

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah dengan *True Experimental-post test only Control Group Design* dengan metode dilusi agar. Sehingga diketahui efek ekstrak buah delima sebagai antimikroba, dalam hal ini mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2014 pada rentang waktu September-November 2014.

4.3 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Staphylococcus aureus*, yang dimiliki oleh laboratorium mikrobiologi FKUB. Pada penelitian ini, digunakan 6 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda. Isolat yang diambil berasal dari urine, darah, dan feses.

4.4 Variabel

4.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak ethanol buah delima.

4.4.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar kekeruhan dan jumlah koloni *Staphylococcus aureus* dalam media padat.

4.5 Definisi Operasional

- Sediaan ekstrak ethanol buah delima adalah sediaan yang berasal dari buah delima yang diekstrak dengan ethanol dengan asumsi konsentrasi awal adalah 100%
- Isolat bakteri adalah isolat bakteri *Staphylococcus aureus* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

- KHM adalah konsentrasi terendah ekstrak buah delima yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang pada metode dilusi agar ditandai dengan pertumbuhan koloni kurang dari tiga pada media yang ditetesi 1×10^4 CFU/ml
- Penilaian pertumbuhan koloni menggunakan skoring
 - 0 : tidak ada pertumbuhan koloni
 - +1 : pertumbuhan koloni bisa dihitung
 - +2 : pertumbuhan koloni tipis dan tidak bisa dihitung
 - +3 : pertumbuhan koloni tebal dan tidak bisa dihitung

4.6 Bahan dan Alat

4.6.1 Pembuatan Ekstrak

- *Evaporator*
- timbangan ukur
- pendingin spiral / *rotatory evaporator*
- labu erlenmeyer
- selang *water pump*
- corong gelas
- *water pump*
- kertas saring
- *waterbath*
- labu evaporator
- *vacum pump*
- labu penampung
- bubuk ekstrak buah delima
- air suling
- etanol 96%

4.6.2 Identifikasi Bakteri

- Isolat bakteri *Staphylococcus aureus*
- cawan petri
- inkubator
- bahan pewarna gram: kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin, minyak emersi, ose, mikroskop binokuler.

4.6.3 Dilusi Agar

Alat :

- tabung reaksi
- mikropipet
- inkubator
- vortex
- bunsen
- korek api
- ose
- penggaris
- plate kosong dan steril
- kapas.

Bahan:

- ekstrak buah delima
- isolat bakteri *S. aureus*
- alkohol 95%
- air suling
- media dilusi agar.

4.7 Prosedur Penelitian**4.7.1 Persiapan Buah delima****4.7.1.1 Proses Pengeringan**

- Buah delima dicuci dari kotoran, dikupas kulit luarnya dengan sangat tipis, dikerok isinya beserta sebagian perikardnya, tiriskan, keringkan, selanjutnya ditimbang.
- Keringkan dengan sinar matahari atau udara.

4.7.1.2 Proses Ekstraksi

- Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi.
- Buah delima kering ditumbuk halus menjadi bubuk lalu ditimbang dalam timbangan ukur seberat 100 gram.
- Bungkus menggunakan kertas saring dan direndam dalam etanol 96% selama semalam. Kemudian hasil ekstraksi siap untuk dievaporasi.

4.7.1.3 Proses Evaporasi

- Evaporator sel dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30°-40° terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotatory evaporator* dan tabung pendingin, kemudian tabung pendingin dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui pipa plastik. Tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.
- Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam labu penampung sedangkan *rotatory evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin, dan alat pompa vakum dinyalakan. Pemanas aquades juga dinyalakan pada suhu 65°C (titik didih etanol) sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih dan etanol mulai menguap.
- Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum
- Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah menjadi kental, evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi

ditampung dalam cawan penguap kemudian dioven selama 2 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstrak 100%

- Ekstrak kemudian ditimbang dengan neraca analitik

4.7.2 Preparasi Bakteri

4.7.2.1 Tes konfirmasi bakteri *Staphylococcus aureus*

4.7.2.1.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram

1. Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas obyek, kemudian diambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan aquades yang telah diletakkan di atas gelas obyek. Kemudian dibiarkan kering di udara.
2. Suspensi bakteri yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkannya di atas api beberapa kali dan siap diwarnai.
3. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama 1 menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan perlahan-lahan.
4. Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama 1 menit, lalu lugol tersebut dibuang dan dibilas dengan air.
5. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
6. Sediaan ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat dibawah mikroskop.

4.7.2.1.2 Tes Katalase

1. Mengambil sebagian perbenihan *Staphylococcus aureus*
2. Tetesi dengan H₂O₂ 3%. Bila terdapat gelembung, maka merupakan positif bakteri *Staphylococcus aureus*

4.7.2.2 Pembuatan suspensi uji bakteri

1. Beberapa koloni *S. aureus* dipindahkan ke tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth* dengan menggunakan ose.
2. Untuk mengetahui optical density (OD) sama dengan 1 dari suspensi tersebut, lakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625nm.
3. Untuk mendapatkan konstantasi bakteri sebesar 10⁶ CFU/ml yang setara dengan OD = 0,1, lakukan pengenceran suspensi bakteri dengan konstantasi sebanyak 2

kali, caranya: dari 10 ml bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl, aduk rata sampai larutan homogen sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^7 CFU/ml. Lalu dari larutan homogen sehingga konsentrasi bakteri 10^7 CFU/ml tersebut diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml *nutrient broth*, aduk rata sampai larutan homogen, sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/ml (Dzen dkk, 2003).

4.7.3 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Buah Delima

Cara menentukan konsentrasi ekstrak buah delima dalam media agar adalah sebagai berikut :

$$X = \frac{V \text{ perasan}}{V \text{ perasan} + V \text{ agar}}$$

X = konsentrasi buah delima yang digunakan dalam media agar

V = volume

Volume total dari agar plate diasumsikan sebesar 20 ml. Konsentrasi ekstrak penelitian pendahuluan yang digunakan dalam percobaan ini adalah 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%

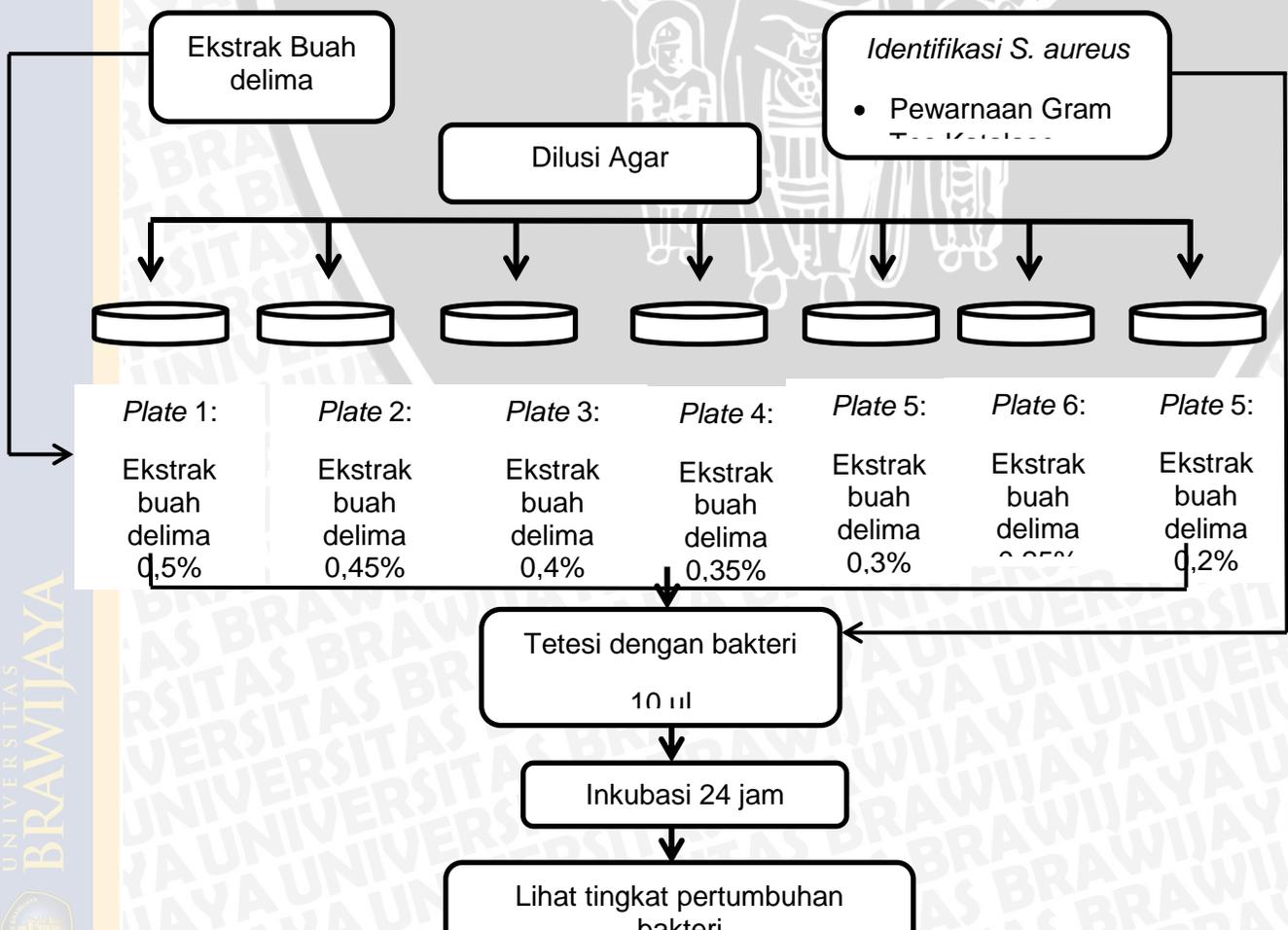
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak buah delima 5% dibutuhkan 1 ml ekstrak buah delima dan 10 ml agar.
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak buah delima 2,5% dibutuhkan 0,5 ml ekstrak buah delima dan 15 ml agar.
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak buah delima 1,25% dibutuhkan 0,25 ml ekstrak buah delima dan 17,5 ml agar.
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak buah delima 0,625% dibutuhkan 0,125 ml ekstrak buah delima dan 18,75 ml agar.
- Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak buah delima 0,3% dibutuhkan 0,625 ml ekstrak buah delima dan 19,375 ml agar.

4.7.3.1 Pengujian Efek Antimikroba

- Sediakan 6 plate steril berdiameter 9 cm.
- Tandai plate untuk pengujian efek anti bakteri pada plate 1 sampai 7: 0,5%, 0,45%, 0,4%, 0,35%, 0,3%, 0,25%, 0,2%, 0%

- Volume yang dipakai dalam setiap plate untuk mencampur agar adalah 20 ml, sehingga volume ekstrak yang dimasukkan ke dalam ke masing-masing plate adalah sebagai berikut:
 - Plate 1 : 0,5 ml ekstrak buah delima dan 15 ml agar
 - Plate 2 : 0,48 ml ekstrak buah delima dan 15,2 ml agar
 - Plate 3 : 0,46 ml ekstrak buah delima dan 15,4 ml agar
 - Plate 4 : 0,44 ml ekstrak buah delima dan 15,6 ml agar
 - Plate 5 : 0,42 ml ekstrak buah delima dan 15,8 ml agar
 - Plate 6 : 0,4 ml ekstrak buah delima dan 16 ml agar
 - Plate 7 : 20 ml agar
- Bakteri uji yang dipakai adalah bakteri yang diencerkan sampai 10^6 CFU/ml.
- Setelah agar dingin, plate tersebut ditandai menjadi 4 bagian yang pada setiap bagian ditetesi bakteri uji sebanyak 10^4 CFU/10 μ l. Kemudian semua plate diinkubasikan selama 18-24 jam.
- Setelah koloni tumbuh, dibaca hasilnya. Konsentrasi ekstrak pada dilusi agar plate yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni disebut sebagai KHM larutan ekstrak.

4.8 Skema Penelitian



Skema diatas merupakan gambaran dari pembagian konsentrasi yang digunakan dengan kontrol 0% tanpa menggunakan konsentrasi ekstrak

4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data kualitatif dari hasil pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* pada agar plate yang diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam berupa data konsentrasi ekstrak buah delima dan pertumbuhan koloni bakteri. Analisis yang digunakan adalah uji statistik Kruskal Wallis untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak buah delima terhadap *Staphylococcus aureus* sehingga dapat disimpulkan jika ekstrak buah delima memiliki pengaruh yang signifikan terhadap *Staphylococcus aureus*, uji Mann Whitney yang digunakan untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian ekstrak buah delima sebagai antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* pada setiap konsentrasi yang diberikan, dan uji korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian perlakuan terutama yang disebabkan oleh pemberian ekstrak buah delima dengan pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus*. Dalam penelitian ini, besar kepercayaan yang dipakai adalah 0,95 untuk tingkat signifikansi (α)= 0,05.