

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

**4.1 Rancangan penelitian**

Desain penelitian yang dilakukan adalah *True Experimental – Post test only Control Group Design* dengan menggunakan ekstrak etanol daun seledri terhadap pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* secara *in vitro* melalui metode difusi sumuran untuk menentukan zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran

**4.2 Populasi dan Sampel**

Penelitian ini menggunakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ekstrak daun seledri didapatkan dari Laboratorium Materia Medica Batu

**4.3 Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Juni – Agustus 2015

**4.4 Variabel Penelitian****4.4.1 Variabel Bebas ( *independent* )**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah larutan ekstrak etanol daun seledri dalam berbagai konsentrasi (25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% dan 100%)

**4.4.2 Variabel Tergantung ( *dependent* )**

Variable terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona inhibisi yang tampak di sekitar lubang sumuran

**4.5 Pengulangan**

Penelitian ini menggunakan enam konsentrasi perlakuan yang berbeda. Jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus estimasi pengulangan sebagai berikut (Loekito, 1998) :

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

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 21/6$$

$$n \geq 3,5 \rightarrow 4$$

Jadi pada penelitian ini masing – masing perlakuan dilakukan 4 kali pengulangan

Keterangan :

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (konsentrasi ekstrak daun seledri )

#### 4.6 Definisi Operasional

##### 4.6.1 Ekstrak etanol daun seledri

Hasil ekstrak daun seledri dengan pelarut etanol 96%, zat yang dihasilkan dari ekstraksi daun seledri yang mengandung zat aktif secara kimiawi dari proses evaporasi

##### 4.6.2 Antimikroba

Suatu zat yang dapat menghambat atau membunuh bakteri yang digunakan adalah isolat *Staphylococcus epidermidis* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

##### 4.6.3 Metode Sumuran

Metode yang dilakukan dengan cara membuat lubang pada campuran agar *Mueller Hinton* dan suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis*  $10^8$  CFU/ml yang telah mengeras di dalam cawan petri. ekstrak daun seledri ditetaskan sebanyak 100 mikroliter pada lubang sumuran tersebut, lalu diamati zona inhibisi yang terbentuk

##### 4.6.4 Zona Inhibisi

Zona bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dan menunjukkan bahwa bahan antimikroba dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin lebar zona inhibisi, semakin rentan bakteri tersebut terhadap ekstrak daun seledri kemudian dihitung dengan milimeter (mm) menggunakan jangka sorong

#### 4.6.5 Uji kontaminasi

Uji yang dilakukan kepada suatu bahan untuk melihat terdapat pertumbuhan bakteri, dengan cara bahan ekstrak etanol daun seledri ditanam pada medium NA

#### 4.7 Alat dan bahan penelitian

##### 4.7.1 untuk pembuatan ekstrak

###### 1. Alat

- Vacuum oven
- Gelas kimia 250 ml
- Kertas saring whatman no 40
- Timbangan analitik
- Botol timbangan(cawan petri)
- Spatula
- Desikator
- Penjepit cawan petri
- Timble
- Blender

###### 2. Bahan

- Daun seledri
- Botol hasil ekstraksi
- Etanol 96%
- Akuades

##### 4.7.2 Untuk Identifikasi Bakteri

###### 1. Alat

- a. Ose
- b. Tabung reaksi
- c. Mikroskop
- d. Kertas penghisap
- e. Minyak emersi

- f. Lampu spiritus
- 2. Bahan
  - a. Isolat *Staphylococcus epidermidis*
  - b. BHI broth
  - c. *Mueller hinton* agar
  - e. Glass object
  - f. Kristal violet
  - i. Akuades
  - j. Larutan lugol
  - k. Alkohol 96%
  - l. Safranin
  - m. Microbact

#### 4.7.3 Untuk Uji Kepekaan Ekstrak Daun Seledri

- 1. Alat
  - a. Plate kosong dan steril
  - b. Mikropipet 1 ml
  - c. Inkubator
  - d. Lampu spiritus
  - e. Vorteks
  - f. Pelubang sumuran
  - g. Jangka sorong
- 2. Bahan
  - a. Perbenihan cair bakteri *Staphylococcus epidermidis*
  - b. Ekstrak daun seledri
  - c. Agar mueller hinton
  - d. Akuades

#### 4.8 Metode Pengumpulan Data

##### 4.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Seledri

Pembuatan ekstrak daun seledri dikerjakan oleh tenaga ahli di Laboratorium Material Medika. Daun seledri (*Apium graveolens* L.) diperoleh dari kebun tanaman obat keluarga di Balai Material Medika. Daun seledri segar sebanyak 1 kg dicuci bersih dengan air mengalir dan ditiriskan menggunakan tampah. Kemudian daun seledri dioven pada suhu 50 °C selama 20 jam. Simplisia kering ditimbang dan diperoleh berat sebanyak 126 gram, lalu dihaluskan dengan blender dan diayak menggunakan ayakan berukuran 50 mesh dan diperoleh simplisia halus sebanyak 109 gram. Simplisia halus direndam dalam etanol 96 % sebanyak 1090 ml pada toples kaca bertutup dengan perbandingan 1:10 b/v selama 24 jam dengan 6 jam pertama dilakukan pengadukan sesekali dan 18 jam berikutnya didiamkan. Hasil rendaman kemudian disaring. Filtrat dari rendaman tersebut dilakukan proses remaserasi menggunakan etanol 96 % sesuai dengan proses maserasi sebelumnya. Semua maserat di evaporasi pada suhu 40-50 °C selama 3 jam menggunakan *rotary evaporator* dan dihasilkan ekstrak kental daun seledri sebanyak 62,49 ml.

#### 4.8.2 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus Epidermidis*

##### a. Pewarnaan Gram

- Dibuat sediaan (slide), di keringkan di udara kemudian di lakukan fiksasi
- Sediaan di tuangi kristal violet dan di biarkan selama 1 menit.
- Sisa bahan pewarnaan dibuang dan di bilas dengan air
- Sediaan dituangi larutan lugol sebagai mordant , dibiarkan selama 1 menit
- Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air
- Sediaan dituangi alkohol 96% sebagai peluntur selama 5-10 detik
- Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air
- Sediaan dituangi safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik
- Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air
- Lihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 97-100x.

Hasil Gram positif ditunjukkan dengan warna ungu, bakteri

*Staphylococcus epidermidis* berbentuk bola berbentuk kelompok dan

tidak teratur

b. Uji katalase

- Siapkan biakan bakteri pada medium plate
- Teteskan larutan hidrogen peroksida ke atas koloni bakteri
- Uji katalase negatif jika terbentuk gelembung gelembung gas O<sub>2</sub> akibat adanya reaksi enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen
- Uji katalase untuk membedakan *Staphylococcus* dengan *Streptococcus*
- *Staphylococcus* jika uji katalasenya positif

c. Uji koagulase

- Ambil satu ose akuades lalu letakkan pada object glass
- Ambil satu koloni bakteri dengan menggunakan ose, lalu campur dengan akuades pada object glass
- Tambahkan satu tetes *Staphylococcus epidermidis*
- Uji koagulase positif jika terbentuk gumpalan pada object glass.
- Uji koagulase dilakukan untuk membedakan *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis* jika uji koagulasenya negatif

d. Inokulasi pada *blood agar plate* (BAP)

- Siapkan biakan bakteri pada *nutrient broth*
- Lakukan *streaking* bakteri pada BAP
- Inkubasi pada suhu 37 derajat selama 18-24 jam
- amati koloni pada BAP, koloni *Staphylococcus epidermidis* pada BAP
- tampak koloni yang muncul berwarna kuning kecoklatan licin dan menghasilkan Bakteri *non hemolytic* pada bakteri *Staphylococcus epidermidis*

c. Inokulasi pada mannitol salt agar (MSA )

- Siapkan bakteri pada nutrient broth
- Lakukan *streaking* bakteri pada MSA
- Inkubasi pada suhu 37<sup>o</sup> c selama 18-24 jam
- Amati koloni pada MSA, koloni *Staphylococcus epidermidis* pada MSA berwarna pink pada koloni

d. Inokulasi pada Nutrient Agar (NA)

- Siapkan bakteri pada *nutrient broth*
- Lakukan *streaking* bakteri pada NA
- Inkubasi pada suhu 37<sup>o</sup> C selama 18-24 jam
- Amati koloni pada NA, koloni *Staphylococcus epidermidis* pada NA berwarna kuning susu

e. Uji biokimia ( fermentasi glukosa, ONPG dan urease) dengan Microbact 12A/E.

- Satu koloni bakteri yang telah diinokulasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan ke dalam 5 ml NaCl 0,9% pada tabung reaksi steril dan di vortex hingga homogen.
- Larutan bakteri yang telah homogen di teteskan ke dalam sumur microbact sebanyak 100IU(4 tetes), untuk sumur lysin, omitin dan H<sub>2</sub>S di tambah dengan tetesan mineral oil sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu Microbact diinkubasi pada suhu 37<sup>o</sup>C selama 18-24 jam.

Evaluasi hasil dilihat melalui sumur – sumur Microbact apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya di tulis pada formulir Patient Record

- Uji fermentasi glukosa dikatakan positif jika menunjukkan warna kuning, sedangkan negatif tidak ada perubahan warna, warna tetap biru
- Uji ONPG dikatakan positif jika terdapat warna kuning pada sumuran dan dikatakan negatif jika tetap *colorless*

- Uji urease dikatakan positif jika terdapat warna merah muda pada sumuran dan tetap *colorless* jika negatif

#### 4.8.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Setelah dipastikan bakteri adalah *Staphylococcus epidermidis*, selanjutnya bakteri di pindahkan ke dalam tabung yang berisi nutrient broth dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C

Kemudian pembentukan cair bakteri dinilai kepadatannya (OD = *Optical Density* ) dengan spektrofotometer pada gelombang cahaya 625 nm. Dari Nilai optical density dapat menunjukkan jumlah kuman pada pembenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui yaitu OD =0,1 ekuivalen dengan jumlah kuman sebesar 10 CFU/ml dengan penghitungan sebagai berikut :

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

V1 = volume bakteri yang ditambah pengencer

N1 = OD bakteri hasil spektrofotometri

N2 = OD bakteri dengan kepadatan  $1 \times 10^8$  bakteri /ml

V2 = volume suspensi kuman

#### 4.8.4 Penelitian Pendahuluan

- a. Siapkan alat dan bahan
- b. Cawan petri sebanyak 5 buah diberikan tanda untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun seledri yang akan di masukkan.
- c. Suspensi bakter *Staphylococcus epidermidis*  $10^8$  CFU/ml dicampurkan dengan agar *Mueller Hinton* sebanyak 15 ml dalam cawan petri
- d. Cawan petri di goyang goyangkan sehingga suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Mueller Hinton* tercampur dengan baik. Kemudian didiamkan beberapa saat hingga mengeras



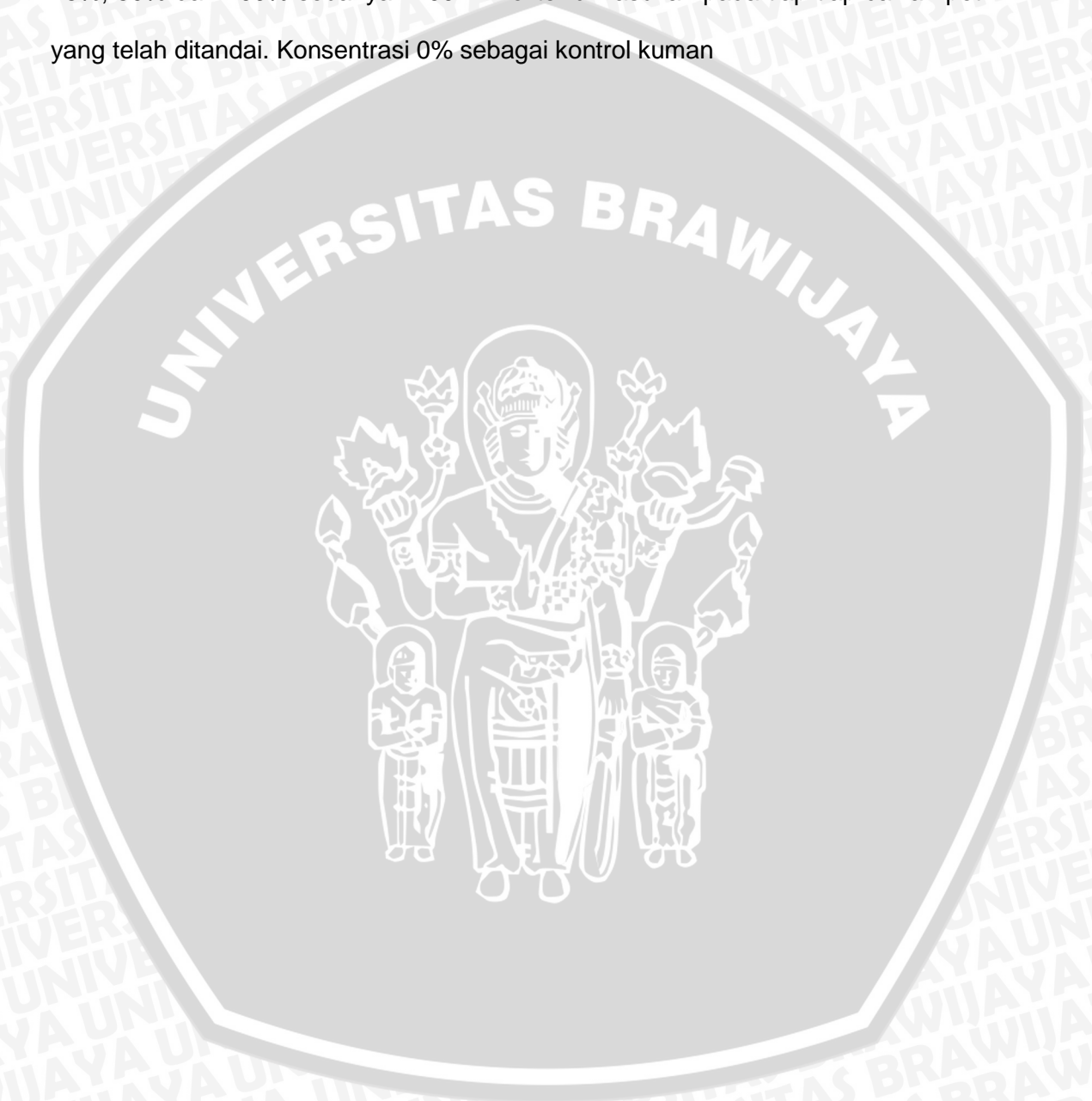
- e. Campuran agar *Mueller Hinton* dan suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis*  $10^8$  CFU/ ml di bagi empat dengan menggunakan penggaris.
- f. Lubang sumuran dibuat pada keempat sisi campuran agar *Mueller Hinton* dan suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis*  $10^8$  CFU/ ml yang telah dibagi sebelumnya, dengan menggunakan pelubang sumuran.
- g. Konsentrasi ekstrak etanol daun seledri dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 50%, dan 100% sebanyak 100 mikroliter dimasukkan pada tiap tiap cawan petri yang telah ditandai
- h. Cawan petri dimasukkan kedalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu  $37^{\circ}$  C
- i. Mengukur diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm) dengan penelitian pendahuluan dapat diketahui konsentrasi yang tidak didapatkan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* (tidak terbentuk zona inhibisi ).

#### 4.8.5 Uji Kepekaan Ekstrak Daun Seledri Terhadap *Staphylococcus Epidermidis*

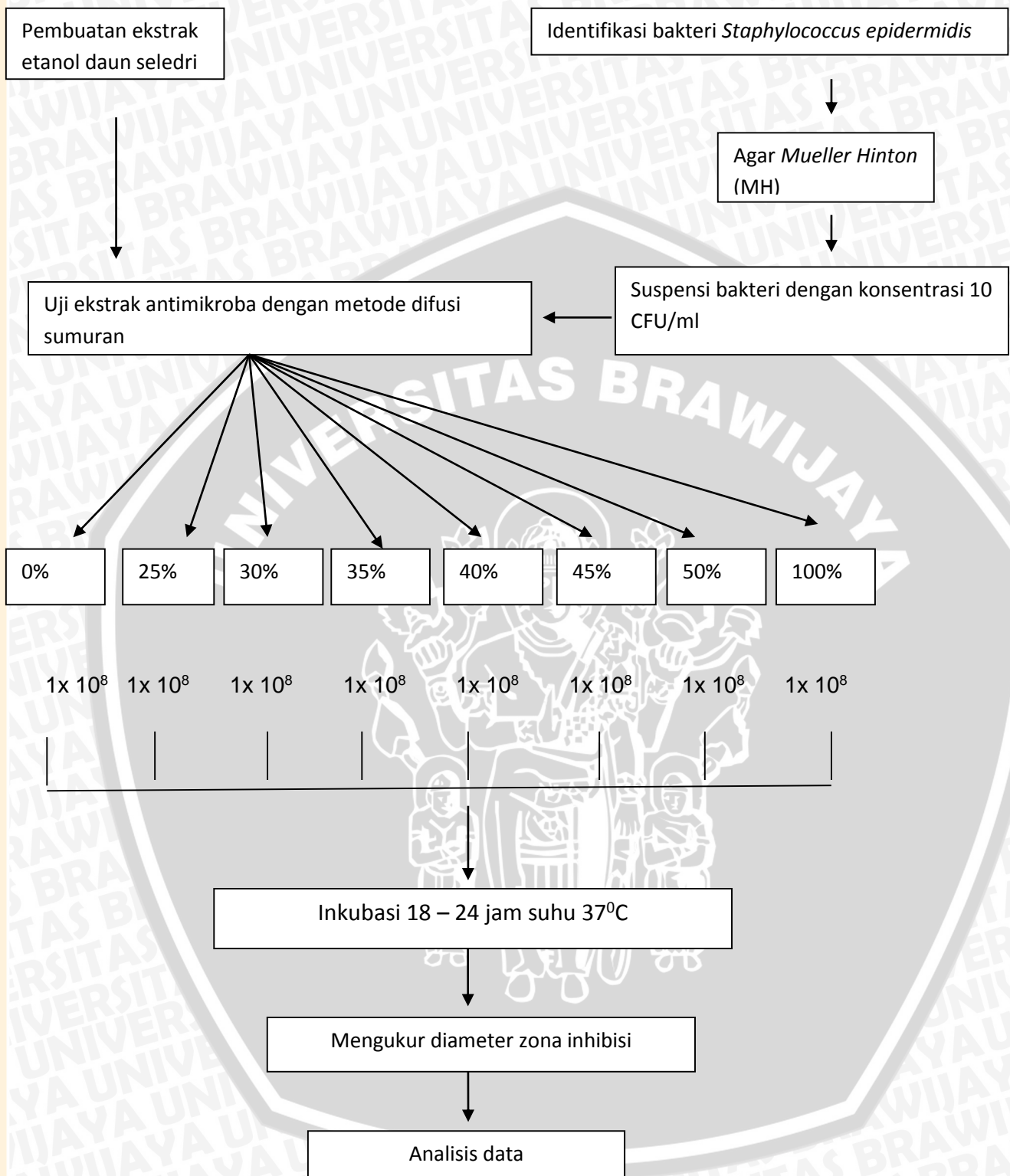
Rangkaian uji kepekaan antimikroba ekstrak etanol daun seledri menggunakan metode sumuran adalah sebagai berikut :

- a. Siapkan alat dan bahan.
- b. Cawan petri sebanyak 8 buah di berikan tanda untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun seledri yang akan di masukkan.
- c. Suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* di campur dengan agar muller hilton sebanyak 15 ml dalam cawan petri.
- d. Cawan petri di goyang goyangkan sehingga suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan agar *Mueller Hilton* tercampur dengan baik . kemudian didiamkan beberapa saat hingga mengeras.
- e. Campuran agar *Mueller Hilton* dan suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* dibagi menjadi empat dengan menggunakan penggaris.

- f. Lubang susmuran dibuat pada keempat sisi campuran agar *mueller hinton* dan suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang telah di bagi sebelumnya , dengan menggunakan pelubang sumuran
- g. Konsentrasi ekstrak etanol daun seledri dengan konsentrasi 0%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50% dan 100% sebanyak 100 mikroliter dimasukan pada tiap tiap cawan petri yang telah ditandai. Konsentrasi 0% sebagai kontrol kuman



#### 4.8.6 Alur Kerja Penelitian



Keterangan : CFU = Colony Forming Unit

MH = Mueller Hinton

#### 4.9 Pengumpulan Data dan Analisis Data

Analisis yang digunakan diawali dengan menggunakan uji normalitas dan homogenitas data. Keduanya digunakan untuk melihat data tersebut parametrik atau non parametrik. Uji komparasi dilakukan menggunakan uji *one way ANOVA* dengan menggunakan program *SPSS 16.0* untuk windows, dengan batas kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Uji *one way ANOVA* digunakan untuk mengetahui perbedaan nyata antar konsentrasi ekstrak etanol daun seledri terhadap pertumbuhan koloni *Staphylococcus epidermidis*.

Uji *Post Hoc-Tukey* digunakan untuk mengetahui pasangan kelompok sampel yang memberikan perbedaan yang signifikan. Uji korelasi pearson digunakan untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat. Dalam penelitian ini, tujuan uji korelasi adalah untuk mengetahui apakah terdapat hubungan yang bermakna antara pemberian ekstrak etanol daun seledri dengan diameter zona inhibisi. Uji regresi dilakukan untuk mengetahui keeratan hubungan antar variabel bebas dan terikat antara peningkatan konsentrasi dengan diameter zona inhibisi.