

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Penelitian dilakukan dengan rancangan eksperimental laboratoris untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Desain penelitian ini adalah *true experiment post-test only group design* dengan menggunakan metode tabung. Dari metode ini akan didapatkan hasil yang kualitatif mengenai pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*.

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan dosis 5% (50 µl/ml), 2,5% (25 µl/ml), 1,25% (12,5 µl/ml), 0,625% (6,25 µl/ml), dan 0,3125% (3,125 µl/ml).

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus*. Sampel penelitian ini diperoleh dari isolat *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

##### 4.2.1 Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan sampel *Staphylococcus aureus* strain pembentuk biofilm. Rumus untuk menghitung estimasi jumlah pengulangan yaitu:

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

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5 \text{ (Notobroto, 2005)}$$

p: perlakuan → Dosis ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) (5 perlakuan)

yaitu dosis 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, dan 0,3125%.

n: pengulangan

Berdasarkan rumus, banyaknya pengulangan yang digunakan pada setiap perlakuan adalah minimal 5 kali.

### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak daun sirih merah dilakukan di Laboratorium Materia Medika Batu. Uji penghambatan biofilm dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan April 2013 - Mei 2013.

### 4.4 Variabel Penelitian

#### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak daun sirih merah.

Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, dan 0,3125%.

#### 4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pembentukan biofilm oleh *Staphylococcus aureus*.

#### 4.5 Definisi Operasional

1. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif berbentuk kokus, bergerombol seperti buah anggur, menunjukkan tes katalase positif dan tes koagulase positif, membentuk koloni berwarna kuning emas pada *Nutrient Agar Plate*. *Staphylococcus aureus* yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* strain pembentuk biofilm yang diperoleh dari stok kultur bakteri *Staphylococcus aureus* Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan diidentifikasi dengan metode tabung.
2. Biofilm adalah agregat multiseluler yang membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat / media. Pada penelitian ini biofilm dibentuk oleh *Staphylococcus aureus* pada media tabung.
3. Ekstrak daun sirih merah adalah hasil ekstraksi cair daun sirih merah dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Daun sirih merah berasal dari kota Batu dan telah disertifikasi oleh Materia Medika Batu. Daun dipilih yang segar dan berasal dari satu pohon.
4. Metode tabung adalah metode deteksi biofilm dengan menggunakan tabung sebagai media.
5. Pengamatan kualitatif digunakan untuk menentukan pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* berdasarkan warna ungu yang dapat dilihat dengan mata telanjang pada dinding dan dasar tabung. Formasi cincin pada permukaan cairan mengindikasikan formasi biofilm.

6. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi ekstrak daun sirih merah terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan tidak tampaknya bentukan cincin dan lapisan ungu kebiruan pada dinding dan dasar tabung.

#### 4.6 Instrumen Penelitian (Bahan dan Alat)

##### 4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah

1. neraca analitik
2. klem statis
3. erlemeyer 500 cc
4. corong gelas
5. gelas ukur 100 cc
6. satu set alat evaporasi (pendingin spiral, evaporator, vakum, labu pemisah hasil ekstraksi, dan labu penampung pelarut)
7. selang plastik
8. gelas beker
9. *water pump*
10. *water bath*
11. bak penampung aquades
12. botol penampung

##### 4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri Pembenihan Murni

1. isolate *Staphylococcus aureus*
2. NAP (*Natrium Agar Plate*)
3. bahan tes Katalase :  $\text{H}_2\text{O}_2$  3 %
4. bahan tes Koagulase : plasma koagulase

5. bahan pengecatan Gram : kristal violet, lugol, alkohol 96 %, dan safranin
6. minyak emersi, alat ose, dan mikroskop
7. lampu spiritus
8. tabung reaksi.

#### 4.6.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. *Trypticase Soy Broth* (TSB) dengan 1% glukosa (TSBglu)
2. biakan *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm
3. tabung reaksi
4. *Phospate Buffer Saline* (PBS) PH 7,3
5. kristal violet
6. *deionized water*
7. kawat ose
8. pipet
9. *Beaker glass*

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Persiapan Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*)

###### 4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi

###### A. Pengolahan Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*)

1. Daun sirih merah dicuci dari kotoran, tiriskan, lalu keringkan dari air, selanjutnya ditimbang.
2. Daun dikeringkan dengan sinar matahari (diangin-anginkan).
3. Daun sirih merah kering diblender sehingga teksturnya menjadi halus (Anonymous, 2003).

o

### B. Prosedur Ekstraksi

1. Daun sirih merah yang sudah bertekstur halus lalu ditimbang dalam neraca analitik seberat 100 gram, kemudian dimasukkan ke dalam kertas saring yang berbentuk kantong.
2. Kertas saring yang berisi bubuk daun sirih merah dimasukkan ke dalam gelas beker 1000 ml lalu direndam dalam etanol 96% selama 1 minggu (2-3 kali ganti etanol 96%).
3. Setelah didapatkan larutan sebanyak 1,5 L selanjutnya dievaporasi.

### C. Proses Evaporasi

1. Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja percobaan. Kemudian pindahkan hasil ekstraksi, termasuk batu didihnya, dari labu destilasi ke labu pemisah ekstraksi.
2. Hubungkan labu pemisah ekstraksi pada bagian bawah evaporator; hubungkan labu penampung etanol 96% pada bagian atas evaporator; hubungkan pendingin spiral vakum dengan selang plastik; hubungkan pendingin spiral dan *water pump* dengan selang plastik.
3. Tempatkan *water pump* dalam bak yang berisi aquades, *water pump* dihubungkan dengan sumber listrik sehingga aquades akan mengalir memenuhi pendingin spiral. Tunggu hingga air mengalir dengan merata.
4. Letakkan satu set alat evaporasi sehingga labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *water bath*.
5. Hubungkan vakum dan *water bath* dengan sumber listrik dan naikan suhunya sekitar 70-80°C (sesuai dengan titik didih etanol 96%).

6. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi (selanjutnya disebut sampel) tertampung di dalam labu pemisah ekstraksi selama  $\pm$  4 jam.
7. Hasil evaporasi kemudian selanjutnya dioven dengan suhu 70-80°C sampai etanol menguap semua (Harbone, 1984).

#### 4.7.1.2 Penyiapan Larutan Ekstrak Daun Sirih Merah

Ekstrak daun sirih merah pertama – tama diencerkan dahulu sehingga diperoleh 5 konsentrasi ekstrak sirih merah yang berbeda yaitu :

Tabung 1 : 10%

Tabung 4 : 1,25%

Tabung 2 : 5%

Tabung 5 : 0,625%

Tabung 3 : 2,5%

Pengenceran dilakukan dengan rumus :  $N1 \times V1 = N2 \times V2$

N1 : konsentrasi awal ekstrak

N2 : konsentrasi yang diinginkan

V2 : volume larutan ekstrak yang dibutuhkan

Contoh untuk konsentrasi ekstrak 10% :  $100 \times V1 = 10 \times 3ml$

V1 =  $30/100ml$

V1 =  $300\mu l$

Berdasarkan perhitungan di atas, ekstrak daun sirih merah dimasukkan pada tabung reaksi steril masing-masing, yaitu:

Tabung 1 :  $300\mu l$

Tabung 4 :  $37,5\mu l$

Tabung 2 :  $150\mu l$

Tabung 5 :  $18,75\mu l$

Tabung 3 :  $75\mu l$

Aquades steril dimasukkan pada masing-masing tabung, yaitu:

Tabung 1 : 2,7 ml

Tabung 4 : 2,9625 ml

Tabung 2 : 2,85 ml

Tabung 5 : 2,98125 ml

Tabung 3 : 2,925 ml

Dari pengenceran tersebut didapatkan konsentrasi ekstrak 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, dan 0,625%. Sehingga konsentrasi ekstrak sirih merah setelah ditambah bakteri dan TSBGlu adalah 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, dan 0,3125%.

#### 4.7.2 Persiapan Biofilm *Staphylococcus aureus*

##### 4.7.2.1 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

###### A. Pemeriksaan Mikroskopis

###### 1. Pembuatan sediaan slide

Membersihkan 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 dengan cara:

- Teteskan satu ose aquades steril pada gelas objek. Ambil sedikit biakan kuman menggunakan ose, selanjutnya suspensikan dengan aquades pada gelas objek dan ratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
- Biarkan sediaan kering di udara, kemudian lakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.

###### 2. Pewarnaan Gram

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



- Tuang sediaan dengan lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
- Tuang sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas dengan air.
- Tuang sediaan safranin selama ½ menit. Buang sisa safranin dan bilas dengan air
- Keringkan sediaan dengan kertas penghisap
- Lihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x (Forbes *et al*, 2007)

### B. Tes Katalase

- Tuangkan 0,2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % ke dalam tabung reaksi.
- Ambil sedikit biakan bakteri dengan ose.
- Usapkan ose pada dinding tabung di atas permukaan cairan.
- Tutup tabung reaksi, lalu goyangkan agar cairan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % dapat mengenai usapan biakan bakteri.
- Amati pembentukan gelembung dalam waktu 10 detik.
- Hasil positif bila ada gelembung
- Hasil negatif bila tidak ada gelembung

Hasil keseluruhan:

Hasil positif menunjukkan *Staphylococcus sp.*

Hasil negatif menunjukkan *Streptococcus sp.* (Health Protection Agency, 2010)

### C. Tes Koagulase

#### Slide Test

- Teteskan satu ose plasma darah dengan EDTA pada gelas objek yang kering & bersih (gelas objek A)
- Teteskan air distilasi / air salin sebagai kontrol pada gelas objek B
- Ambil sedikit biakan kuman dengan ose. Buat suspensi dengan masing-masing gelas objek dan diratakan perlahan selama 5-10 detik
- Hasil positif bila terjadi penggumpalan dalam waktu 10 detik atau kurang pada gelas objek A dan tidak ada penggumpalan pada gelas objek B
- Hasil negatif bila tidak ada penggumpalan pada kedua gelas objek

Hasil keseluruhan:

Hasil positif menunjukkan *Staphylococcus aureus*

Hasil negatif menunjukkan *Staphylococcus* koagulase negatif (Forbes *et al*, 2007)

#### 4.7.2.2 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

*Staphylococcus aureus* yang sudah ditanam dalam medium *Nutrient Agar Plate* (NAP) dikultur dalam medium *Nutrient Broth* (NB) selama 24 jam dalam inkubator 37°C. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* pada medium NB dilakukan pengukuran spektrofotometri dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 610nm sehingga diketahui kepadatan bakterinya (OD = *Optical density*). Kemudian dengan rumus pengenceran  $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ , kepadatan bakteri tersebut diencerkan satu kali dengan TSBglu menjadi  $10^8$  bakteri/mL. Dasar penghitungannya sebagai berikut:

Apabila diperoleh OD bakteri hasil spektrofotometri = 2,211 (N1)

OD bakteri dengan kepadatan  $10^8$  bakteri/mL = 0,1 (N2)

Volume suspensi bakteri dalam satu tabung = 3 ml (V2)

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

$$2,211 \times V1 = 0,1 \times 3$$

$$V1 = 0,3/2,211 = 0,135 \text{ ml}$$

Suspensi bakteri sebanyak 0,135 ml diambil dan ditambah dengan 2,211 mL

TSBglu menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan  $10^8$  bakteri/ml.

#### 4.7.2.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (metode tabung)

*Staphylococcus aureus* yang sudah teridentifikasi ditanam dalam *Nutrient Broth* dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  semalam. Bakteri yang sudah tumbuh pada *Nutrient Broth*, ditanam kembali pada NAP (sebanyak  $40 \mu\text{L}$ ) kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  semalam. Mikroba kultur semalam dimasukkan ke tabung *TSBglu* (10 ml) dan diinkubasikan  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Lalu tabung di cuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*. Tabung dikeringkan dan dilihat formasi biofilmnya (Christensen *et al.*, 2000).

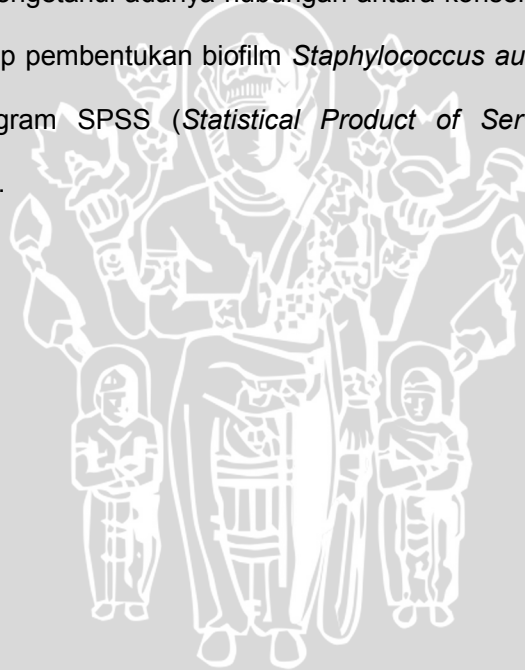
#### 4.7.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Perbenihan cair bakteri dengan kepadatan  $10^8$  bakteri/ml dimasukkan ke tabung sebanyak 3 ml dan diberi ekstrak daun sirih merah sehingga konsentrasi ekstrak sirih merah masing – masing tabung menjadi 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, dan 0,3125% dan diinkubasikan  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Setelah 24 jam tabung dikeluarkan dari inkubator dan dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan

dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) lalu kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*. Tabung dikeringkan. Formasi biofilm yang terbentuk dilihat dan dicatat. Untuk lebih jelas dapat dilihat pada Gambar 4.1.

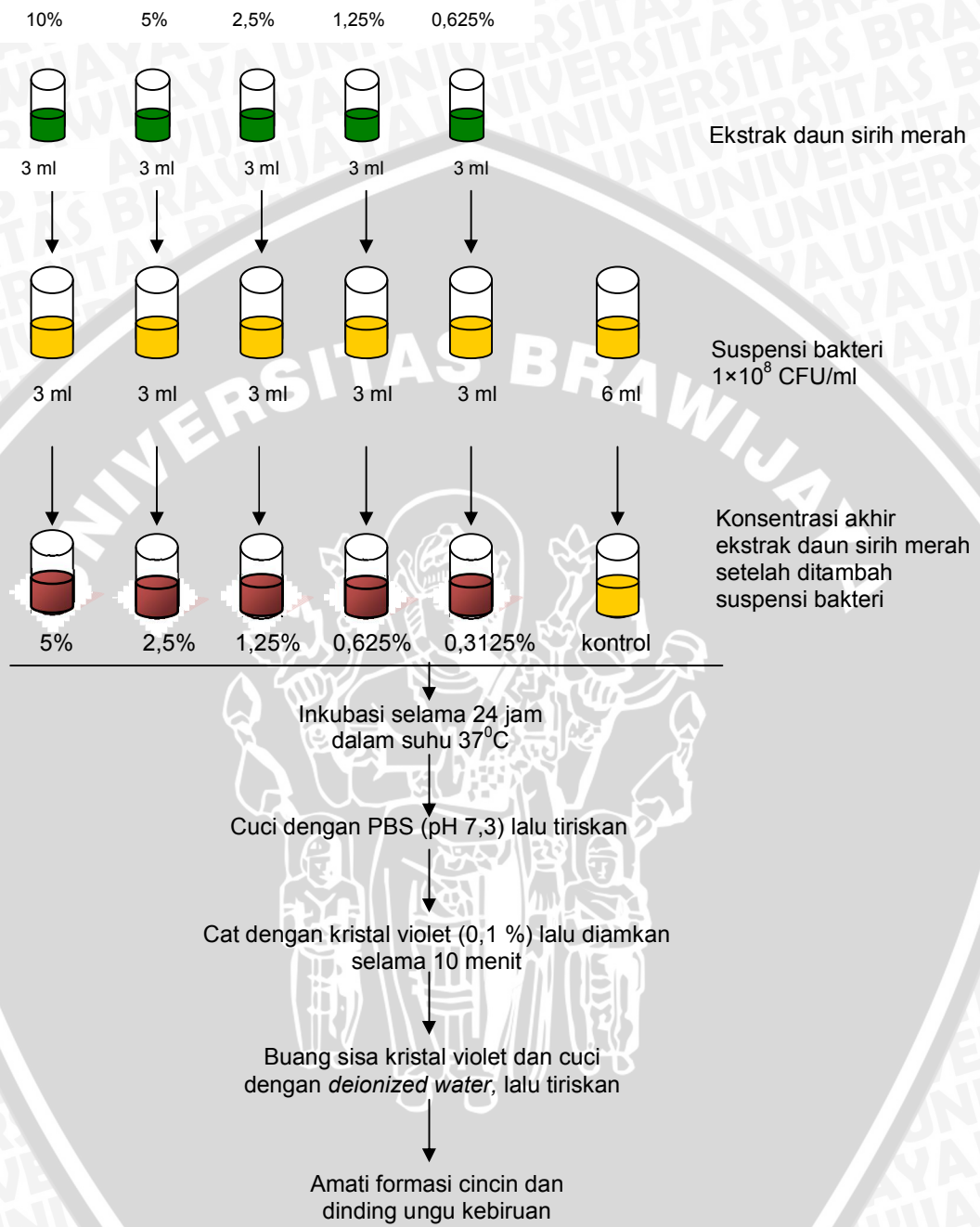
#### 4.8 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan uji statistik nonparametrik *Cochran* dan uji korelasi *Spearman*. Uji *Cochran* digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun sirih merah terhadap hambatan pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Uji korelasi *Spearman* digunakan untuk mengetahui adanya hubungan antara konsentrasi ekstrak daun sirih merah terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 16.0.



### 4.9 Rancangan Operasional Penelitian

#### Uji hambat pembentukan biofilm



Gambar 4.1 Rancangan Operasional Uji Hambat Pembentukan Biofilm

