

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan desain penelitian eksperimental aktivitas dari ekstrak daun alpukat (*Persea gratissima Gaerthn*) dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* dilakukan secara laboratorik *in vitro* dengan menggunakan metode dilusi tabung.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan September 2013 sampai Desember 2013.

4.3 Sampel dan Besar Sampel

Sampel yang digunakan adalah isolat bakteri *Streptococcus pyogenes* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus berikut ini (Notobroto, 2005):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

p = perlakuan (konsentrasi 5 level)

n = jumlah sampel

15 = nilai konstanta

Jadi, untuk lima jenis perlakuan, diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 4 kali untuk masing-masing perlakuan.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak daun alpukat (*Persea gratissima Gaertn*).

4.4.2 Variabel Terikat

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

4.5 Definisi Operasional

1. Ekstrak daun alpukat (*Persea gratissima Gaertn*) merupakan proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut etanol 96% dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruangan. Dengan metode ini, zat-zat aktif yang tahan terhadap pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan dapat ditarik hingga mendapatkan hasil berupa ekstrak kental. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1% yang didapatkan dengan metode pengenceran seri. Daun alpukat (*Persea gratissima Gaertn*) didapatkan dari Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur UPT Materia Medica Batu.
2. Isolat *Streptococcus pyogenes* adalah isolat yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang telah dilakukan tes identifikasi bakteri.
3. KHM adalah kadar hambat minimum, yaitu konsentrasi antibakteri ekstrak daun alpukat terendah yang mampu menghambat bakteri *Streptococcus pyogenes*, ditandai dengan hasil biakan tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba), setelah diinkubasikan 18-24 jam dengan larutan control
4. Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi antibakteri ekstrak daun alpukat terendah yang mampu membunuh bakteri *Streptococcus pyogenes*, ditandai dengan tidak tumbuhnya koloni mikroba pada BHIA
5. *Original Inoculum* (OI) adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum inkubasi. Digunakan untuk mencari KBM setelah diinokulasikan 18-24 jam yang dibandingkan dengan bahan kontrol negatif.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Untuk Ekstraksi Daun Alpukat

- a. Daun Alpukat
- b. Etanol 96%
- c. Aquades
- d. Timbangan
- e. Blender
- f. 1 set alat evaporasi
- g. gelas erlenmeyer
- h. Oven
- i. Tabung steril
- j. Kertas saring

4.6.2 Untuk Identifikasi Bakteri

- a. Isolat bakteri
- b. Bahan-bahan pengecatan Gram (kristal violet, lugol, alkohol, dan safranin)
- c. BHIA
- d. BAP
- e. Cakram Basitrasin
- f. Object glass, minyak emersi, ose, mikroskop
- g. H₂O₃ 3% untuk uji katalase
- h. Aquades

4.6.3 Untuk Dilusi Tabung

- a. Tabung reaksi dengan label konsentrasi
- b. Tabung reaksi untuk kontrol bakteri dan ekstrak

- c. Pipet steril
- d. Inkubator
- e. Hasil ekstraksi
- f. Perbenihan cair bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/ml
- g. Aquades

h. *Vortex*

4.6.4 Untuk Streaking Plate

- a. BHIA
- b. Ose
- c. Bunsen
- d. *Vortex*

4.6.5 Untuk Pembuatan Bahan Cair Bakteri dengan Kepadatan 10^6 CFU/ml

- a. Tabung reaksi
- b. MH Broth
- c. Pipet steril
- d. Larutan NaCl
- e. *Vortex*
- f. Spektrofotometer



4.7 Rancangan Operasional Penelitian

4.7.1 Pembuatan Sediaan Ekstrak Daun Alpukat

4.7.1.1 Proses Ekstraksi

Daun alpukat terpilih sebanyak 100 gram diiris tipis lalu dikeringkan dibawah sinar matahari dengan tujuan menguapkan kandungan air dalam daun sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak maksimum, sedangkan zat aktif yang terkandung dalam daun akan menguap pada suhu lebih tinggi, sehingga diperkirakan tidak ikut menguap bersama pengeringan tersebut. Daun yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender. Setelah halus, ditimbang lalu dibungkus menggunakan kertas saring. Kertas saring yang berisi daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung ekstraksi. Tuang etanol ke dalam tabung ekstraksi sehingga daun alpukat terendam etanol 96 %. Supaya etanol tercampur rata ke dalam bubuk ekstrak sebaiknya larutan daun alpukat diaduk selama 15 menit. Diamkan larutan tersebut selama kurang lebih 12 jam. Setelah 12 jam, keluarkan etanol yang telah berisi zat aktif, kemudian ganti dengan satu liter etanol yang baru. Aduk selama 15 menit dan diamkan selama 12 jam. Ulangi langkah tersebut beberapa kali sampai air ekstrak jernih. Lalu hasil ekstraksi dievaporasi.

4.7.1.2 Proses Evaporasi

Evaporator dipasang pada tang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30° - 40° terhadap meja percobaan dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, Rotary evaporator dan tabung pendingin. Lalu tabung pendingin dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin dengan melalui pipa

plastik. Tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.

Hasil ekstraksi dipindahkan ke labu penampung sedangkan Rotary evaporator, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan. Alat pemanas aquades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam labu penampung hasil evapoasi mendidih dengan suhu 80 °C (sesuai titik didih etanol) dan etanol mengap. Hasil penguapan etanol direkomendasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak bercampur dengan hasil evaporasi dan uap lain tersedot oleh pompa vakum.

Evaporasi dilakukan hingga hasil evaporasi berkurang dan sampai kental. Setelah kental, evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cairan penguap dan dioven selama 2 jam pada suhu 80 °C untuk menguapkan pelarut yang terisisa didapat hasil ekstrak 100%.

Hal ini bertujuan agar efek antibakteri ekstrak daun alpukat pada penelitian ini tidak dipengaruhi oleh etanol, karena ekstrak sudah mengalami proses evaporasi pada suhu 80 °C, sedangkan titik didih etanol pada suhu 78 °C

4.7.2 Identifikasi *Streptococcus pyogenes*

Identifikasi *Streptococcus pyogenes* dilakukan dengan sejumlah tes yang terdiri atas tes pewarnaan gram, tes hemolitik, tes katalase dan tes cakram basitrasin. Tes pewarnaan gram bertujuan untuk membedakan bakteri gram positif dan negatif. Tes hemolitik bertujuan untuk menentukan sifat hemolisis dari bakteri. Tes katalase bertujuan untuk membedakan *Streptococcus* dari *Staphylococcus*. Pada *Streptococcus pyogenes* akan didapat bahwa sebagian

plate tampak bening karena bersifat β -hemolitik. Tes cakram basitrasin membedakan *Streptococcus pyogenes* dengan grup *streptococcus* lainnya. Koloni *Streptococcus pyogenes* yang sangat kecil akan menghasilkan zona hambat di sekitar cakram basitrasin.

4.7.2.1 Tes Katalase

Untuk membedakan antara kuman *Staphylococcus* dan *Streptococcus* dilakukan uji katalase, yaitu dengan menambahkan larutan H_2O_2 3% pada perbenihan cair. *Staphylococcus* akan memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan munculnya gelembung udara. Langkah uji katalase sebagai berikut: membuat suspensi kuman pada gelas objek, pertama ditambahkan 1 tetes larutan salin/aquades steril pada gelas objek, kemudian ditambahkan 1 ose koloni kuman, dan ditetesi dengan 1 tetes H_2O_2 3% dan diamati timbulnya gelembung – gelembung udara pada media perbenihan.

4.7.2.2 Pewarnaan Gram

- a. Object glass dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak. Biarkan menjadi dingin.
- b. Sediaan apusan bakteri *Streptococcus pyogenes* dibuat pada object glass dengan ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal, juga tidak terlalu tipis). Setelah mengering di udara, apusan difiksasi dengan cara dilewatkan di atas api Bunsen sebanyak tiga kali.
- c. Sediaan dituangi dengan larutan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.

- d. Sediaan dituangi dengan Lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan dituangi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- f. Sediaan dituangi dengan Safranin selama 30 detik. Sisa Safranin dibuang dan dibilas dengan air.

4.7.2.3 Tes 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. Jika terdapat zona hambat > 15 mm, hasil diidentifikasi sebagai *Streptococcus pyogenes* (Kumar, 2012).

4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri Dengan Kepadatan 10^6 bakteri/ml

Suspensi bakteri pada MH Broth dispektrofotometri dengan $\lambda=625$ sehingga diketahui *Optical Density* (OD) yang setara dengan 10^8 bakteri/ml. Kemudian dengan rumus pengenceran $N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$, kepadatan bakteri tersebut diencerkan 2X dengan NaCl menjadi 10^6 bakteri/ml. (Murray *et al*, 2002)

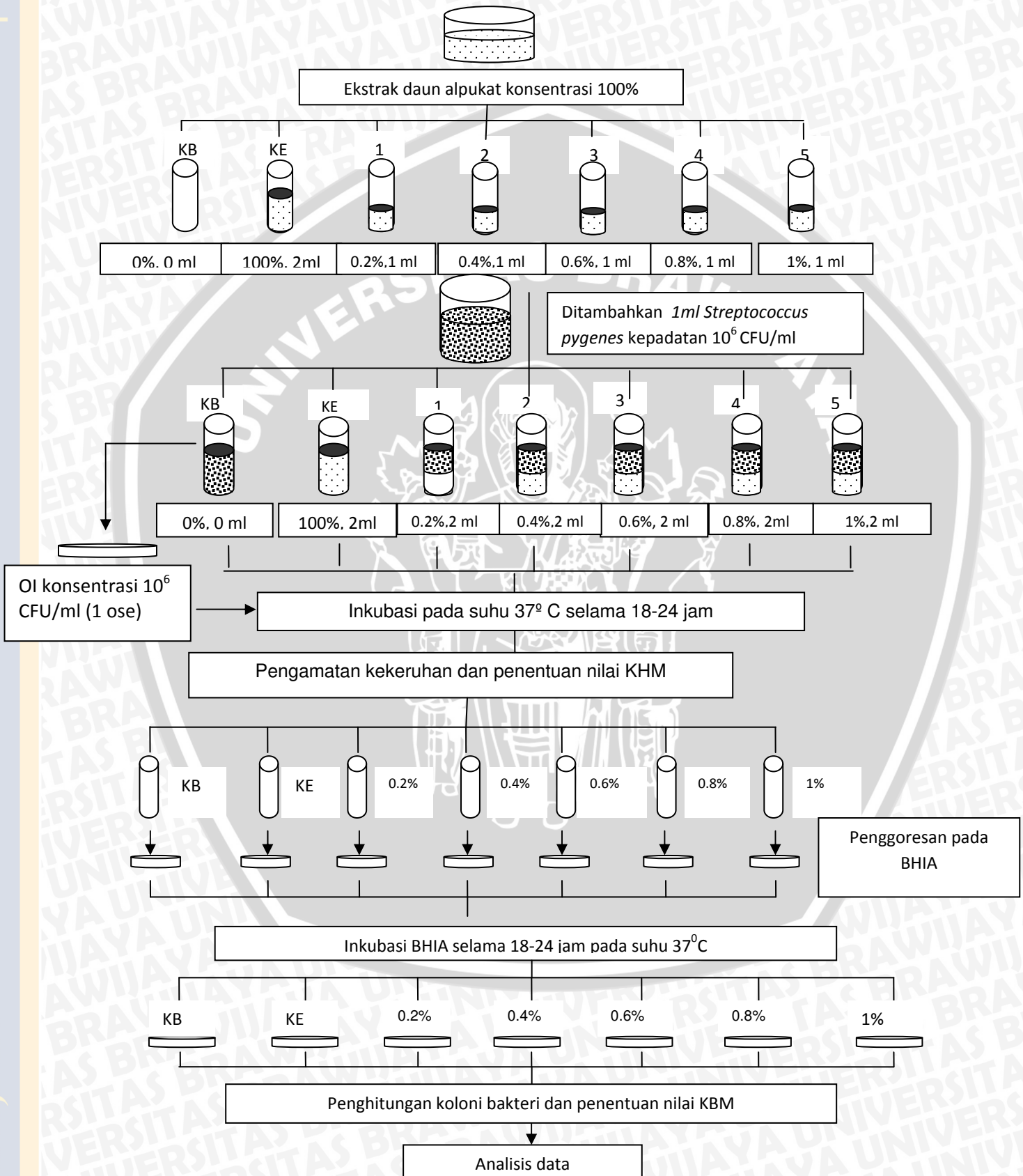
4.7.4 Pengujian Efek Antibakteri

- a. Disiapkan 7 tabung steril, 5 tabung reaksi untuk setiap perlakuan, 1 tabung kontrol bakteri (KB), dan 1 tabung kontrol ekstrak (KE).
- b. Hal yang pertama dilakukan adalah mencari dosis dengan penelitian eksplorasi. Setiap tabung (tabung 1 sampai dengan tabung 5) diisi

sediaan ekstrak daun alpukat dengan konsentrasi 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1%.

- c. Tabung 1 sampai 5 serta kontrol bakteri (KB) masing-masing ditambahkan 1 ml suspensi *Streptococcus pyogenes* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml
- d. Masing-masing tabung di-*vortex* dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam.
- e. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung
- f. Perlakuan yang sama dilakukan pada *streaking plate* yang menggunakan medium agar padat (BHIA). Masing-masing tabung dilusi, diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada BHIA. Disiapkan 6 buah cawan petri yang diberi medium BHIA. Bakteri diinokulasikan pada masing-masing medium dengan menggoreskan satu ose pada masing-masing cawan petri. Kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37° C.
- g. Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *Colony Counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada BHIA atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di OI.

4.7.5 Rancangan Penelitian



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

Keterangan

CFU : Colony Forming Unit

KB : Kontrol bakteri *Streptococcus pyogenes*

KE : Kontrol Ekstrak

OI : Original inoculum dengan kepadatan 10^6 CFU/ml dengan penggoresan 1 ose

0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1% : Konsentrasi ditentukan dengan penelitian pendahuluan (V/V)

4.8 Pengumpulan Data

Data yang diperoleh berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif didapatkan dengan cara melihat tingkat kekeruhan. Data kuantitatif didapat dengan cara menghitung jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* dengan menggunakan *colony counter*.

4.9 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian menggunakan tes Kolmogorov Smirnov. Apabila data terdistribusi normal, 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 daun alpukat terhadap jumlah koloni *Streptococcus pyogenes*. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan

hubungan antara konsentrasi ekstrak daun alpukat terhadap pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*. (Maulidi, 2011)

