

## BAB 4

## MATERI DAN METODE PENELITIAN

**4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium (*true experimental-post test only control group design*) dan metode Uji Dilusi Tabung (*tube dilution test*). Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30%, 35% dan 40%.

**4.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Ekstraksi bahan penelitian dilakukan di Politeknik Negeri Malang pada bulan Februari 2015 dan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada rentang waktu Februari 2015 - Mei 2015.

**4.3 Sampel Penelitian**

Penelitian ini menggunakan ekstrak daun *Camellia sinensis var. assamica* dan sampel bakteri uji yang digunakan pada penelitian adalah *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm yang diambil dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

**4.4 Pengulangan**

Jumlah pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan rumus  $(p-1)(n-1) \geq 15$  dengan  $n$  = jumlah pengulangan tiap perlakuan;  $p$  =

jumlah perlakuan. Terdapat 8 perlakuan pada penelitian ini, sehingga estimasi besar sampel adalah

$$(8-1)(n-1) \geq 15$$

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,1 \approx 4$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka besar sampel atau pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4.

#### 4.5 Variabel Penelitian

##### 4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis var. assamica*) dengan konsentrasi tertentu (dalam %).

##### 4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah ketebalan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm untuk menentukan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM).

#### 4.6 Definisi operasional

4.6.1 *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri yang digunakan pada penelitian ini berasal dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.6.2 Biofilm adalah agregat multiseluler yang membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat atau medium. Pada penelitian ini biofilm dibentuk oleh *Pseudomonas aeruginosa* pada medium tabung.

- 4.6.3 Ekstrak *Camellia sinensis var. assamica* adalah hasil ekstraksi cair teh hijau dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Teh hijau berasal dari teh kemasan bernama "Tong Dji".
- 4.6.4 *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi ekstrak *Camellia sinensis var. assamica* terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* yang ditandai dengan tidak tampaknya bentukan cincin dan lapisan ungu kebiruan pada dinding dan dasar tabung.
- 4.6.5 Kontrol Bahan adalah ekstrak daun *Camellia sinensis var. assamica* murni yang tidak dicampur bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril dimana nilai kontrol bahan adalah 0 (tidak terdapat pertumbuhan bakteri jenis apapun).
- 4.6.6 Kontrol kuman adalah biakan bakteri murni yang tidak dicampur dengan ekstrak daun *Camellia sinensis var. assamica* sebagai pembanding pertumbuhan bakteri jika tidak diberikan ekstrak.
- 4.6.7 Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 0%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% dan 40%. Konsentrasi ini akan diuji dan ditentukan dalam penelitian pendahuluan.
- 4.6.8 *Mean Gray Value* adalah skala intensitas warna pada program *Adobe Photoshop CS3*. Skala berkisar antara 0-255. Angka mendekati 0 menunjukkan kepekatan warna yang tinggi. Sedangkan angka mendekati 255 menunjukkan kepekatan warna yang rendah.

#### 4.7 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun *Camellia sinensis*

###### *var. assamica*

1. Teh hijau
2. Pelarut etanol 96%
3. *Vacuum oven* atau *drying oven*
4. Blender/penumbuk
5. *Rotatory evaporator*
6. Kertas saring
7. Tabung pendingin
8. Pemanas aquades
9. Labu penampung berukuran 250 mL
10. *Evaporator* dengan vakum
11. Cawan penguap.

##### 4.7.2 Alat dan bahan untuk Kultur dan Identifikasi bakteri

1. Alat
  - a. Tabung reaksi
  - b. Ose
  - c. Lampu spiritus dan bunsen
  - d. Inkubator
  - e. Spektrofotometer
  - f. Korek api
  - g. Label
  - h. Oksidase strip
  - i. Obyek glass dan kaca penutup
  - j. Mikroskop

## 2. Bahan

- a. Biakan *Pseudomonas aeruginosa*
- b. Medium *Mueller-Hinton Agar Plate*
- c. Medium *MacConkey*
- d. Suspensi bakteri dari *Mueller-Hinton Broth*
- e. Bahan pewarnaan gram : kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin
- f. Akuades steril
- g. Kertas penghisap atau tisu
- h. Minyak emersi

### 4.7.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. *Trypticase Soy Broth* (TSB) dengan 1% glukosa (TSBglu)
2. Biakan *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm
3. Tabung reaksi
4. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) PH 7,3
5. Kristal violet
6. *Deionized water*
7. Ose
8. Pipet
9. *Beaker glass*

## 4.8 Prosedur penelitian

### 4.8.1 Identifikasi bakteri

- a. Pewarnaan Gram (Baron and Fenegold, 1994)

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui *Pseudomonas aeruginosa* termasuk bakteri gram positif atau gram negatif. Prosedur pewarnaan Gram, yaitu:

1. Gelas obyek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api lalu dibiarkan dingin
2. Satu tetes akuades steril diteteskan pada gelas obyek
3. Dengan ose jarum yang steril, diambil sedikit bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang tumbuh pada medium padat kemudian disuspensikan dengan satu tetes akuades steril yang sudah diteteskan terlebih dulu pada gelas obyek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.
4. Hapusan dibiarkan kering di udara. Setelah kering hapusan difiksasi dengan cara melewatkan sediaan sebanyak tiga kali diatas api. Sediaan siap diwarnai.
5. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama satu menit. Kemudian sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan
6. Sediaan dituangi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit setelah itu sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.
7. Sediaan dituangi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan
8. Sediaan dituangi safranin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
9. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak imersi lalu dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 100x
10. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang teramati dibawah mikroskop berupa bakteri batang Gram negatif.

b. Tes Oksidase

Biakan pada *MacConkey* diambil satu ose, kemudian dilakukan tes oksidase. Prosedur tes oksidase adalah sebagai berikut:

1. Pada penelitian ini dilakukan tes oksidase dengan oksidase strip
2. Bakteri yang diperiksa digoreskan dengan ose platina/batang gelas pada kertas tersebut.
3. Tes positif apabila warna goresan tersebut menjadi ungu sampai hitam dalam waktu  $\frac{1}{2}$  menit.

c. Kultur untuk mengidentifikasi bakteri

1. Pada penelitian ini dilakukan tes identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* dengan melakukan *streaking* (penggoresan) bakteri pada medium NAP.
2. Setelah itu, diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ - $42^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam dan dilihat penampakan koloni bakteri pada medium.
3. Koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada medium NAP berwarna hijau karena memproduksi pigmen piosianin. Bakteri tetap tumbuh pada suhu  $42^{\circ}\text{C}$ .

d. Identifikasi Bakteri dengan Vitek

Bakteri diidentifikasi dengan menggunakan Vitek yang terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Saiful Anwar.

e. Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri Kepadatan  $10^8$  CFU/ml

- a. Bakteri dengan karakteristik sama diambil dari NAP kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutriet Broth*.
- b. Tabung reaksi lalu diinkubasikan dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam.

- c. Dilakukan spektrofotometri pada tabung reaksi diatas dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui OD (Optical Density) dari suspensi.
- d. Selanjutnya kepadatan bakteri tersebut dicampur dengan TSBglu dengan 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

$N_2$  = *Optical Density* (0,1 = setara dengan  $10^8$ CFU/ml)

$V_2$  = Volume suspensi bakteri (10 ml)

- f. Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

1. Metode *Tube-test*

*Pseudomonas aeruginosa* yang sudah teridentifikasi ditanam dalam *Nutrient Broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Bakteri yang sudah tumbuh pada *Nutrient Broth*, ditanam kembali pada NAP (sebanyak 40  $\mu$ L) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Mikroba yang sudah dikultur semalam dimasukkan ke tabung TSBglu (10 mL) dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam. Lalu tabung di cuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang. Tabung kemudian dicuci dengan *aquades*. Tabung dikeringkan dan dilihat formasi biofilmnya (Christensen *et al.*, 2000).

g. Uji Hambat Pembentukan Biofilm

1. Ekstrak teh hijau yang kental diambil sebanyak 5 mL dan dicampur dengan aquades sebanyak 5 mL pula sehingga didapatkan ekstrak teh hijau dengan konsentrasi 50% untuk memudahkan pengambilan ekstrak menggunakan pipet mikro
2. Delapan tabung steril dipersiapkan dan akan diberikan konsentrasi ekstrak berbeda, yakni 0% (kontrol), 15%, 20%, 25%, 30%, 35% dan 40%. Bakteri yang sudah dikultur sebelumnya disiapkan dengan perhitungan OD melalui spektrofotometri sehingga kepadatan bakteri  $1 \times 10^8$  bakteri/mL.

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

Keterangan:

$N_1$  = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

$V_1$  = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

$N_2$  = *Optical Density* (0,1 = setara dengan  $10^8$ CFU/ml)

$V_2$  = Volume suspensi bakteri (10 ml)

3. Tujuh tabung diberikan larutan ekstrak teh hijau dengan konsentrasi berbeda seperti yang telah tersebut di atas dengan penghitungan volumenya sebagai berikut.

**Tabel 4.1. Perlakuan Pemberian Konsentrasi Ekstrak Teh Hijau**

Konsentrasi (y %)	Ekstrak TehHijau (xmL)	Suspensi Bakteri (mL)
0%	0	5
15%	0,75	4,25
20%	1	4
25%	1,25	3,75
30%	1,5	3,5
35%	1,75	3,25
40%	2	3

4. Kepada masing-masing tabung tersebut ditambahkan suspensi bakteri yang terdapat pada TSBglu
5. Ketujuh tabung tersebut diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah 24 jam, tabung-tabung tersebut dicuci dengan larutan PBS (pH 7,3) lalu dikeringkan
7. Setelah kering, seluruh tabung dicat dengan Kristal violet (0,1%) sebanyak 5 mL atau hingga larutan kristal violet mengisi lebih tinggi dari batas larutan yang telah dibentuk pada masing-masing tabung. Diamkan selama 15 menit, buang larutan kristal violet dan cuci dengan air, kemudian dikeringkan
8. Pembentukan biofilm dapat diamati berupa bentukan cincin ungu kebiruan pada dinding tabung

h. Pengukuran *Mean Gray Value*

Biofilm yang telah terbentuk pada tabung difoto dengan menggunakan kamera. Untuk menilai kuantitas dari intensitas warna cincin yang terbentuk pada masing-masing tabung digunakan program *Adobe Photoshop CS3*. Langkah-langkahnya dengan membuka *Photoshop CS3*, pilih *File, open* dan masukkan hasil foto yang akan dinilai. Kemudian klik *Window* dan pilih *Measurement Log*, kemudian dengan *Rectangular Marquee Tool*, blok area yang akan dilihat intensitas warnanya lalu klik *Record Measurements*. Catat hasil yang terdapat pada *Mean Gray Value* maka itulah hasil kuantitatif dari intensitas warna tabung. Langkah-langkah ini dilakukan untuk setiap tabung.

#### **4.8.2 Pembuatan ekstrak daun *Camellia sinensis var. assamica***

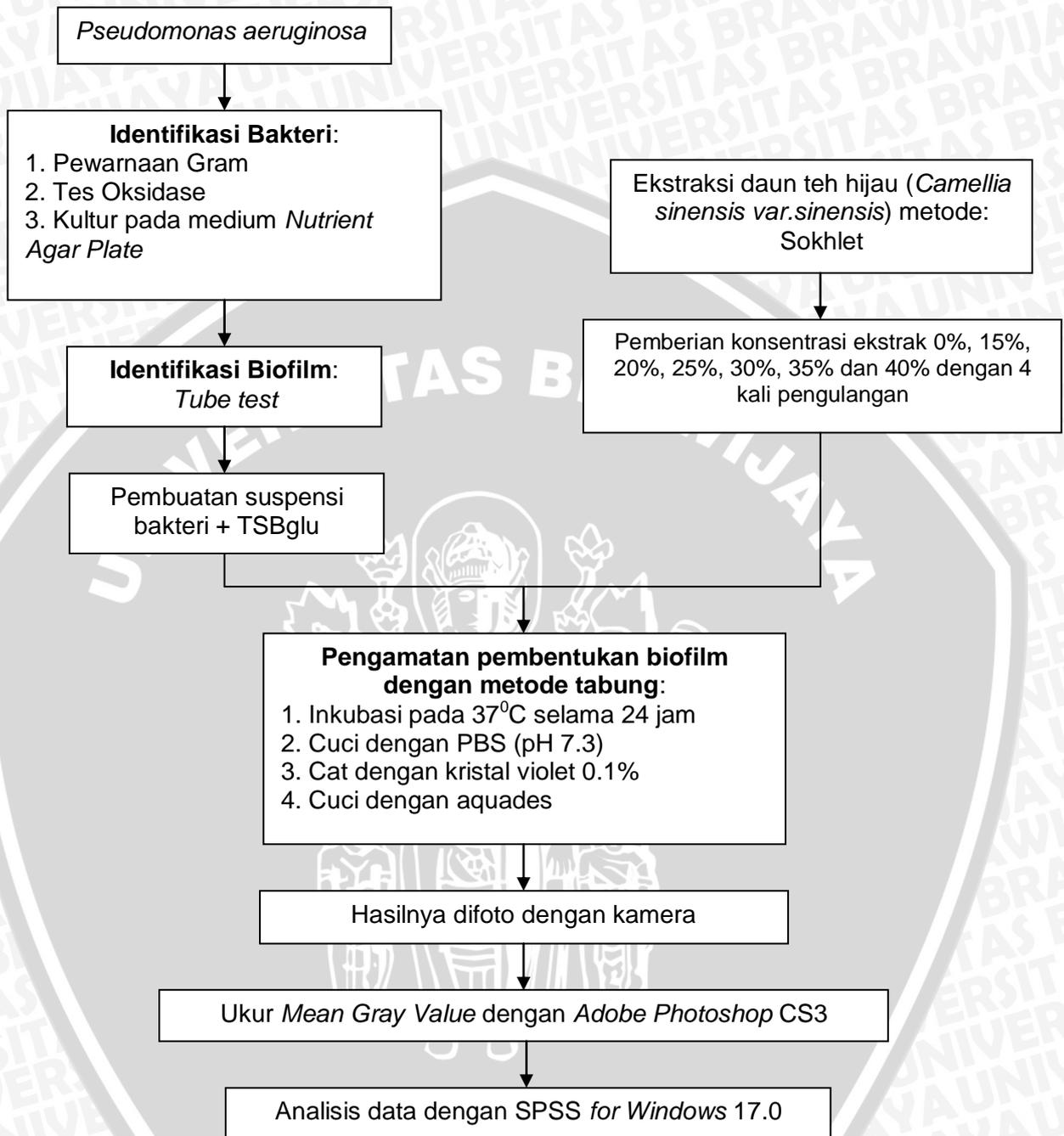
##### **4.8.2.1 Ekstraksi Teh Hijau Dengan Metode Sokhlet**

1. Timbang contoh kedalam timbel kertas saeing sampai ketinggian kurang lebih 2/3 bagian timbel ( $\pm 20 - 40$  Gr) yang ditempatkan dalam gelas kimia 250 ml.
2. Masukkan timbel yang berisi contoh kedalam ekstraktor atau Soklet dan rangkai peralatan seperti gambar (rangkaiannya alat sebaiknya ditempatkan didalam penangas air untuk menghindari bahaya kebakaran untuk pelarut yang mudah terbakar)
3. Gunakan pelarut Ethanol atau Methanol dan lakukan proses ekstraksi selama 3 – 5 jam (tergantung jenis contoh) hingga bahan yang terlarut benar-benar telah terpisah dari bahan.
4. Pisahkan pelarut dari residu dengan cara melepas timble dan lakukan proses destilasi dengan cara yang sama dengan ekstraksi pada point 2 sehingga residu yang diperoleh menjadi lebih pekat.

5. Pindahkan residu kedalam botol timbang (dapat menggunakan cawan petri) yang telah diketahui bobotnya.
6. Hilangkan sisa pelarut dalam oven pada suhu 70 – 80 °C hingga diperoleh bobot konstan.
7. Hitung kandungan lemak (bahan terlarut) yang diperoleh.



### 4.8.3 Alur Kerja Penelitian



#### 4.9 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan variabel numerik dengan satu faktor yang ingin diketahui yaitu perbedaan pengaruh antara berbagai konsentrasi ekstrak teh hijau terhadap intensitas warna yang ditimbulkan oleh biofilm pada tabung (*Mean Gray Value*) dan untuk mengetahui hubungan antara masing-masing konsentrasi ekstrak teh hijau terhadap intensitas warna biofilm pada tabung. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) untuk windows versi 17.0. Data dianggap signifikan jika  $p < 0.05$ .

Langkah-langkah pengujian sebagai berikut:

1. Uji normalitas data dengan menggunakan *Kolmogorov Smirnov test* untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (nonparametrik).
2. Uji komparasi dilakukan dengan cara one way ANOVA > 2 kelompok, dengan syarat:
  - a. Sebaran data harus normal
  - b. Varian data harus sama (homogen)Namun, jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka digunakan metode *Kruskal Wallis*.
3. Uji Post Hoc *Multiple Comparison* untuk mengetahui signifikansi masing-masing kelompok data satu dengan lainnya. Perbedaan dianggap signifikan jika nilai  $p < 0,05$  pada masing-masing kelompok data.
4. Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variabel dependen dan variabel independen. Jika, data parametrik maka digunakan Uji Korelasi Pearson, sedangkan data non parametrik akan diuji dengan Uji Korelasi Spearman. Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan tebal biofilm

bakteri dengan perubahan kadar ekstrak yang diberikan dan bentuk hubungannya (lurus atau terbalik).

5. Uji regresi dilakukan untuk mengetahui keeratan hubungan antara variabel dependen dan variabel independen.

