

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah desain penelitian *true experimental post control design only* untuk mengetahui efektifitas antimikroba ekstrak propolis *Trigona sp* terhadap *Staphylococcus aureus* secara in vitro.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan kemudian dikultur di Laboratorium tersebut.

#### 4.3 Variabel Penelitian

##### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak propolis *Trigona sp* dengan konsentrasi 1,4%, 1,2%, 1,0%, 0,8%, 0,6%, 0,4% dan 0,2%. Berdasarkan data penelitian pendahuluan. Rentang konsentrasi digunakan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) yang lebih tepat serta untuk mendapatkan persamaan regresi yang lebih teliti. Jarak ini masih dianggap ideal karena jarak yang terlalu dekat (<1%) akan menyebabkan tingkat kesalahan pengambilan ekstrak meningkat.

##### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

#### 4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari 2014

#### 4.5 Alat dan Bahan

##### 4.5.1 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi Propolis *Trigona sp*

- a. Botol kaca berwarna gelap
- b. Timbangan ukur
- c. Gelas ukur
- d. Freezer
- e. Mortar dan Pastle
- f. Filter (Kain katun/Kertas Saring)
- g. Propolis *Trigona sp*
- h. Aquadest
- i. Perangkat destilasi, pengering beku untuk menguapkan pelarut

##### 4.5.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

- a. Isolat bakteri *Staphylococcus aureus*
- b. Bahan pengecatan Gram
- c. Minyak emersi
- d. Ose
- e. Mikroskop
- f. Api spiritus
- g. Object glass
- h. Kertas penghisap

#### 4.5.3 Alat dan Bahan untuk Perbenihan Cair Bakteri

- a. Tabung reaksi
- b. BHI (*Brain Heart Infusion*) Broth
- c. Pipet pengencer (*ependorf*)
- d. Inkubator

#### 4.5.4 Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Tabung

- a. Tabung reaksi
- b. Pipet steril
- c. Inkubator
- d. Ekstrak propolis *Trigona sp*
- e. Perbenihan cair bakteri yang sudah distandarisasikan
- f. *Aquadest* steril
- g. Rak tabung reaksi
- h. Spidol
- i. Kertas label
- j. Vortex
- k. Media agar BHI (*Brain Heart Infusion*)

#### 4.6.1 Definisi Operasional

- a. Propolis *Trigona sp* yang digunakan adalah propolis yang masih mentah (*raw propolis*) yang dibeli melalui situs jual beli online langsung dari Peternakan Lebah *Trigona sp* SAMBAS, TB. Millenium Pasar Melayu di Kabupaten Sambas Kalimantan Barat milik Bapak Asep Carsan.



- b. Isolat *Staphylococcus aureus* adalah stok kultur murni Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang tidak bercampur dengan jenis mikroba atau fungi lainnya dan telah diidentifikasi di Laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Standar kepadatan bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan dalam penelitian ini sebesar  $10^6$  CFU/ml. Satuan CFU merupakan singkatan dari *Colony Forming Unit*.
- c. KHM (Kadar Hambat Minimum) adalah konsentrasi ekstrak propolis *Trigona sp* terendah yang mampu menghambat perkembangbiakan bakteri *Staphylococcus aureus*.
- d. KBM (Kadar Bunuh Minimum) adalah konsentrasi ekstrak propolis *Trigona sp* terendah yang mampu membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*. Dalam menentukan KBM perlu pembuatan *Original Inoculum* (OI) terlebih dahulu dan apabila pertumbuhan bakteri  $<0,1\%$  maka KBM didapatkan pada konsentrasi tersebut.

#### 4.7 Estimasi Pengulangan

Banyaknya pengulangan yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Solimun, 2001):

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi flavonoid dari ekstrak propolis *Trigona sp*, satu kontrol bahan dan satu kontrol bakteri ( $p = 5 + 2 = 7$ ) maka didapatkan jumlah pengulangan:

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,143 \approx 4$$

Jadi jumlah pengulangan yang perlu dilakukan pada penelitian ini adalah 4 kali.

#### 4.8 Cara Kerja

##### 4.8.1 Pembuatan Ekstrak Propolis *Trigona sp* 100%

- Propolis mentah yang sudah bersih dalam kondisi membeku sebanyak 100 g (mempermudah pengerjaan dan tidak lengket) ditumbuk hingga menjadi 100 g serbuk propolis
- Propolis dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap lalu ditambahkan *aquadest* sebanyak 100 ml
- Botol yang sudah berisi bubuk propolis dan *aquadest* dikocok sesering mungkin selama 10 jam
- Setelah 10 jam, campuran tersebut disaring menggunakan kertas saring berlapis agar cairan jernih
- Larutan hasil ekstraksi dimasukkan ke botol berwarna gelap lainnya dan simpan di tempat sejuk dan gelap
- Diperoleh larutan ekstrak propolis *Trigona sp* dengan konsentrasi 100%.

(Dzen dkk, 2006)

#### 4.8.2 Pembuatan Ekstrak Propolis *Trigona sp*

- a. 1,4% = 0,014 ml ekstrak 100% ditambah 0,986 ml *aquadest*
- b. 1,2% = 0,012 ml ekstrak 100% ditambah 0,988 ml *aquadest*
- c. 1,0% = 0,01 ml ekstrak 100% ditambah 0,99 ml *aquadest*.
- d. 0,8% = 0,008 ml ekstrak 100% ditambah 0,992 ml *aquadest*.
- e. 0,6% = 0,006 ml ekstrak 100% ditambah 0,994 ml *aquadest*.
- f. 0,4% = 0,004 ml ekstrak 100% ditambah 0,996 ml *aquadest*
- g. 0,2% = 0,002 ml ekstrak 100% ditambah 0,998 ml *aquadest*.
- h. Kontrol Bakteri (KB) = biakan *Staphylococcus aureus*.
- i. Kontrol Ekstrak (KE) = 1 ml ekstrak propolis *Trigona sp* 100%.

(Dzen dkk, 2006)

#### 4.8.3 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

- a. Dibuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan udara.
- b. Sesudah kering difiksasi di atas api bunsen.
- c. Sediaan dituangi kristal violet selama 1 menit.
- d. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan dituangi lugol selama 1 menit.
- f. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- g. Sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik.
- h. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- i. Sediaan dituangi safranin selama 0,5 menit.
- j. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- k. Dikeringkan dengan kertas penghisap.



- I. Diamati dengan mikroskop pembesaran 100-400x dengan intensitas sinar rendah.

(Dzen dkk, 2006)

#### 4.8.4 Tes Katalase

Untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus* dilakukan uji katalase, yaitu dengan menambahkan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pada perbenihan cair. *Staphylococcus* akan memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan munculnya gelembung udara. Langkah uji katalase menurut Dzen dkk, (2006) sebagai berikut :

Dibuat suspensi bakteri pada gelas obyek :

- a. 1 tetes larutan *aquadest* steril
- b. Ditambahkan 1 koloni bakteri
- c. Ditetesi dengan 1 tetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dan diamati timbulnya gelembung – gelembung udara pada media perbenihan

#### 4.8.5 Pemiakan Bakteri dengan BHI *broth*

*Staphylococcus aureus* yang telah diidentifikasi dibiakkan pada medium cair dengan menggunakan BHI *broth* selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C.

#### 4.8.6 Persiapan Suspensi dan pembuatan *Original Inoculum* bakteri *Staphylococcus aureus*

- a. Dipersiapkan bakteri *Staphylococcus aureus* dari media BHI *Broth* yang telah diuji konfirmasi.
- b. Ambil 5 koloni (d ≥ 1mm) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan

optisnya dengan spektrofotometer pada  $\lambda_{\text{maks}} = 650 \text{ nm}$ . Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung  $1 \times 10^8$  hingga  $5 \times 10^8$  CFU/ml dengan rumus  $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$  (Murray dan Rosenthal, 2005).

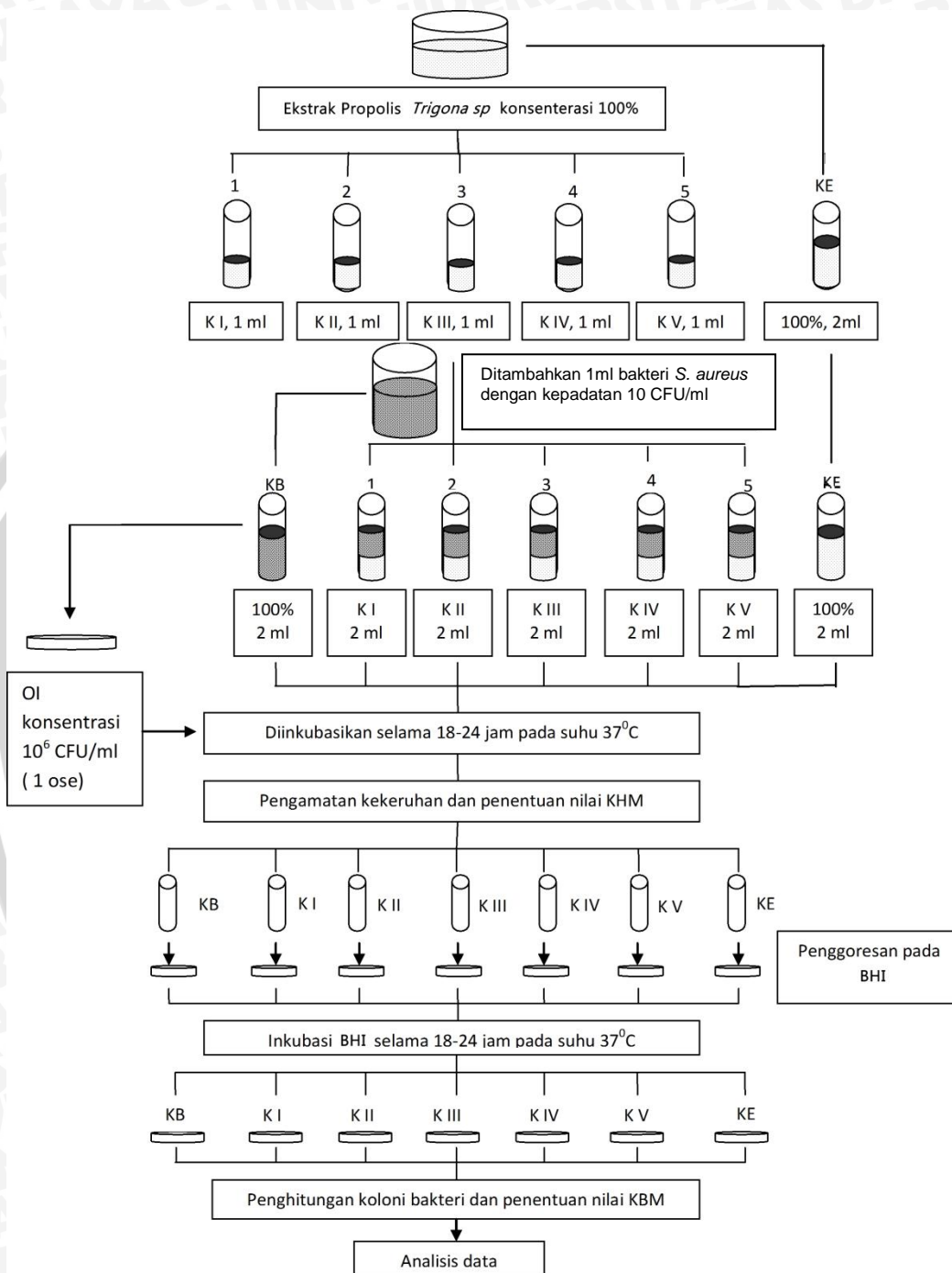
- c. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung  $0,5 \times 10^6$  hingga  $2,5 \times 10^6$  CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung  $10^8$  CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi  $10^7$  CFU/ml. Proses dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu  $0,5 \times 10^6$  hingga  $2,5 \times 10^6$  CFU/ml (Murray dan Rosenthal, 2005).

#### 4.8.7 Tes Sensitivitas dengan Metode Dilusi

Prosedur yang dilakukan yaitu siapkan tabung reaksi untuk koloni *Staphylococcus aureus* yang dibiakkan dalam BHI dan telah disetarakan kekeruhannya dengan spektrofotometer. Kemudian siapkan ekstrak dalam berbagai konsentrasi. Siapkan pula kontrol negatif dan kontrol positif. Kemudian tambahkan *Staphylococcus aureus* pada masing-masing tabung konsentrasi ekstrak dan tabung kontrol positif. Inkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Setelah diinkubasi, lihat kekeruhan pada tabung. Dari kekeruhan ini didapatkan nilai KHM. Setelah itu dilakukan pengenceran hasil dilusi. Hasil pengenceran dibiakkan dalam media agar BHI. Inkubasi dalam suasana anaerob selama 1 x 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Setelah diinkubasi, lihat *colony forming unit* yang terbentuk. Dari hasil tersebut, tentukan nilai KBM.



4.9. Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Uji Antimikroba Ekstrak Propolis *Trigona sp* Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

#### 4.10 Analisa Data

Setelah diperoleh hasil dari 4 kali pengulangan percobaan, kemudian data-data jumlah koloni yang tumbuh dianalisa dengan menggunakan uji statistik *One Way ANOVA*, dan uji statistik korelasi. Uji statistik *One Way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95 % ( $\alpha = 0,05$ ) apabila  $< 0,05$  hipotesis diterima dan apabila  $> 0,05$  hipotesis ditolak. Uji statistik ini digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak propolis *Trigona sp* terhadap jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus*. Sedangkan uji korelasi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan konsentrasi ekstrak propolis *Trigona sp* terhadap jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan mengetahui bagaimana sifat hubungan tersebut, apakah dengan peningkatan konsentrasi akan menjadi penurunan jumlah koloni, dan sebaliknya, atau tidak berhubungan.

