# BAB 4

# METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental, yakni *True experiment-post test only control group design*. Untuk mengidentifikasi bakteri *S. aureus* pembentuk biofilm, bakteri dikultur pada media *Congo Red Agar* selama 24 jam. Selanjutnya diamati perubahan warna yang terjadi. Untuk mengetahui efek ekstrak daun belimbing wuluh *( Averrhoa bilimbi L. )* terhadap pembentukan biofilm *S. aureus,* digunakan metode *microtiter plate test*.

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Sedangkan kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan dosis 0,01%; 0,015%; 0,02%; 0,025%; 0,03% pada tiap-tiap isolat. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan pada penelitian pendahuluan berupa uji eksplorasi konsentrasi ekstrak yang telah dilakukan oleh peneliti. Pada uji pendahuluan, bakteri *S.aureus* pembentuk biofilm diberi konsentrasi ekstrak sebesar 0,01%; 0,1%; 1%; 10%; 20%; 30% ; 40%. Dari hasil penelitian pendahuluan tersebut diketahui bahwa konsentrasi ekstrak 0,01% sudah dapat menghambat pembentukan biofilm. Sedangkan pada konsentrasi ekstrak 0,1% terjadi kesulitan pembacaan OD pada ELISA *reader* akibat ekstrak yang terlalu pekat sehingga pada penelitian ini digunakan ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi antara 0,01% sampai dengan 0,1%, yakni : 0,01%; 0,015%; 0,02%; 0,025%; 0,03%.

## 4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Daun belimbing wuluh diperoleh dari taman di sekitar Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Uji identifikasi daun belimbing wuluh dilakukan di Laboratorium Taksonomi, Struktur, dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Hasil uji identifikasi daun belimbing wuluh dapat dilihat pada lampiran 1. Pembuatan ekstrak daun belimbing wuluh dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Uji penghambatan biofilm dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Juli 2013 sampai dengan bulan Agustus 2013.

## 4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah bakteri *S. aureus*. Sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah bakteri *S. aureus* pembentuk biofilm isolat urin yang disimpan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

## 4.4 Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan sampel *S. aureus* pembentuk biofilm. Rumus untuk menghitung estimasi jumlah pengulangan adalah (Notobroto, 2005) :

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$n \geq 4$

p : perlakuan → dosis ekstrak daun belimbimbing wuluh *( Averrhoa bilimbi L. )* yaitu dosis 0,01%; 0,015%; 0,02%; 0,025%; 0,03% serta 0% sebagai kontrol positif.

n : pengulangan → berdasarkan rumus banyaknya pengulangan yang dilkakukan minimal empat kali.

Pada penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak delapan kali. Dengan banyaknya pengulangan, peneliti berharap dapat memperoleh hasil yang lebih representatif.

## 4.5 Variabel Penelitian

### 4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 0,01%; 0,015%; 0,02%; 0,025%; 0,03% serta 0% sebagai kontrol positif.

### 4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pembentukan biofilm dari bakteri *S. aureus* yang dapat dihitung menggunakan ELISA *reader*.

## 4.6 Definisi Operasional

1. *S. aureus* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *S.aureus* isolat urin galur pembentuk biofilm yang diidentifikasi dengan menggunakan metode *Congo Red Agar*.
2. Biofilm merupakan kumpulan mikroorganisme yang terperangkap dalam substratum, melekat pada suatu permukaan, dan seringkali tertanam

dalam suatu matriks polimer ekstraseluler yang diproduksi oleh mikroba itu sendiri. Dalam penelitian ini, penghambatan pembentukan biofilm akan diuji dengan menggunakan metode *microtiter plate*.

3. Metode *microtiter plate* merupakan suatu metode yang digunakan untuk mendeteksi pembentukan biofilm dan menguji efek ekstrak daun belimbing wuluh terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus.* Penelitian ini menggunakan mikrotiter dengan 96-*well plate*.
4. Ekstrak daun belimbing wuluh adalah hasil ekstraksi daun belimbing wuluh menggunakan teknik maserasi dengan pelarut ethanol 96%. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Daun belimbing wuluh berasal dari taman di sekitar Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Daun dipilih yang muda, segar dan berasal dari satu pohon. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Daun belimbing wuluh segar yang diambil adalah sekitar 500 gram. Setelah dalam bentuk simplisia, beratnya menjadi sekitar 200 gram.
5. ELISA *reader* adalah alat yang digunakan untuk menghitung *Optical Density* pada *well-microplate* yang diukur. Dari *Optical Density*, dapat ditentukan jumlah biofilm yang terbentuk di setiap *well-microplate*. ELISA *reader* yang digunakan adalah milik Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
6. *Optical Density* adalah satuan yang digunakan untuk mengukur *biomass*, *cell count,* dll. *Optical Density* ini menggunakan prinsip *refraction of light* dari ELISA *reader*.

7. *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak daun belimbing wuluh yang dapat menghambat pembentukan biofilm *S. aureus.*

## 4.7 Bahan dan Alat

### 4.7.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh *( Averrhoa bilimbi L. )*

1. Daun belimbing wuluh 500 gram
2. Pelarut ekstrak (etanol 96%)
3. Akuades
4. Oven
5. Blender
6. Saringan
7. Neraca analitik
8. Seperangkat alat evaporasi vakum, yang terdiri dari : *rotary evaporator*, pompa vakum, alat pemanas aquades (*water bath*), pipa plastik, tabung pendingin dan alat pompa sirkulasi air dingin, bak penampung air dingin, labu penampung hasil evaporasi, labu penampung etanol, batu didih, cawan penguap

### 4.7.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

1. Biakan *S. aureus* pembentuk biofilm isolat urin
2. *Mannitol Salt Agar* (MSA)
3. Bahan pengecatan gram : kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin

4. Bahan tes katalase : $H_2O_2$ 3%
5. Bahan tes latex aglutinase : reagen latex aglutinase (Staphaurex)
6. Mikroskop
7. Ose
8. Minyak emersi
9. Tabung reaksi
10. Lampu spiritus

**4.7.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm dan Efek Anti Biofilm**

1. *Microtiter plate*
2. *Congo Red Agar Plate*
3. *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*
4. Biakan *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm
5. *Tyticase Soy Broth* (TSB) dengan 1% glukosa
6. *Phospate Buffer Saline* (PBS) PH 7,3
7. Kristal violet 0,2 mL 2%
8. HCl Isopropanol 200 µl
9. Ekstrak daun belimbing wuluh *( Averrhoa bilimbi L. )* dengan konsentrasi : 0,01%; 0,015%; 0,02%; 0,025%; 0,03%
10. ELISA *reader*

**4.8 Prosedur Penelitian**

**4.8.1 Persiapan Daun Belimbing Wuluh *( Averrhoa bilimbi L. )***

**4.8.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi**

Proses ekstraksi daun belimbing wuluh dilakukan dengan teknik maserasi menggunakan pelarut etanol 96% .

**Proses Ekstraksi**

1. Daun belimbing wuluh segar/basah 500 gram dikeringkan dengan sinar matahari secara tidak langsung atau diangin-anginkan.
2. Kemudian masukkan daun belimbing wuluh tersebut ke dalam oven agar menjadi kering secara sempurna dengan suhu oven 60º C.
3. Setelah kering, daun belimbing wuluh diblender lalu ditimbang menggunakan neraca analitik. Kemudian, diambil serbuk kering sebanyak 100 gram.
4. Kemudian serbuk daun belimbing wuluh dibungkus kertas saring, dimasukkan ke dalam tabung untuk direndam dengan etanol.
5. Pelarut etanol dimasukkan ke dalam tabung tersebut sampai serbuk yang ada di dalam kertas saring terendam dalam pelarut etanol selama semalam.
6. Hasil ekstrak dalam etanol selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan ekstrak daun belimbing wuluh dengan pelarut.

**Proses Evaporasi**

1. Alat evaporasi dirangkaikan sehingga membentuk sudut 30º -40º, dari bawah ke atas, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator,* dan tabung pendingin.
2. Selain tabung pendingin dihubungkan dengan alat pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak air dingin melalui

pipa plastik, tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan labu penampung hasil penguapan.

3. Labu penampung hasil evaporasi diisi dengan hasil ekstraksi, kemudian dirangkai kembali, *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin, dan pompa vakum semua dinyalakan.
4. Pemanas aquades dinyalakan juga sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi ikut mendidih dan pelarut etanol mulai menguap.
5. Hasil penguapan etanol akan dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap yang lain disedot dengan alat pompa vakum.
6. Proses ini ditunggu hingga hasil ekstraksi yang dievaporasi volumenya berkurang dan menjadi kental. Setelah kental proses evaporasi dapat dihentikan dan hasil evaporasi diambil.
7. Hasil evaporasi kemudian ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven pada suhu 50ºC -60ºC selama 1-2 jam, untuk menguapkan pelarut yang tersisa.
8. Didapatkan hasil ekstrak daun belimbing wuluh 100 %. Hasil ini lah yang akan digunakan dalam percobaan.

#### 4.8.1.2 Pembuatan Larutan

Ekstrak awal dianggap memiliki konsentrasi 100%.

Kemudian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan induk ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 1%. Pembuatan larutan induk dilakukan untuk mempermudah pengenceran selanjutnya.

1% → $V_1 . M_1 = V_2 . M_2$

$X . 100 = 100 . 1$

$X = 1$ ml

= 1 ml (ekstrak 100%) + 99 ml akuades steril

Dari stok 1% dibuat ekstrak dengan konsentrasi 0,01%, 0,015%, 0,02%, 0,025%, 0,03%

0,01% → $V_1 . M_1 = V_2 . M_2$

$X . 1 = 10 . 0,01$

$X = 0,1$

= 0,1 ml (ekstrak 1%) + 9,9 ml akuades steril

0,015% → $V_1 . M_1 = V_2 . M_2$

$X . 1 = 10 . 0,015$

$X = 0,15$

= 0,15 ml (ekstrak 1%) + 9,85 ml akuades steril

0,02% → $V_1 . M_1 = V_2 . M_2$

$X . 1 = 10 . 0,02$

$X = 0,2$

= 0,2 ml (ekstrak 1%) + 9,8 ml akuades steril

0,025% → $V_1 . M_1 = V_2 . M_2$

$X . 1 = 10 . 0,025$

$X = 0,25$

= 0,25 ml (ekstrak 1%) + 9,75 ml akuades steril

0,03% → $V_1 . M_1 = V_2 . M_2$

$X . 1 = 10 . 0,03$

$X = 0,3$

= 0,3ml (ekstrak 1%) + 9,7 ml akuades steril

### 4.8.2 Persiapan Bakteri *Staphylococcus aureus* Pembentuk Biofilm

#### 4.8.2.1 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

**A. Pemeriksaan Mikroskopis** (Forbes *et al*., 2007)

1. Pembuatan sediaan slide
   - Bersihkan gelas objek dengan kapas, kemudian lewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak.
   - Biarkan dingin.
   - Buatlah sediaan sedemikian rupa sehingga tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis.
   - Biarkan sediaan kering di udara, kemudian lakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
2. Pewarnaan Gram

   a. Tuang sediaan pada gelas objek dengan kristal violet selama 1 menit. Buang sisa kristal violet dan bilas dengan air.

b. Tuang sediaan dengan lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
c. Tuang sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas dengan air.
d. Tuang sediaan dengan safranin selama ½ menit. Buang sisa safranin dan bilas dengan air.
e. Keringkan sediaan dengan kertas penghisap.
f. Lihat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 100x.

**B. Tes Katalase**

a. Teteskanlah satu tetes larutan $H_2O_2$ 3% di gelas objek
b. Usapkan sedikit biakan bakteri di larutan tersebut
c. Amati pembentukan gelombung dalam waktu 15 detik.
d. Hasil positif bila ada gelembung, negatif bila tidak terbentuk gelembung.
e. Jika positif menunjukkan *Staphylococcus aureus* dan jika negatif menunjukkan *Streptococcus aureus*.

**C. Tes Latex Aglutinase**

a. Ambil sedikit biakan bakteri dengan ose.
b. Usapkan ose pada slide yang sudah disediakan
c. Teteskan reagen latex aglutinase (Staphaurex)
d. Tunggu hingga 20 detik
e. Hasil positif bila terjadi aglutinasi pada slide
f. Hasil negatif bila tidak ada aglutinasi pada slide

#### 4.8.2.2 Persiapan Perbenihan Cair Bakteri *S.aureus*

1. Setelah dipastikan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri *S. aureus,* bakteri dipindahkan dalam tabung yang berisi *Trypticase Soy Broth glucose* (TSB*glu*) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
2. Dilakukan pengeceran pada perbenihan cair bakteri sehingga didapatkan konsentrasi bakteri $10^8$ CFU/ml.
3. Dari konsentrasi bakteri $10^8$ CFU/ml dilakukan pengenceran dengan menambahkan 1ml perbenihan ($10^8$ CFU/ml) ke dalam 9ml TSB*glu* untuk mendapatkan konsentrasi sebesar $10^7$ CFU/ml.
4. Kemudian dilakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1ml perbenihan cair ($10^7$ CFU/ml) untuk ditambahkan pada 9ml TSB*glu* sehingga akhirnya didapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu sebesar $10^6$ CFU/ml.

### 4.8.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

#### 4.8.3.1 Congo Red Agar Method (Bose *et al*., 2009)

1. *Congo Red Agar* (CRA) yang telah disiapkan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
2. *S. aureus* diinokulasi pada CRA.
3. CRA ini lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37ºC.
4. Hasil positif ditunjukkan dengan koloni yang berwana hitam.
5. Hasil negatif ditunjukkan dengan koloni yang berwarna merah muda.

### 4.8.4 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm (Bos*e et al.*, 2009)

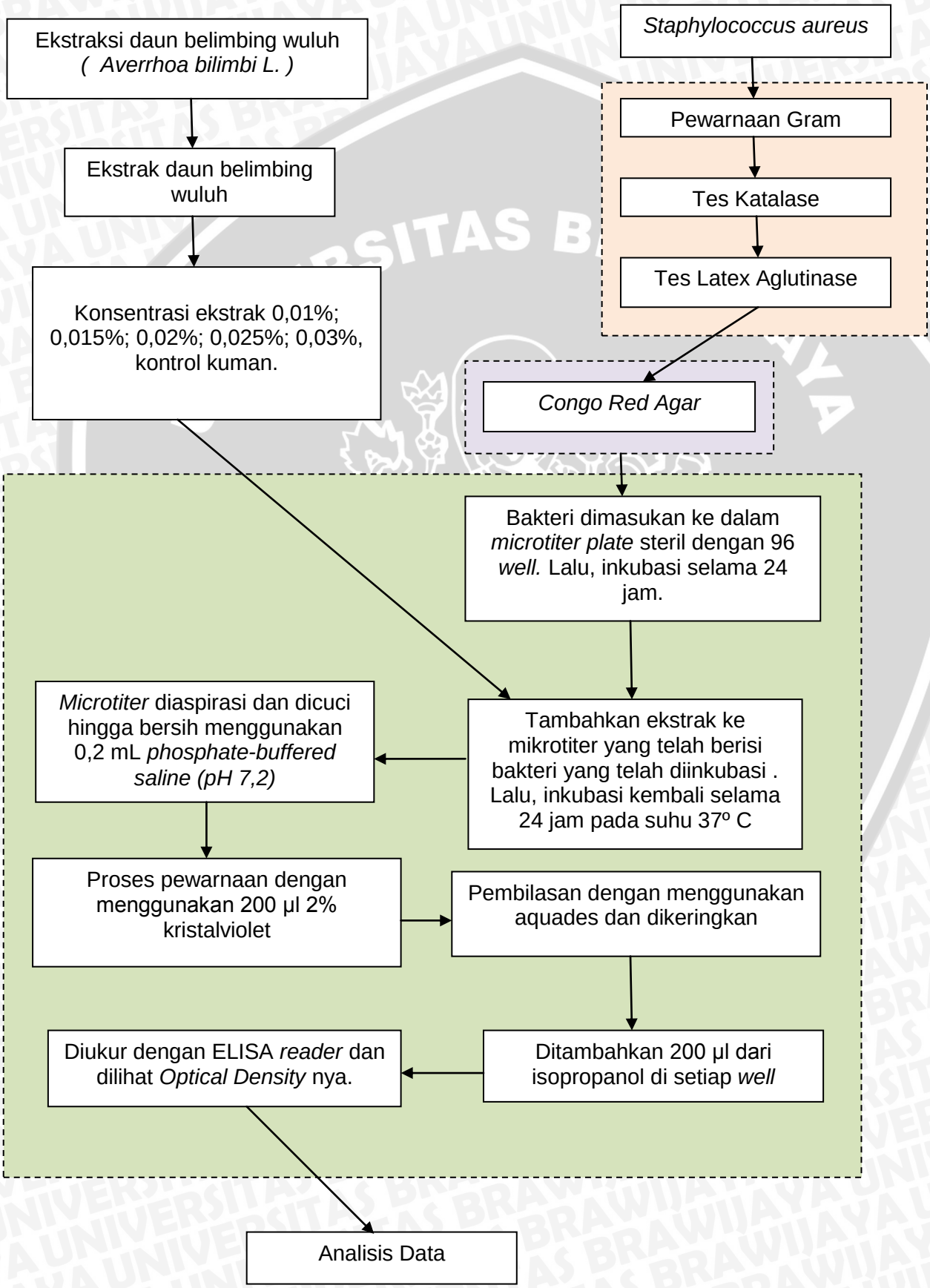
1. Kultur *S. aureus* selama 24 jam pada *Trypticase Soy Broth glucose* (TSB*glu*) didilusi sampai 1:100 pada TSB*glu*

2. Kemudian 200 µl *S. aureus* konsentrasi $10^6$ bakteri/ml diisikan pada baris pertama 96-*well flat-bottomed plastic tissue culture plate*. Lalu diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam.
3. Kemudian di tiap kolomnya ditambahkan 200 µl ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 0,01%; 0,015%; 0,02%; 0,025%; 0,03% serta 0% sebagai kontrol positif. Mikrotiter diinkubasi 24 jam dengan suhu 37ºC.
4. Setelah itu, isi setiap mikrotiter diaspirasi dan dicuci 3 kali menggunakan 200 µl *phosphate-buffered saline (pH 7,2)*. *Well-plates* dikocok secara hati-hati untuk menghilangkan seluruh bakteri yang tidak menempel.
5. Lalu dilakukan pengecatan dengan *crystal violet*.
6. Kemudian dilakukan pembilasan dengan menggunakan aquades dan dikeringkan.
7. Untuk menganalisis secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 200 µl dari HCl isopropanol di setiap *well*.
8. Kemudian dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) pada 570 nm menggunakan ELISA *reader*. Prosedur ini diulang sebanyak delapan kali.

### 4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa data kuantitatif didapatkan dari pembacaan pada ELISA *reader* yang berupa *Optical Density* setiap *well-plates* yang diberi perlakuan berbeda, yaitu pemberian ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 0,01%; 0,015%; 0,02%; 0,025%; 0,03% serta 0% sebagai kontrol positif. Analisis yang digunakan adalah uji *one-way Anova,* uji *Post-Hoc Comparison Test* serta uji regresi linier. Semua perangkat analisis menggunakan fasilitas *SPSS 16.0* dari *Windows*.

**4.10 Skema Penelitian**



repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA