antara setiap perlakuan terhadap pertumbuhan koloni bakteri *S. aureus* pada dilusi agar plate.
- H_1 : Terdapat perbedaan efek antimikroba pada pemberian ekstrak etanol biji alpukat antara setiap perlakuan terhadap pertumbuhan koloni bakteri *S. aureus* pada dilusi agar plate.