

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian eksperimental dengan *post test only control grup design* dan dilakukan secara *in vitro* dengan metode dilusi agar untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak seledri terhadap *Staphylococcus aureus* dan mengetahui pengaruh konsentrasi yang berbeda-beda dari ekstrak seledri terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

4.2 Sampel dan Pengulangan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sementara banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan rumus :

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \approx 4$$

Keterangan:

p: jumlah perlakuan (terdiri dari tujuh macam perlakuan atau konsentrasi ekstrak seledri)

n: banyaknya pengulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan tersebut, banyaknya pengulangan yang diperlukan pada penelitian ini paling sedikit adalah 4.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung

Tingkat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* untuk menentukan KHM.

4.3.2 Variabel Bebas

Ekstrak seledri yang dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 0%; 1%; 1,2%; 1,4%; 1,6; 1,8% dan 2% berdasarkan hasil penelitian pendahuluan.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2013 sampai bulan Agustus 2013.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Seledri

Dalam proses pembuatan ekstrak seledri ini terdapat tiga macam proses, yaitu proses pengeringan, proses ekstraksi, dan proses evaporasi.

Alat yang digunakan pada proses pengeringan adalah oven. Bahan yang digunakan adalah seledri.

Alat yang digunakan pada proses ekstraksi adalah blender untuk menghaluskan seledri yang sudah dikeringkan, neraca analitik, dan labu Erlenmeyer. Bahan yang digunakan adalah seledri kering dan etanol 96%.

Alat yang digunakan pada proses evaporasi adalah seperangkat evaporator vakum, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, rotary evaporator, tabung pendingin dan pompa sirkulasi air dingin, bak penampung air dingin,

pompa vakum, tabung penampung etanol dan oven. Bahan yang digunakan adalah seledri, etanol 96%, dan aquades.

4.5.2 Alat dan Bahan Preparasi Bakteri

Dalam preparasi bakteri ini terdapat tiga proses yaitu identifikasi bakteri (pewarnaan gram, uji katalase, uji koagulase dan penanaman pada medium MSA), pembuatan pembenihan cair bakteri dan inokulasi bakteri ke medium yang sudah ditambahkan bahan uji.

Alat yang digunakan untuk identifikasi bakteri antara lain gelas objek, api bunsen, ose, mikroskop. Sedangkan bahan yang diperlukan adalah isolat *Staphylococcus aureus*, bahan pewarna (kristal violet, lugol, alkohol 96% dan safranin), H_2O_2 3%, staphaurex sebagai pengganti plasma darah, medium MSA dan minyak imersi.

Alat yang digunakan pada pembuatan pembenihan cair bakteri dan inokulasi bakteri ke medium yang sudah ditambahkan bahan uji adalah tabung reaksi, ose, vortex, incubator, spektrofotometri, mikropipet dan *plate*. Sedangkan bahan yang diperlukan adalah isolat *Staphylococcus aureus*, *nutrien broth* dan NaCl.

4.5.3 Alat dan Bahan Uji Kepekaan Ekstrak Seledri Sebagai Antibakteri

Dalam melakukan uji kepekaan ekstrak seledri, alat yang digunakan adalah mikropipet dan inkubator. Sedangkan bahan yang diperlukan dalam prosedur ini adalah perbenihan cair bakteri *Staphylococcus aureus*, ekstrak seledri, dan media NAP.

4.6 Definisi Operasional

- Seledri diperoleh, dikeringkan, diekstraksi dan dievaporasi di Balai Materia Medika, Batu. Bagian-bagian tanaman yang diekstrak adalah daun, batang, bunga dan biji.
- Ekstrak seledri didapatkan dengan menggunakan metode maserasi dalam etanol 96%, kemudian dievaporasi dan dipanaskan dalam oven.
- Isolat *Staphylococcus aureus* yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Konsetrasi yang digunakan adalah 0%; 1%; 1,2%; 1,4%; 1,6%; 1,8% dan 2%.
- Kontrol kuman yaitu sediaan bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditetaskan pada media agar dengan konsentrasi ekstrak 0% atau tanpa larutan ekstrak seledri.
- Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak seledri (*Apium graveolens*) yang mampu menghambat pertumbuhan yang terlihat dari bakteri uji (*Staphylococcus aureus*) dengan metode dilusi agar (Wiegand *et al*, 2007).
- Hasil penelitian dinyatakan dalam bentuk angka hasil histogram dari foto masing-masing *plate* menggunakan histogram Corel Photo Paint X4 untuk melihat tingkat pertumbuhan bakteri dari ketebalan koloninya (daerah koloni yang dievaluasi berupa lingkaran) dan dibandingkan dengan hasil histogram pada *plate* yang tidak ada pertumbuhan bakteri (karena tidak ada koloni yang terlihat, maka tidak ada ketentuan daerah mana yang dievaluasi, selama masih dalam *plate*).

- Histogram menilai ketebalan melalui identifikasi terhadap *tone* (tingkat kecerahannya) suatu objek. Ketebalan objek sebanding dengan tingkat kecerahannya (Welander *et al*, 2002). Histogram memiliki grafik batang horizontal yang membagi nilai kecerahan suatu *pixel* (*picture element*) gambar pada skala 0 (gelap) sampai 255 (terang). Nilai *tone* berupa jangkauan (*range*) dan data yang digunakan adalah rata-ratanya (*mean*). Besar lingkaran untuk membatasi daerah mana yang dievaluasi harus sama, dengan demikian jumlah *pixel*nya sama.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Seledri Metode Maserasi

Ekstrak seledri dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Dengan menggunakan pelarut etanol diharapkan zat-zat aktif antibakteri yang terkandung dalam seledri dapat larut ke dalam ekstrak.

1. Proses Pengeringan

- a. Mencuci bersih seledri yang akan dikeringkan
- b. Mengeringkan seledri yang telah dicuci dengan menggunakan oven pada suhu 80°C selama 45 menit.

2. Proses Ekstraksi

- a. Menghaluskan seledri yang sudah kering dengan blender.
- b. Menimbang seledri yang sudah halus dengan menggunakan neraca analitik sebanyak 100 gram.
- c. Memasukan seledri yang telah halus sebanyak 100 gram ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 1 liter.
- d. Merendam seledri halus dengan etanol 96% sampai volume 900 ml.
- e. Mengocok sampai benar-benar tercampur.

- f. Mendingkankan campuran selama 1 malam sampai mengendap.
3. Proses Evaporasi
 - a. Mengambil lapisan atas campuran.
 - b. Memasukan ke dalam labu evaporasi pada evaporator.
 - c. Mengisi water bath dengan air sampai penuh.
 - d. Memasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas water bath (mengatur sampai 60°C), menyambungkan dengan aliran listrik.
 - e. Membiarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
 - f. Menunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm$ 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
 - g. Memanaskan hasil evaporasi dengan oven pada suhu 80°C selama 2 jam untuk memastikan etanol telah menguap dan tidak ada sisa etanol.
 - h. Memasukan hasil ekstraksi dalam botol plastik atau kaca.
 - i. Menyimpan dalam refrigerator.

Dari proses ekstraksi 100 gram seledri kering didapatkan 30 ml ekstrak dengan konsentrasi 100%.

4.7.2 Identifikasi Bakteri

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

1. Membuat sediaan apusan kuman pada gelas objek.
2. Menetesi sediaan dengan Kristal Violet selama 1 menit. Sisa Kristal Violet dibuang dan sediaan dibilas dengan air. Kristal Violet disini berfungsi sebagai warna dasar.
3. Menetesi sediaan dengan Lugol selama 1 menit. Sisa Lugol dibuang dan sediaan dibilas dengan air.

4. Menetesi sediaan dengan Alkohol 95% selama 50-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa Alkohol dibuang dan sediaan dibilas dengan air.
5. Menetesi sediaan dengan Safranin selama 0,5 menit. Sisa Safranin Sediaan dituangi dengan Safranin selama 0,5 menit. Sisa Safranin dibuang dan sediaan dibilas dengan air. Safranin disini berfungsi sebagai bahan warna pembanding.
6. Mengeringkan sediaan menggunakan kertas penghisap.
7. Menetesi sediaan dengan minyak emersi.
8. Melihat sediaan di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x.
9. Memperhatikan warna bakteri, jika tampak berwarna ungu maka gram positif, jika berwarna merah maka gram negatif

4.7.2.2 Uji Katalase

1. Membuat hapusan dari perbenihan bakteri *Staphylococcus aureus* ke gelas objek.
2. Menetesi hapusan dengan larutan H_2O_2 3%.
3. Memperhatikan adanya gelembung pada sediaan tersebut, bila tampak gelembung maka katalase positif.

4.7.2.3 Uji Koagulase (Slide)

1. Membuat hapusan dari perbenihan bakteri *Staphylococcus aureus* ke gelas objek.
2. Menetaskan staphaurex pada suspensi bakteri dan mengusahannya tercampur.
3. Memperhatikan adanya gumpalan putih (*clumping*) pada sediaan tersebut, bila tampak gumpalan putih maka koagulase positif.

4.7.2.4 Penanaman Bakteri ke Medium MSA

1. Menyiapkan medium MSA sehari sebelum digunakan, dan menyimpannya di tempat yang gelap pada suhu ruangan.
2. Mengambil bakteri dari pembenihan cair.
3. Menggoreskan bakteri tersebut ke medium MSA.
4. Menginkubasi biakan bakteri pada medium selama 18-24 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.
5. Memperhatikan adanya fermentasi manitol oleh bakteri berupa adanya daerah terang (halo) berwarna kuning di sekitar koloni.

4.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

1. Dengan menggunakan ose mengambil koloni *Staphylococcus aureus* dari media NAP.
2. Memasukkan ke tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth* 9 ml kemudian menginkubasikan dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. Melakukan pemeriksaan spektrofotometri pada hasil kultur medium cair *Nutrient Broth* dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui nilai absorbansi dari suspensi.
4. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml yang setara dengan OD (*Optical Density*) = 0,1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut:

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

Keterangan:

N_1 = nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V_1 = volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_2 = OD (0,1 = setara dengan 10^8 CFU/ml)

V_2 = volume suspensi bakteri uji (5 ml)

Sehingga diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer NaCl untuk mendapatkan 5 ml bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml.

5. Membuat sediaan 5 ml bakteri *Staphylococcus aureus* konsentrasi 10^7 CFU/ml dengan cara mengambil 0,5 ml larutan dari konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml kemudian dimasukkan dalam tabung yang telah diisi 4,5 ml NaCl dan divortex hingga homogen. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi 10^7 CFU/ml.
6. Membuat sediaan 5 ml bakteri *Staphylococcus aureus* konsentrasi 10^6 CFU/ml dengan mengambil 0,5 ml larutan dari konsentrasi kuman 10^7 CFU/ml kemudian dimasukkan dalam tabung yang telah diisi 4,5 ml *nutrient broth* dan divortex hingga homogen. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi 10^6 CFU/ml. Bakteri siap digunakan untuk penelitian.

4.7.4 Pengujian Efek Antibakteri Ekstrak Seledri (*Apium graveolens*) Terhadap *Staphylococcus aureus* (Tes Dilusi Agar)

Tes dilusi agar dilakukan untuk menentukan KHM yang tidak dapat ditentukan menggunakan metode dilusi tabung. Rangkaian uji aktivitas antibakteri ekstrak seledri adalah sebagai berikut:

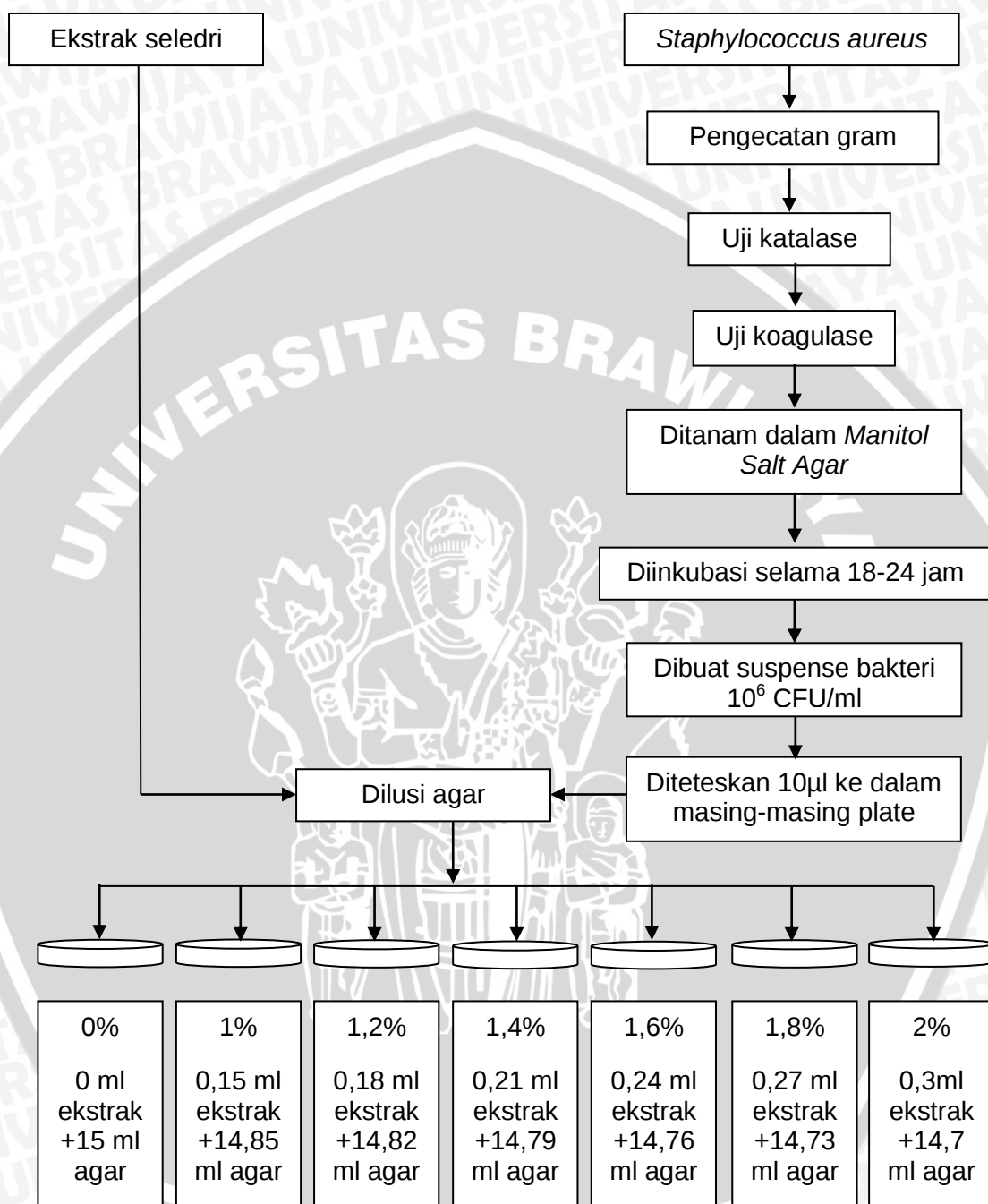
1. Menyediakan 7 *plate* steril berdiameter 8,5 cm yang telah diberi tanda berdasarkan prosentase ekstrak yang dicampur dalam dilusi agar yaitu KK (kontrol kuman) atau 0%; 1%; 1,2%; 1,4%; 1,6%; 1,8% dan 2%.
2. Volume total yang dipakai dalam setiap *plate* dalam mencampur agar dan ekstrak adalah 15 ml.
3. Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak seledri 0% dibutuhkan 0 ml ekstrak seledri dan 15 ml agar.

4. Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak seledri 1% dibutuhkan 0,15 ml ekstrak seledri dan 14,85 ml agar.
5. Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak seledri 1,2% dibutuhkan 0,18 ml ekstrak seledri dan 14,82 ml agar.
6. Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak seledri 1,4% dibutuhkan 0,21 ml ekstrak seledri dan 14,79 ml agar.
7. Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak seledri 1,6% dibutuhkan 0,24 ml ekstrak seledri dan 14,76 ml agar.
8. Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak seledri 1,8% dibutuhkan 0,27 ml ekstrak seledri dan 14,73 ml agar.
9. Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak seledri 2% dibutuhkan 0,3 ml ekstrak seledri dan 14,7 ml agar.
10. Membuat campuran bahan uji dan *nutrient agar* lebih homogen dengan di vortex.
11. Mengisi masing-masing *plate* dengan campuran yang telah di vortex, lalu menunggu sampai agar dingin dan membeku.
12. Mengencerkan bakteri uji yang dipakai sampai 10^6 CFU/ml
13. Membagi setiap *plate* tersebut dibagi menjadi 4 untuk ditetesi bakteri uji sebanyak 10^4 CFU/10 μ l. Kemudian *plate* diinkubasi selama 18-24 jam.
14. Melihat koloni yang tumbuh pada media agar. Konsentrasi ekstrak terendah pada media agar yang tidak menunjukkan pertumbuhan koloni yang terlihat maka dapat disebut KHM larutan ekstrak.
15. Pada *plate* yang masih terdapat pertumbuhan koloni bakteri, dilihat tingkat pertumbuhannya dari ketebalan koloni melalui identifikasi foto menggunakan histogram Corel Photo Paint X4. Pada *plate* yang tidak terdapat pertumbuhan

koloni bakteri (KHM) juga dievaluasi dengan cara yang sama agar bisa digunakan sebagai pembanding.



4.8 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif berupa rata-rata tingkat kecerahan dari foto *plate* daerah koloni bakteri dan *plate* KHM (daerah evaluasinya tidak ada ketentuan) yang masing-masing memiliki konsentrasi ekstrak seledri yang berbeda, menggunakan histogram pada program Corel Photo Paint X4.

Dalam penelitian ini, analisis data menggunakan program SPSS (*Statistic Product of Service Solution*) versi 16 dengan besar interval kepercayaan yang dipakai adalah 95% ($\alpha=0,05$). Kita harus mengetahui terlebih dahulu apakah data kita dapat dianalisis menggunakan uji statistik parametrik atau tidak. Uji statistik parametrik memiliki ketentuan: sebaran data harus normal dan varian data harus homogen. Apabila 2 hal tersebut tidak dapat terpenuhi maka sebagai alternatifnya digunakan uji statistik non parametrik.

Langkah-langkah uji statistik dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Melakukan analisis uji komparatif *one way* Anova untuk mengetahui perbedaan pertumbuhan bakteri akibat perlakuan. Apabila syarat uji statistik parametrik tidak dapat dipenuhi maka sebagai alternatifnya adalah uji statistik non parametrik yaitu uji statistik Kruskal Wallis.
2. Kemudian dilakukan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perlakuan mana saja yang menyebabkan perbedaan yang bermakna dan tidak bermakna terhadap pertumbuhan bakteri. Alternatif uji statistik non parametrik untuk *Post Hoc Tukey* adalah uji statistik Mann Whitney
3. Kemudian dilakukan uji korelasi untuk mengetahui keeratan dan arah hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak seledri terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan uji korelasi Pearson. Namun jika

syarat uji statistik parametrik tidak dapat terpenuhi, sebagai alternatifnya digunakan uji Spearman.

