

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris (*true experiment–post test only control group design*) yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap kolonisasi bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan menggunakan metode dilusi agar untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan metode dilusi tabung untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan September 2013 sampai Desember 2013.

4.3 Bahan yang Diuji dan Sampel Penelitian

Bahan yang diujikan dalam penelitian ini adalah buah mahkota dewa yang didapat dari Materia Medika kota Batu, setelah itu dibuat ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan cara mencampurkan buah mahkota dewa yang sudah dikeringkan dengan pelarut etanol 96%.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus pyogenes* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Besar sampel yang diperlukan dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5 \approx 4 \quad (\text{Notobroto, 2005})$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan (6 perlakuan, yaitu 5 konsentrasi ekstrak etanol buah mahkota dewa dan 1 kontrol positif)

n = jumlah pengulangan (4 kali pengulangan)

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dalam berbagai konsentrasi yaitu konsentrasi 20%, 17,5%, 15%, 12,5%, 10%, dan 0% untuk metode dilusi tabung dan konsentrasi 20%, 17,5%, 15%, 12,5%, 10%, 7,5%, 5% dan 0% untuk metode dilusi agar.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

4.5 Definisi Operasional

a. **Buah Mahkota Dewa** adalah buah yang memiliki kulit buah berwarna merah yang didapat dari Materia Medika kota Batu dan sudah dikonfirmasi terlebih dahulu kebenarannya.

b. **Ekstrak etanol buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)** adalah ekstrak yang diperoleh dengan melakukan ekstraksi buah mahkota dewa yang sudah dikeringkan dan dihaluskan dengan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol

dikarenakan senyawa senyawa antibakteri yang terdapat di dalam buah mahkota dewa bersifat polar sehingga diperlukan suatu pelarut yang juga bersifat polar untuk pengekstrakan yaitu pelarut etanol, selain itu pelarut etanol juga lebih tidak toksik daripada pelarut metanol (Tensiska dkk, 2003).

- c. ***Streptococcus pyogenes*** adalah bakteri grup β -hemolitik yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan sudah dikonfirmasi dahulu kebenarannya dengan tes biokimia.
- d. **Kontrol positif** terdiri dari sediaan bakteri uji yaitu *Streptococcus pyogenes*
- e. **Kontrol negatif** terdiri dari sediaan ekstrak etanol buah mahkota dewa 100%
- f. **MIC (*minimum inhibitory concentration*)** atau **KHM (kadar hambat minimum)** adalah konsentrasi terendah dari ekstrak etanol buah mahkota dewa yang dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.
- g. **MBC (*minimum bactericidal concentration*)** atau **KBM (kadar bunuh minimum)** adalah konsentrasi terendah dari ekstrak buah mahkota dewa yang mampu membunuh bakteri *Streptococcus pyogenes*. KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri atau kurang dari 0,1% *Original Inoculum* (OI) pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) yang telah dilakukan penggoresan sebanyak 1 ose.
- h. ***Original Inoculum*** adalah inokulum bakteri yang diinokulasikan pada media BHIA sebelum diinkubasi dan digunakan untuk mencari KBM.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

Alat yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah petridisk, pipa plastik, tabung pendingin, labu evaporator, bak penampung air, labu penampung hasil evaporasi, penampung hasil penguapan, pompa sirkulasi air dingin, pompa vakum, alat pemanas air, pipet, tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur, *beaker glass*, Erlenmeyer, corong *Buchner*, pengaduk, bunsen, ose, incubator, *rotary evaporator*, timbangan analitik, korek api, autoklaf, spektrofotometer, dan *colony counter*.

4.6.2 Bahan

Bahan yang dibutuhkan untuk penelitian ini antara lain buah mahkota dewa, pelarut etanol 96%, isolat *Streptococcus pyogenes*, media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *blood Agar Plate* (BAP), cakram basitrasin, alkohol 96%, NaCl, kristal violet, lugol, safranin, aquades, minyak imersi, kertas penghisap, kapas, dan H₂O₂ 3%

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Identifikasi Bakteri

Tes yang dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri *Streptococcus pyogenes* antara lain adalah tes pewarnaan gram untuk membedakan bakteri gram negatif dan bakteri gram positif, tes katalase untuk membedakan *Streptococcus pyogenes* dan *Staphylococcus aureus*, dan tes cakram basitrasin untuk membedakan *Streptococcus pyogenes* dengan grup *Streptococcus* lainnya. Koloni *Streptococcus pyogenes* yang sangat kecil akan menghasilkan zona hambat di sekitar cakram basitrasin (Tedjo, 2011).

4.7.1.1 Pewarnaan Gram

- a. Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas objek, kemudian ditambah sedikit biakan bakteri yang disuspensikan dengan aquades pada gelas objek tersebut lalu diratakan.
- b. Sediaan dikeringkan kemudian difiksasi dengan cara dilewatkan di atas api.
- c. Sediaan diberi tetesan kristal violet dan ditunggu selama 1 menit kemudian sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- d. Sediaan diberi tetesan lugol dan ditunggu selama 1 menit kemudian sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan diberi tetesan Alkohol 96% dan ditunggu selama 5-10 detik kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air
- f. Sediaan diberi tetesan safranin dan ditunggu selama 30 detik kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- g. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
- h. Sediaan dilihat di bawah mikroskop.
- i. Hasil positif : *Streptococcus pyogenes* berwarna ungu (Gram positif).
(Tedjo, 2011)

4.7.1.2 Katalase

- a. Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api yang bertujuan untuk menghilangkan lemak, setelah itu gelas objek dibiarkan dingin.
- b. Membuat sediaan pembenihan cair bakteri pada gelas objek.
- c. Setelah itu sediaan tersebut ditetesi larutan H₂O₂ 3%.
- d. Diamati apakah ada pembentukan gelembung udara atau tidak

- e. Hasil tes katalase *Streptococcus pyogenes* adalah negatif yang berarti tidak adanya pembentukan gelembung udara.

(Tedjo, 2011)

4.7.1.3 Cakram Basitrasin

Tes Cakram Basitrasin membedakan *Streptococcus* grup A dengan grup *Streptococcus* yang lain. Media *Blood Agar Plate* yang sebelumnya telah diinokulasikan bakteri ditemplei cakram basitrasin. Koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* yang bersifat β hemolitik akan menghasilkan zona inhibisi di sekitar cakram (Tedjo, 2011).

4.7.2 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

- a. Mempersiapkan bakteri *Streptococcus pyogenes* dari media BHI yang telah di uji konfirmasi.
- b. Mengambil 5 koloni ($d \geq 1$ mm) dengan menggunakan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml BHIA. Kemudian diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{maks} = 625$ nm. Dari hasil yang diperoleh kemudian dibuat suspensi sel yang mengandung 10^8 CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$ (Murray *et al*, 1999).
- c. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung 10^6 CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^8 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml. Proses kemudian dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes yaitu 10^6 CFU/ml (Murray *et al*, 1999).

4.7.3 Pembuatan Ekstrak etanol buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

4.7.3.1 Persiapan sampel buah mahkota dewa kering

Buah mahkota dewa yang sudah didapatkan dibersihkan dari kotoran kemudian dicuci dengan air sampai bersih. Buah mahkota dewa yang sudah dicuci sampai bersih kemudian dipisahkan dari bagian bijinya kemudian dipotong kecil kecil dan dikeringkan dibawah sinar matahari. Buah mahkota dewa yang sudah kering dihaluskan dengan blender sehingga diperoleh bentuk serbuk halus, kemudian ditimbang dan diambil sebanyak 150 gram (Susanti, 2009).

4.7.3.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (Teknik Maserasi)

Serbuk halus buah mahkota dewa sebanyak 150 gram dimasukkan ke dalam pelarut etanol 96% sebanyak 850 ml yang sudah disiapkan, diaduk aduk sesekali dengan keadaan pelarut etanol cukup merendam serbuk. Larutan didiamkan selama 24 jam, setelah itu dilakukan penyaringan dengan corong *Buchner* hingga didapatkan filtrat yang terpisah dari ampas. Ampas dari penyaringan pertama ini kemudian di rendam dengan pelarut etanol 96% yang baru kemudian diaduk aduk sesekali dan didiamkan kembali selama 24 jam kemudian di saring kembali dengan corong *Buchner* untuk memisahkan filtrat dengan ampas, begitu seterusnya sampai didapatkan 3 filtrat dan 3 ampas. Filtrat dari penyaringan pertama, kedua, dan ketiga dicampur untuk kemudian di evaporasi (Pargaputri, 2011).

4.7.3.3 Proses Evaporasi

Evaporator set dipasang pada tiang permanen dengan kemiringan 30°-40° terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas terdiri dari alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin (dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin, pompa vakum, dan penampung

hasil penguapan). Hasil ekstraksi yang sudah didapat dipindahkan ke labu penampung, sedangkan *rotary evaporator*, alat pompa air dingin, dan alat pompa vakum dinyalakan. Kemudian alat pemanas aquades dinyalakan untuk memanaskan hasil ekstraksi yang diletakkan dalam labu penampung dengan suhu 80° C (sesuai titik didih etanol) dan etanol tersebut menguap.

Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol agar tidak bercampur dengan hasil evaporasi. Proses evaporasi ini dilakukan sampai volume ekstrak berkurang dan menjadi pekat (kental), setelah itu proses evaporasi dihentikan dan hasilnya ditampung dalam cawan penguap dan dioven selama 2 jam pada suhu 80° C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan ekstrak 100% (Pargaputri, 2011).

4.7.4 Uji Dilusi Tabung untuk Menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM)

- a. Menyiapkan 7 buah tabung steril, 5 tabung untuk uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol positif (yang berisi bakteri, medium dan aquades), serta 1 tabung sebagai kontrol negatif (yang berisi ekstrak etanol buah mahkota dewa dan medium). Kemudian setiap tabung diisi dengan ekstrak dengan berbagai konsentrasi sebagai berikut:

Tabung 1 : 20%

Tabung 2 : 17,5%

Tabung 3 : 15%

Tabung 4 : 12,5%

Tabung 5 : 10%

Tabung 6 : kontrol positif yang berisi sediaan bakteri

Tabung 7 : kontrol negatif yang berisi ekstrak etanol buah mahkota dewa 100%

- b. Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol buah mahkota dewa didapatkan dari metode pengenceran seri dengan cara membandingkan antara volume ekstrak dan *aquadest*. Konsentrasi yang digunakan adalah 20%, 17,5%, 15%, 12,5%, dan 10%.
- c. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi 10^6
- d. Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung kecuali tabung nomor 7, masing-masing sebanyak 1 ml.
- e. Pengenceran seri:

Setiap tabung diisi dengan ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan konsentrasi sebagai berikut :

Tabung 1 : ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan konsentrasi 20% yang didapat dari 0,2 ml ekstrak buah mahkota dewa ditambahkan dengan 0,80 ml *aquadest*.

Tabung 2 : ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan konsentrasi 17,5% yang didapat dari 0,175 ml ekstrak buah mahkota dewa ditambahkan dengan 0,825 ml *aquadest*.

Tabung 3 : ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan konsentrasi 15% yang didapat dari 0,15 ml ekstrak buah mahkota dewa ditambahkan dengan 0,85 ml *aquadest*.

Tabung 4 : ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan konsentrasi 12,5% yang didapat dari 0,125 ml ekstrak buah mahkota dewa ditambahkan dengan 0,875 ml *aquadest*.

Tabung 5 : ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan konsentrasi 10% yang didapat dari 0,1 ml ekstrak buah mahkota dewa ditambahkan dengan 0,9 ml *aquadest*.

Tabung 6 : diisi dengan sediaan bakteri *Streptococcus pyogenes*, medium, dan *aquadest* (kontrol positif)

Tabung 7 : diisi dengan ekstrak etanol buah mahkota dewa 100% sebanyak 1 ml dan medium (kontrol negatif)

- f. Kontrol bakteri (0%) digoreskan pada media BHIA sebanyak 1 ose sebagai *Original Inoculum*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- g. Masing-masing tabung di-*vortex* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- h. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung dibantu dengan latar belakang berupa 3 garis hitam yang berbeda ketebalannya.



Selanjutnya dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose, lalu diinokulasikan pada media BHIA. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

- i. Pada hari ketiga, data KBM didapatkan dan pada masing-masing konsentrasi dilakukan pengamatan kuantitatif dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dengan tidak adanya jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media BHIA atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di *Original Inoculum*.

4.7.5 Uji Dilusi Agar untuk Menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM)

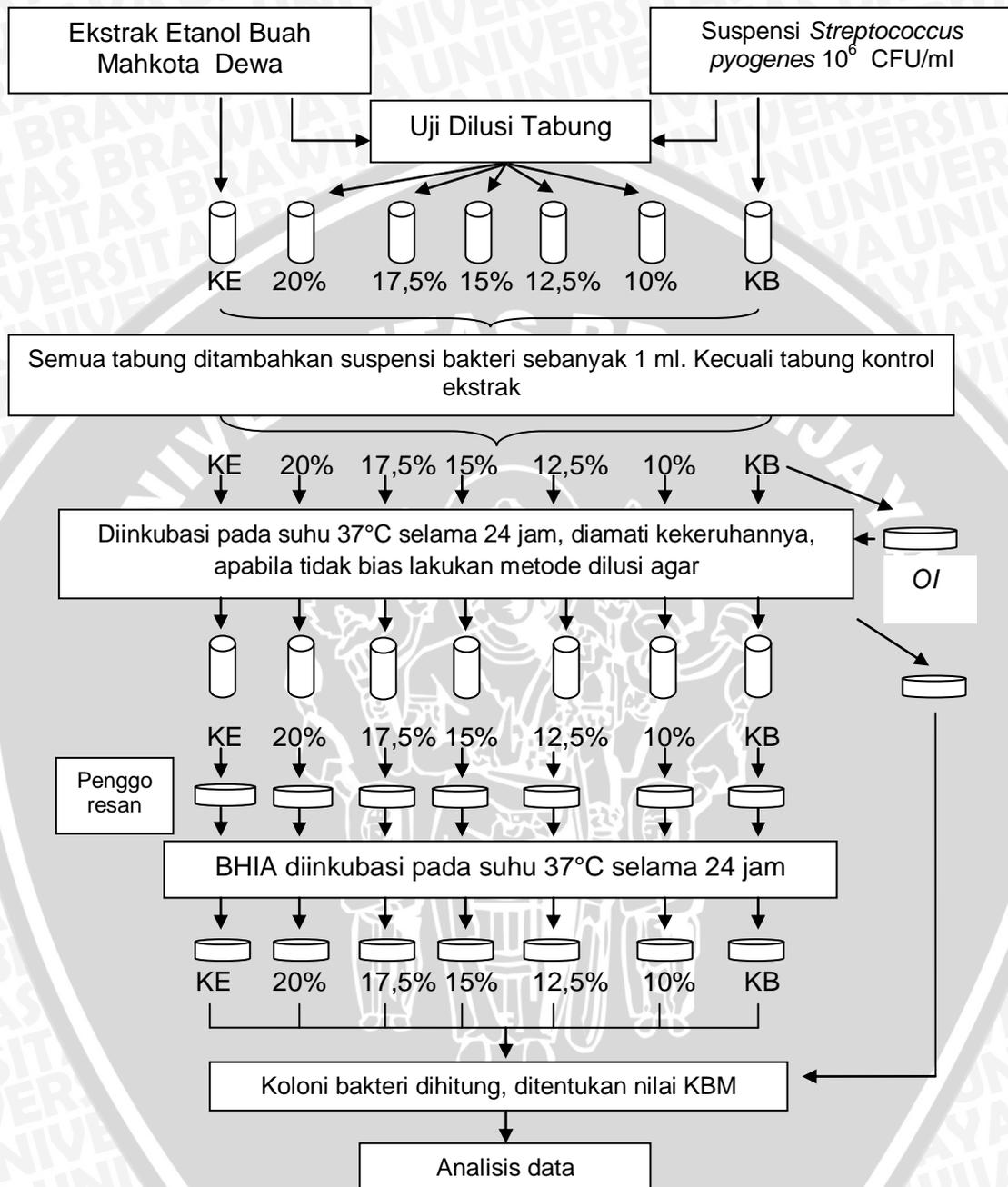
Volume total dari agar plate diasumsikan sebesar 15 ml. Konsentrasi ekstrak buah mahkota dewa yang digunakan adalah 17,5%, 15%, 12,5%, 10%, 7,5% dan 5%. Dengan Penghitungan sebagai berikut :

- a. KK = 15 ml agar
- b. 20% = 3 ml ekstrak buah mahkota dewa ditambah dengan 12 ml MHA
- c. 17,5% = 2,625 ml ekstrak buah mahkota dewa ditambah dengan 12,375 ml MHA
- d. 15% = 2,25 ml ekstrak buah mahkota dewa ditambah dengan 12,75 ml MHA
- e. 12,5% = 1,875 ml ekstrak buah mahkota dewa ditambah dengan 13,125 ml MHA
- f. 10% = 1,5 ml ekstrak buah mahkota dewa ditambah dengan 13,5 ml MHA
- g. 7,5% = 1,125 ml ekstrak buah mahkota dewa ditambah dengan 13,875 ml MHA
- h. 5% = 0,75 ml ekstrak buah mahkota dewa ditambah dengan 14,25 ml MHA

Campurkan ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan MHA yang masih hangat ke dalam *falcon*. Homogenkan campuran tersebut dengan cara memutar searah jarum jam. Kemudian tuangkan kedalam plate dan dibiarkan sampai mengeras lalu masukkan kedalam inkubator untuk sterilitas media.

Ambil 1 tetes suspensi bakteri dengan mikro pipet (1 tetes = $10 \mu\text{l}$ 10^6 CFU/ml). Teteskan pada permukaan agar yang telah disterilisasi secara tegak lurus. Biarkan suspensi bakteri menyerap kedalam agar. Kemudian *plate* dimasukkan ke dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C . Lakukan Pengamatan.

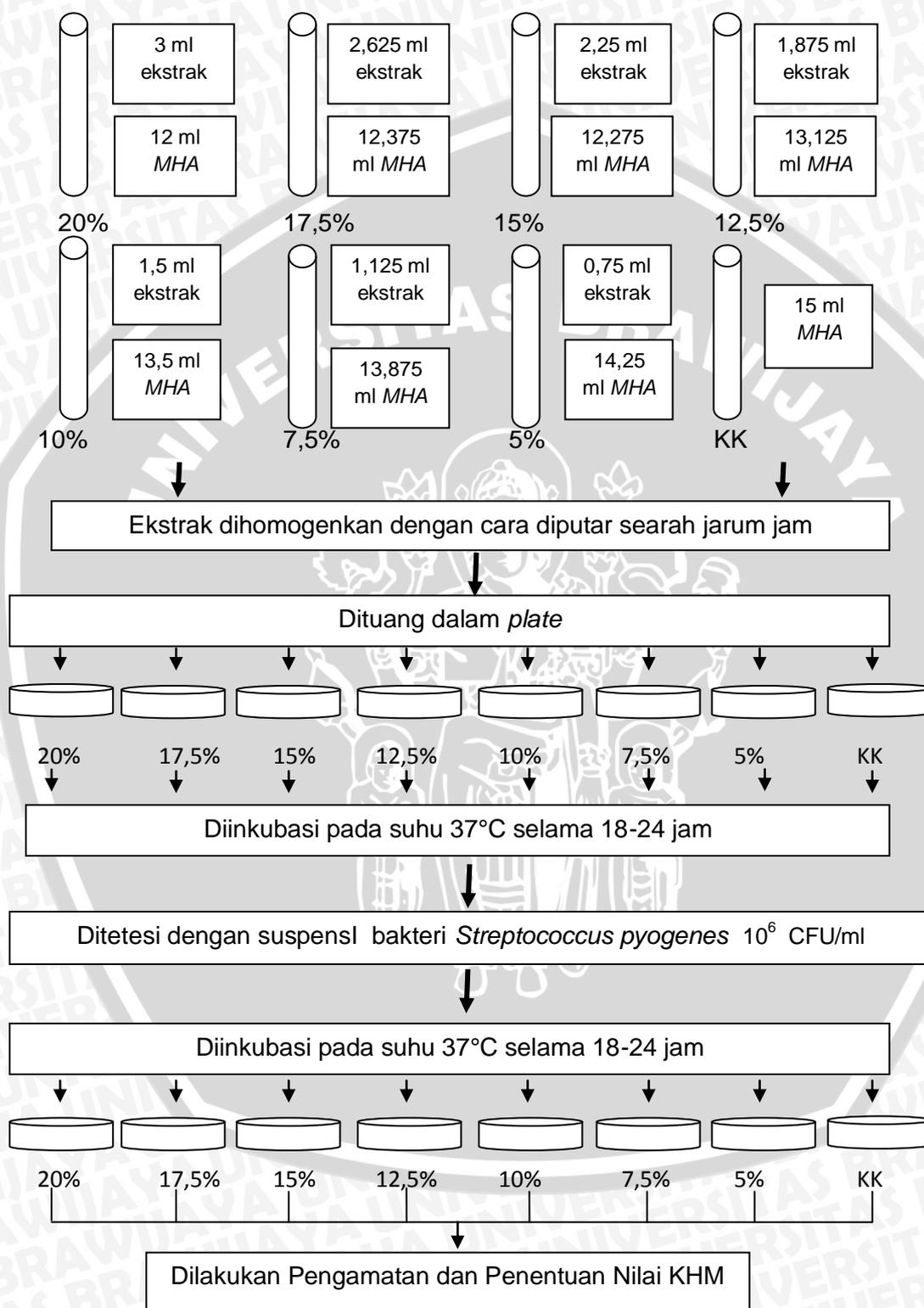
Alur Penelitian Metode Dilusi Tabung



Gambar 4.1 Alur Penelitian Metode Dilusi Tabung

Keterangan : KE: Kontrol Ekstrak, KB: Kontrol Bakteri, OI: Original Inoculum, BHIA: Brain Heart Infusion Agar

Alur Penelitian Metode Dilusi Agar



Gambar 4.2 Alur Penelitian Metode Dilusi Agar

Keterangan : KK :Kontrol Kuman MHA: Mueller Hinton Agar

4.8 Analisis Data

Untuk melakukan analisis data pertama kali perlu dilakukan uji distribusi data yaitu, uji distribusi normalitas menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* dan uji homogenitas data yaitu menggunakan uji *Levene Homogeneity Test*. Jika didapatkan data yang terdistribusi normal dan homogen, analisa data yang digunakan adalah uji statistik *one-way Anova* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) yang digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Untuk melakukan analisis data digunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 16.0. Jika didapatkan nilai signifikansi $p > \alpha$ (0,05) maka hipotesis diterima namun jika didapatkan nilai $p \leq \alpha$ (0,05) maka hipotesis ditolak.

