

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan *post control group design* dengan metode dilusi tabung (*Tube Dilution Test*) untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun kitolod yang dapat mempengaruhi isolat bakteri *S. aureus* secara *in vitro*. Metode dilusi tabung meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada medium *broth* untuk menentukan KHM dan tahap *streaking* pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*) untuk mengetahui KBM.

4.2 Estimasi Sampel Penelitian

Sampel yang dipergunakan di dalam penelitian ini adalah bakteri *S. aureus* dengan kepadatan 10^6 CFU/ml yang dikembangkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Banyaknya sampel diatas dihitung dengan menggunakan rumus (Solimun, 2001):

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

Keterangan:

p = jumlah perlakuan (terdiri dari empat macam perlakuan/konsentrasi)

n = jumlah sampel

Penelitian ini menggunakan 6 macam dosis konsentrasi dari ekstrak etanol daun kitolod dan 1 kontrol *S. aureus* tanpa diberi ekstrak etanol daun kitolod ($p=5+1=6$) maka didapatkan jumlah pengulangan:

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

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

Dengan demikian, pada masing-masing perlakuan dalam penelitian ini akan dilakukan 4 kali pengulangan dengan menggunakan 4 galur *S. aureus* yang berbeda.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel tergantung.

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kitolod (*Isotoma longiflora*) yang dibuat dalam berbagai konsentrasi tertentu. Penentuan konsentrasi berdasarkan penelitian pendahuluan (20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%).

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung penelitian adalah pertumbuhan *S. aureus* yang diamati dari tingkat kekeruhan pada MH *broth* dan jumlah koloni pada medium NAP.

4.4 Lokasi Penelitian

Prosedur penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB pada tanggal 10 Juni 2013 s.d 19 Juli 2013. Prinsip-prinsip aseptis yaitu dengan cara penggunaan ruang kultur steril dan penggunaan alat dan bahan yang steril, menjaga agar lingkungan penelitian tetap bersih dan steril, serta dengan mengikuti prosedur eksperimen yang benar diterapkan dalam pelaksanaan penelitian ini untuk mencegah kontaminasi yang bisa mengganggu hasil eksperimen.

4.5 Definisi Operasional

- a. Daun kitolod (*Isotoma longiflora*) yang digunakan adalah daun kitolod tua yang berwarna hijau tua yang didapatkan dari Balai Materia Medika, Batu, Malang.
- b. Ekstrak etanol daun kitolod didapatkan dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi, kemudian dilakukan penyaringan dan penguapan dengan menggunakan *rotary-evaporator*.
- c. Isolat *S. aureus* diperoleh dari swab tenggorok 4 pasien di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang. Sebelumnya, *S. aureus* yang berasal dari spesimen diuji dengan pewarnaan Gram, uji katalase dan koagulase, uji dengan medium *Mannitol Salt Agar*.
- d. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi ekstrak etanol daun kitolod terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* yang ditandai dengan kejernihan dalam tabung.
- e. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi ekstrak etanol daun kitolod terendah yang mampu membunuh bakteri *S. aureus* yang dapat

dilihat dari tidak adanya koloni yang tumbuh pada agar plate atau jumlah koloni kurang dari 0,1% dari jumlah koloni pada *original inoculum*.

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat

Alat yang digunakan untuk identifikasi dan tes kepekaan bakteri *S. aureus* adalah cawan petri, ose, tabung reaksi, labu erlenmeyer, termometer, inkubator, gelas obyek, cover glass, bunsen, korek api, spidol permanen, pipet steril 10 ml, penggaris, mikroskop, dan *colony counter*.

Alat pembuatan ekstrak etanol daun kitolod yaitu Timbangan analitik, oven, blender, shaker, *rotary evaporator vaccum*, penyaring buchner, gelas ukur 10 ml, erlenmeyer 500 ml, erlenmeyer 1 L, beacker glass, tabung reaksi, mikro pipet, pengaduk kaca, kertas saring/whatman, aluminium foil.

4.6.2 Bahan

Bahan untuk identifikasi *S. aureus* yaitu minyak emersi, H₂O₂ 3%, serum plasma mamalia, bahan pewarna Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), aquades, kertas penghisap, kapas, medium *mannitol salt agar*.

Bahan untuk pembuatan ekstrak etanol daun kitolod yaitu daun kitolod etanol 96%, aquades steril. Bahan uji kepekaan ekstrak etanol daun kitolod terdiri dari empat isolat *S. aureus*, ekstrak etanol daun kitolod, *Nutrient Broth*, *NAP*, NaCl, dan aquades steril.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kitolod

4.7.1.1 Proses Metode Maserasi

- Daun kitolod segar dicuci dengan air bersih, kemudian dijemur hingga layu.
- Pengeringan kemudian dilanjutkan dengan menggunakan alat oven yang diatur suhunya sampai 60°C selama 12 jam.
- Simplisia daun kitolod sebanyak 200 gram dilarutkan dengan pelarut etanol (EtOH) 96% sebanyak 600 ml.
- Rendam bahan dan diamkan pada suhu kamar selama minimal 2 x 24 jam dengan sesekali diaduk
- Setelah maserasi, dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring *whatman*.
- Filtrat dari penyaringan ini kemudian dievaporasikan dengan menggunakan *rotary-evaporator* pada temperatur 40°C. Dari hasil ekstraksi ini diperoleh ekstrak etanol. (Buckley, 2006).

4.7.1.2 Proses Evaporasi dengan *rotary-evaporator vacum*

- Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja.
- Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu ekstraksi.
- Satu set alat evaporasi diletakkan sedemikian rupa sehingga sebagian labu ekstraksi terendam aquades pada *water bath*.
- *Water bath* dihubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhunya sampai 70° C (sesuai dengan titik didih etanol).

- Ditunggu proses pengembunan dan pemisahan di pendingin sampai hasil evaporasi tersisa dalam labu ekstraksi.
- Hasil evaporasi berupa cairan kental. Dalam penelitian ini hasil evaporasi dianggap konsentrasi 100%. (Buckley, 2006).

4.7.2 Identifikasi bakteri *S. aureus*

Untuk mengidentifikasi bakteri *S. aureus*, pertama-tama dilakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu dengan menanam bakteri yang diduga *S. aureus* pada *Nutrient Agar Plate (NAP)*, diinkubasikan dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Tahap selanjutnya, melakukan uji identifikasi bakteri, dengan pewarnaan Gram, tes katalase, tes koagulase, dan tes dengan medium *mannitol salt agar*. (Dzen *et al*, 2003).

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

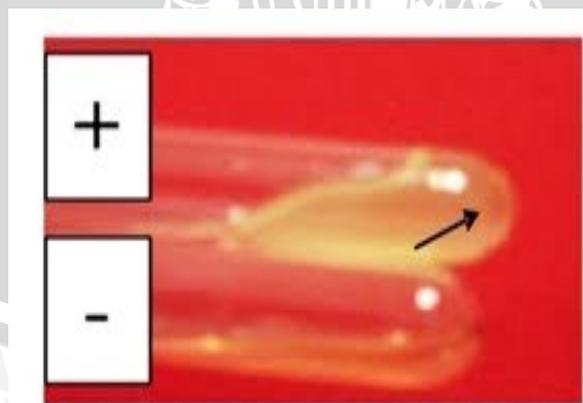
Langkah-langkah melakukan pewarnaan Gram adalah sebagai berikut:

- Gelas obyek dibersihkan dengan menggunakan kapas steril. Lewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak, lalu biarkan dingin.
- Teteskan satu tetes *aquades* steril pada gelas obyek.
- Ambil sedikit koloni *S. aureus* yang tumbuh pada medium agar dengan menggunakan ose yang sudah disterilkan dengan pembakaran. Lalu disuspensikan dengan satu tetes *aquades* steril yang sudah ditetaskan terlebih dahulu pada gelas obyek.
- Tuangi sediaan dengan kristal violet selama 1 menit, kemudian buang dan bilas dengan air.
- Tuangi sediaan dengan lugol selama 1 menit, kemudian buang dan bilas dengan air.

- Tuangi sediaan dengan alkohol 96% sampai warna lutur sekitar 5-10 detik, kemudian buang dan bilas dengan air.
- Tuangi sediaan dengan safranin selama 30 detik, kemudian buang dan bilas dengan air.
- Keringkan sediaan dengan kertas penghisap
- Lihat di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa obyektif 1000x. Hasil positif: *S. aureus* berbentuk bulat tercat ungu (Gram positif). (Dzen *et al*, 2003)

4.7.2.2 Tes Koagulase

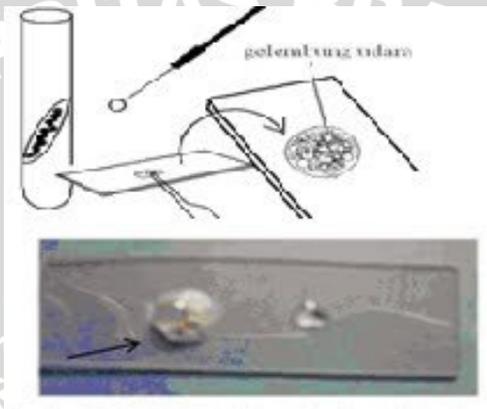
Untuk membedakan *S. aureus* dengan *Staphylococcus* jenis lainnya dilakukan tes koagulase. Selain itu tes koagulase juga bertujuan untuk menentukan patogenitas dari *S. aureus* yang bersifat koagulase positif. Pada tabung steril masukkan dengan 1 ml aquades steril dan ditambahkan 1 ml biakan bakteri kemudian ditambah dengan 1 ml plasma darah dan dicampur dengan cara menggoyang tabung arah melingkar selama 5-10 detik. Apabila hasilnya positif akan tampak gumpalan-gumpalan putih (Koneman *et al*, 1992).



Gambar 4.1 Aglutinasi plasma darah oleh *S. aureus* (+) dan kontrol (-)

4.7.2.3 Tes Katalase

Tes katalase dilakukan untuk membedakan *Staphylococcus* dengan *Streptococcus* dengan cara menambahkan larutan H₂O₂ 3% sebanyak 1-2 tetes atau secukupnya pada obyek gelas. *Staphylococcus* menunjukkan hasil yang positif yaitu dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara pada obyek gelas (Lay, 1994).



Gambar 4.2 Hasil uji katalase terhadap isolat *S. aureus*. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung gas

4.7.2.4 Tes dengan Medium *Mannitol Salt Agar*

Mannitol Salt agar digunakan untuk mengisolasi *Staphylococcus* dengan menghambat pertumbuhan kebanyakan bakteri lain dengan konsentrasi garam tinggi. Bakteri yang tumbuh dalam konsentrasi garam yang tinggi dan memfermentasi manitol menghasilkan produk asam, mengubah indikator pH Red Fenol dari merah ke kuning. *Staphylococcus* yang patogen memfermentasi manitol dan membentuk koloni kuning dengan zona kuning. Sedangkan, *Staphylococcus* non patogen tidak memfermentasi manitol dan membentuk koloni merah.

Streak pada *plate mannitol salt agar* dengan kultur yang tepat dengan menggunakan metode streak plate kuadran untuk mendapatkan koloni terisolasi. Koloni yang terisolasi baik akan memberikan hasil terbaik dalam bakteri diferensiasi biokimia menggunakan MSA (Beishir, 1991).

4.7.3 Pembuatan Suspensi Uji *S. aureus*

Dilakukan pemeriksaan spektrofotometri pada hasil kultur medium cair *Nutrient Broth*, dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui nilai absorbansi dari suspensi. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml yang setara dengan *Optical Density* (OD) = 0,1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut:

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

Keterangan:

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_1 = Nilai absorbansi suspense (hasil spektrofotometri)

V_2 = Volume suspense bakteri uji (10 ml)

N_2 = OD (setara dengan 10^8 CFU/ml)

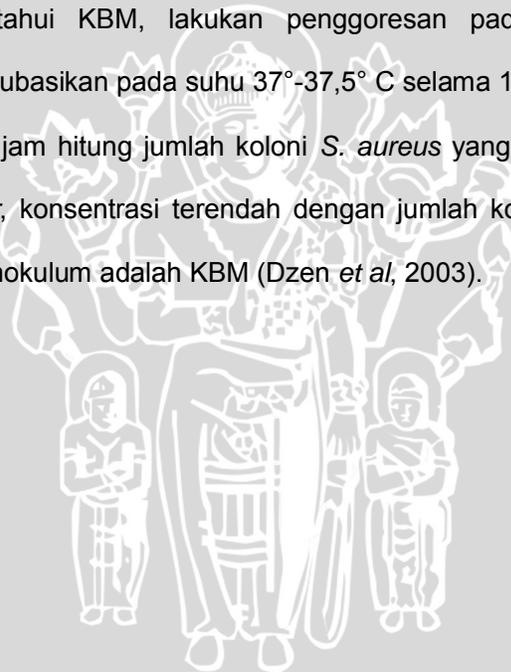
Dari perhitungan tersebut diperoleh volume (dalam ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10ml, selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali sehingga diperoleh suspensi bakteri sebanyak 10 ml dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml (Murray *et al*, 1999).

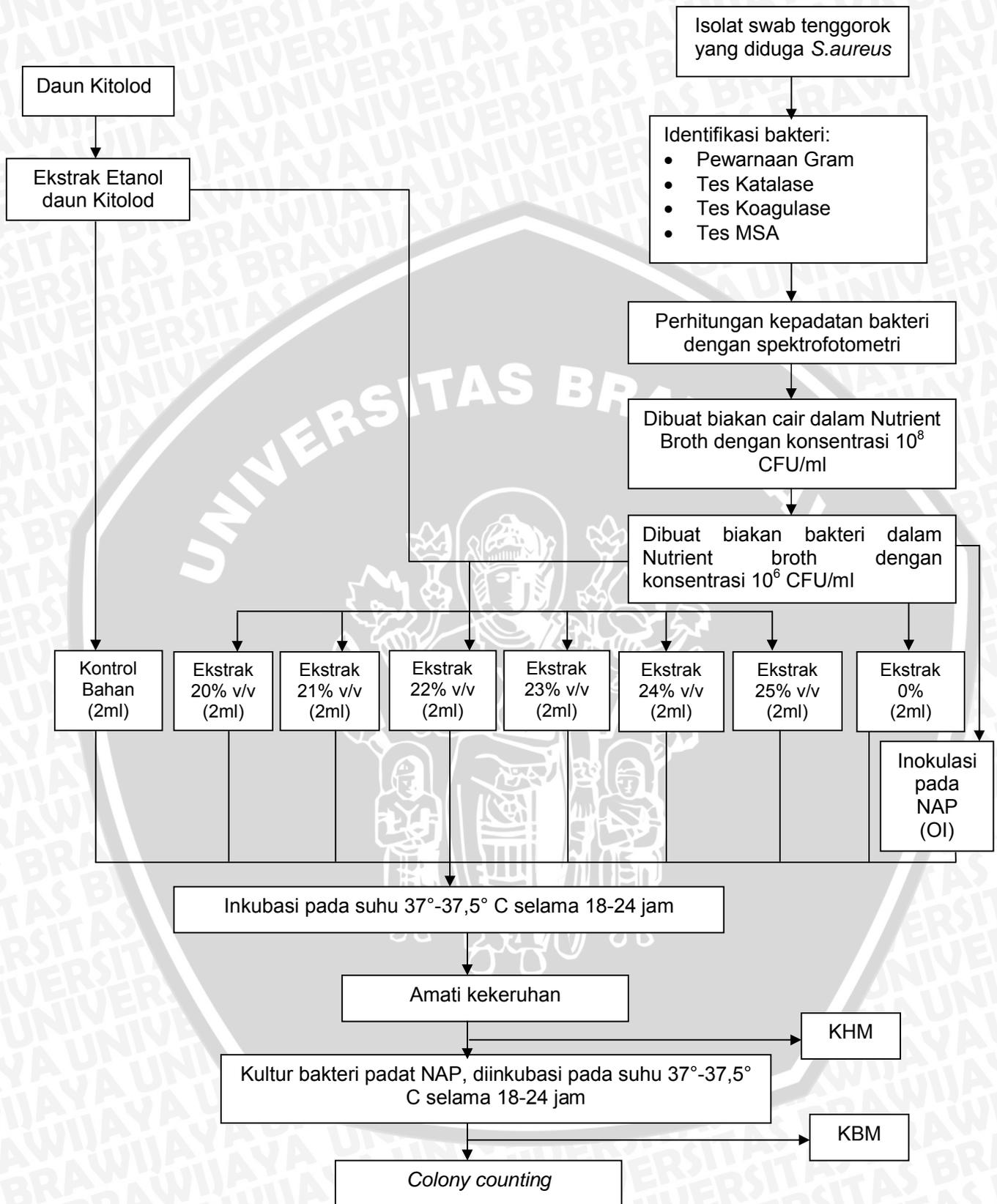
4.7.4 Uji Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Kitolod

Rangkaian uji antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kitolod adalah sebagai berikut:

- Disediakan 8 tabung steril, beri tanda 0%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% dan KB (kontrol bahan). Konsentrasi ekstrak 0% adalah biakan *S. aureus* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml, sedangkan kontrol bahan adalah ekstrak etanol daun kitolod.
- Masukkan 0,60 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 20%, lalu tambahkan 0,40 ml ekstrak etanol daun Kitolod.
- Masukkan 0,58 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 21%, lalu tambahkan 0,42 ml ekstrak etanol daun Kitolod.
- Masukkan 0,56 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 22%, lalu tambahkan 0,44 ml ekstrak etanol daun Kitolod.
- Masukkan 0,54 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 23%, lalu tambahkan 0,46 ml ekstrak etanol daun Kitolod.
- Masukkan 0,52 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 24%, lalu tambahkan 0,48 ml ekstrak etanol daun Kitolod.
- Masukkan 0,5 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 25%, lalu tambahkan 0,5 ml ekstrak etanol daun Kitolod.
- Masukkan 1 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda konsentrasi ekstrak 0%.
- Tambahkan 1 ml biakan cair *S. aureus* ke dalam setiap tabung kecuali tabung kontrol bahan.
- Masukkan 2 ml ekstrak etanol daun kitolod ke dalam tabung bertanda kontrol bahan.

- Masing-masing tabung di-vortex dan diinkubasikan pada suhu 37° - $37,5^{\circ}$ C selama 18-24 jam.
- Setelah 18-24 jam perhatikan dan catat derajat kekeruhan pada semua tabung. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan sebuah kertas putih di belakang tabung, dimana sebelumnya pada kertas tersebut digambar sebuah garis hitam, kemudian perhatikan garis hitam dari depan tabung. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.
- Untuk mengetahui KBM, lakukan penggoresan pada media NAP, kemudian diinkubasikan pada suhu 37° - $37,5^{\circ}$ C selama 18-24 jam.
- Setelah 18-24 jam hitung jumlah koloni *S. aureus* yang tumbuh dengan *colony counter*, konsentrasi terendah dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% original inokulum adalah KBM (Dzen *et al*, 2003).





Gambar 4.3 Alur Kerja Penelitian

4.8 Pengumpulan Data

Data didapatkan dengan cara kualitatif dan kuantitatif. Cara kualitatif pada pengamatan dengan melihat apakah ada pertumbuhan bakteri atau tidak secara tidak langsung dengan mengamati kekeruhan yang terjadi setelah sebelumnya didiamkan 18-24 jam, Sedangkan cara kuantitatif dengan melihat adanya pertumbuhan koloni pada NAP dari subkultur larutan uji yang tidak menunjukkan kekeruhan.

4.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one way* ANOVA dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one way* ANOVA dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun kitolod terhadap jumlah *S. aureus*. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun kitolod terhadap pertumbuhan *S. aureus*.