

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 kelopak rosella sebagai antimikroba, dalam hal ini mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM), terhadap bakteri *MRSA*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2015 pada rentang waktu bulan mei 2015 hingga oktober 2015.

4.3 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *MRSA*, yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Jumlah sampel didapat dengan menggunakan rumus perhitungan:

$$p(n-1) \geq 15 \text{ (Notobroto, 2005)}$$

dengan:

p = jumlah konsentrasi yang digunakan

n = jumlah sampel yang dibutuhkan

Penelitian ini menggunakan 6 konsentrasi yang berbeda, jadi jumlah sampel yang dibutuhkan sesuai dengan perhitungan berikut:

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3.5 = 4$$

Dengan demikian, untuk memenuhi persyaratan uji statistik diperlukan 4 sampel *MRSA*.

4.4 Variabel

4.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kelopak rosella.

Variabel ditentukan melalui penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah koloni *MRSA* dalam media padat.

4.5 Definisi Operasional

1. Kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa L*) yang digunakan adalah kelopak rosella yang berwarna merah gelap yang didapatkan dari Materia Medika, Batu.
2. Ekstrak kelopak rosella didapatkan dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi terhadap kelopak rosella kering, kemudian dilakukan penyaringan dan penguapan dengan menggunakan *rotary-evaporator*.
3. Isolat *MRSA* adalah galur *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik methicillin yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sebelumnya, *MRSA* yang berasal dari spesimen diuji dengan pewarnaan Gram, uji katalase dan koagulase, serta tes kepekaan dengan difusi cakram cefoxitin.

Hasilnya harus uji katalase positif dan uji koagulase positif, didapatkan Gram positif dan membentuk koloni berwarna kuning keemasan pada medium *Blood Agar Plate*.

4. KHM adalah konsentrasi terendah ekstrak kelopak rosella yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *MRSA* yang pada metode dilusi agar ditandai dengan pertumbuhan koloni bakteri.

4.6 Bahan dan Alat

4.6.1 Pembuatan Ekstrak

1. *Evaporator*
2. Timbangan ukur
3. Pendingin spiral / *rotatory evaporator*
4. Labu erlenmeyer
5. Selang *water pump*
6. Corong gelas
7. *Water pump*
8. Kertas saring
9. *Waterbath*
10. Labu evaporator
11. *Vacum pump*
12. Labu penampung
13. Kelopak rosella
14. Air suling
15. Etanol 96%

4.6.2 Identifikasi Bakteri

1. Spesimen bakteri *MRSA*
2. Inkubator
3. Nutrien Broth (NB)
4. Blood Agar (BA)
5. Nutrient Agar (NA)

6. Bahan pewarna gram: kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin, minyak emersi, ose, mikroskop binokuler.
7. NaCl 0,9%, H₂O₂ 3%, reagen latex, cawan petri, cakram Methicillin, pembakar bunsen, spiritus, pipet steril

4.6.3 Dilusi Agar

Alat :

- | | |
|------------------|----------------------------|
| 1. Tabung reaksi | 6. Korek api |
| 2. Mikropipet | 7. Ose |
| 3. Inkubator | 8. Penggaris |
| 4. Vortex | 9. Plate kosong dan steril |
| 5. Bunsen | 10. Kapas. |

Bahan:

1. Ekstrak kelopak rosella
2. Isolat bakteri *MRSA*
3. Alkohol 95%
4. Air suling
5. Media dilusi agar.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Kelopak Rosella

4.7.1.1 Persiapan sampel Kelopak Rosella

Kelopak Rosella dipotong kecil-kecil dan dikeringkan kemudian dihaluskan dengan blender dan timbang sebanyak 500 gram (sampel kering).

4.7.1.2 Proses Ekstraksi

1. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi.
2. Kelopak rosella yang sudah dalam bentuk serbuk ditimbang (500 gram).
3. Sampel kering tersebut dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer 1 liter
4. Kemudian direndam dengan etanol 96% hingga volumenya 600 ml.
5. Dikocok hingga benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
6. Didiamkan selama 1 malam sampai mengendap.
7. Setelah maserasi, dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring whatman.
8. Proses maserasi ini dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih. Kemudian hasil maserasi siap untuk dievaporasi.

4.7.1.3 Proses Evaporasi

1. Evaporator 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.
2. 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.

3. Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum
4. 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%.

4.7.2 Preparasi Bakteri

4.7.2.1 Tes identifikasi bakteri *MRSA*

4.7.2.1.1 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. (Gyure,2010).

4.7.2.1.2 Tes Katalase

1. Gelas objek yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu, dengan menggunakan kapas dan dilewatkan diatas api
2. Suspensi bakteri yang akan diuji diletakkan diatas gelas objek
3. Larutan H₂O₂ 3% diteteskan ke suspense bakteri kemudian dicampurkan kemudian ditunggu selama 5-10 detik.
4. Hasil tes katalase positif apabila dihasilkan gelembung oksigen pada sediaan
5. Hasil tes katalase negative apabila tidak didapatkan gelembung
6. Tes katalase digunakan untuk membedakan bakteri kokus gram positif : tes katalase positif menunjukkan bakteri *Staphylococcus*, sedangkan tes katalase negatif menunjukkan bakteri *Streptococcus* atau *Enterococcus* (Reiner, 2010).

4.7.2.1.3 Tes Koagulase

Tes koagulase bertujuan untuk membedakan *S. aureus* dengan jenis *Staphylococcus* lainnya dan untuk menentukan patogenitasnya. *S.aureus* bersifat koagulase positif. Pada objek glass ditetesi dengan 1 tetes larutan saline atau aquadest steril dan ditambahkan 1 koloni bakteri kemudian ditambah dengan 1 tetes plasma darah dan dicampur dengan cara menggoyang objek glass arah melingkar selama 5-10 detik. Apabila hasilnya positif akan tampak gumpalan-gumpalan putih.

4.7.2.1.4 Tes Kepekaan Bakteri terhadap Cefoxitin

Untuk mengidentifikasi lebih lanjut apakah bakteri tersebut sensitif atau resisten terhadap *Methicillin*, dilakukan tes difusi cakram menggunakan *cefoxitin*. Bakteri dikatakan resisten terhadap *Methicillin* jika diameter zona inhibisi pada cakram *cefoxitin* $30 \mu\text{g} \leq 21 \text{ mm}$ dan $\leq 16 \text{ mm}$ pada cakram *cefoxitin* $10 \mu\text{g}$.

4.7.2.2 Pembuatan suspensi uji bakteri

1. Beberapa koloni *Staphylococcus 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 10610nm.
3. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^6 CFU/ml yang setara dengan OD = 0,1, lakukan pengenceran suspensi bakteri dengan konsentrasi 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 NaCl aduk rata sampai larutan homogen, sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/ml (Dzen dkk, 2003).

4.7.3 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Kelopak Rosella

Cara menentukan konsentrasi ekstrak kelopak rosella dalam media agar adalah sebagai berikut :

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

X = konsentrasi kelopak rosella yang digunakan dalam media agar

V = volume

Volume total dari agar plate diasumsikan sebesar 10 ml. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam percobaan ini adalah 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, dan 1,5%. Konsentrasi tersebut didapat setelah sebelumnya dilakukan penelitian eksplorasi yang dilakukan sebanyak dua kali. Pada penelitian eksplorasi pertama kali menggunakan konsentrasi 2% 4% 6% 8% dan 10% tidak menunjukkan hasil yang diharapkan. Kedua, menggunakan konsentrasi 0,5% 1% 1,5% 2% dan 2,5%.

1. Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak kelopak rosella 0,25% dibutuhkan 0,025 ml ekstrak kelopak rosella dan 9,975 ml agar.
2. Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak kelopak rosella 0,5% dibutuhkan 0,05 ml ekstrak kelopak rosella dan 9,95 ml agar.
3. Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak kelopak rosella 0,75% dibutuhkan 0,075 ml ekstrak kelopak rosella dan 9,925 ml agar.
4. Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak kelopak rosella 1% dibutuhkan 0,1 ml ekstrak kelopak rosella dan 9,9 ml agar.
5. Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak kelopak rosella 1,5% dibutuhkan 0,15 ml ekstrak kelopak rosella dan 9,85 ml agar.

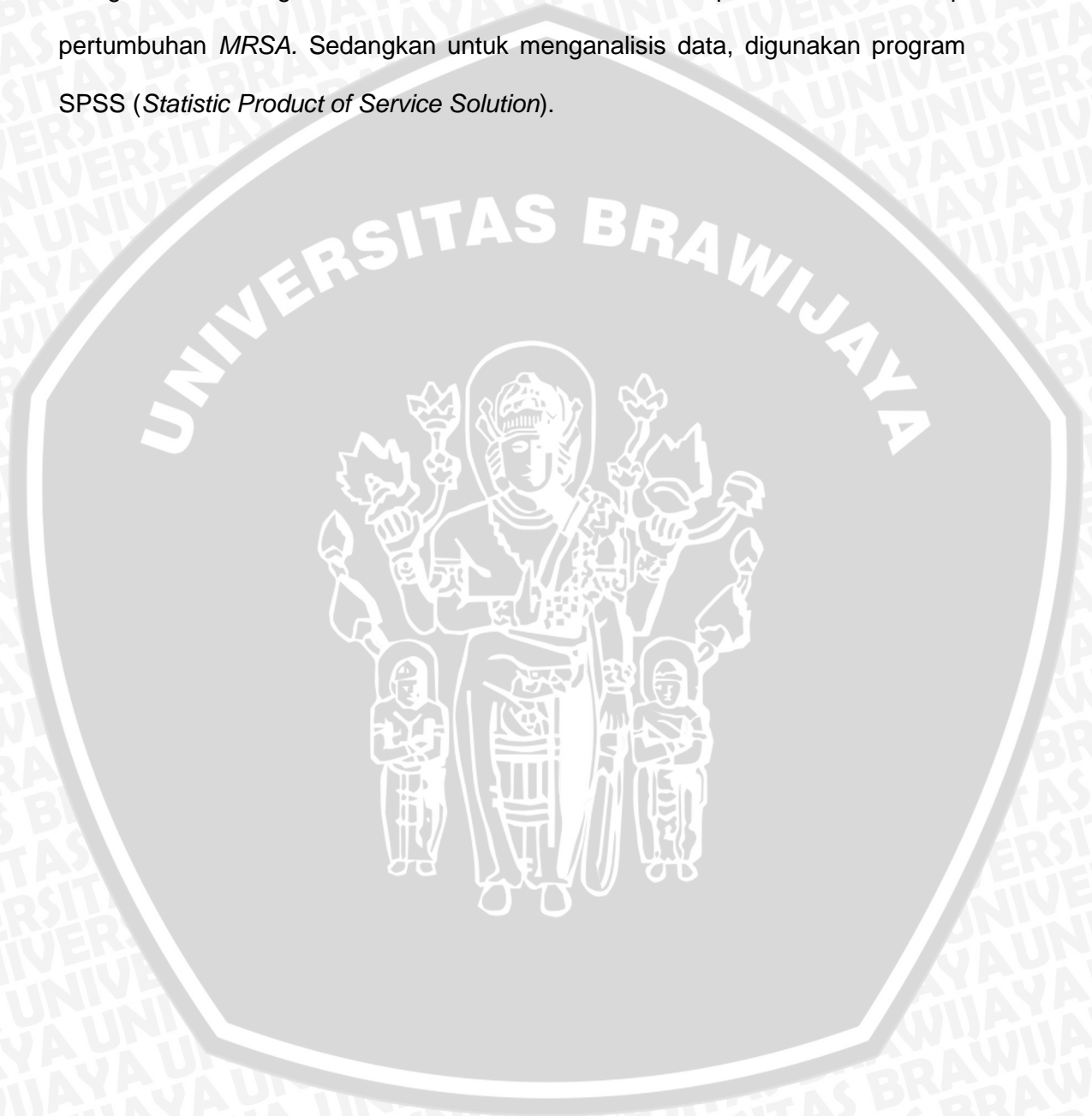
4.7.4 Pengujian Efek Antimikroba

1. Sediakan 6 plate steril berdiameter 9 cm.
2. Tandai plate untuk pengujian efek anti bakteri pada plate 1 sampai 6: 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 1,5% dan 0%
3. Volume yang dipakai dalam setiap plate untuk mencampur agar adalah 10 ml, sehingga volume ekstrak yang dimasukkan ke dalam ke masing-masing plate adalah sebagai berikut:
 - A. *Plate 1* : 0,025 ml ekstrak kelopak rosella dan 9,975 ml agar
 - B. *Plate 2* : 0,05 ml ekstrak kelopak rosella dan 9,95 ml agar
 - C. *Plate 3* : 0,075 ml ekstrak kelopak rosella dan 9,925 ml agar
 - D. *Plate 4* : 0,1 ml ekstrak kelopak rosella dan 9,9 ml agar
 - E. *Plate 5* : 0,15 ml ekstrak kelopak rosella dan 9,85 ml agar
 - F. *Plate 6* : 10 ml agar
4. Bakteri uji yang dipakai adalah bakteri yang diencerkan sampai 10^6 CFU/ml.
5. 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.
6. Setelah koloni tumbuh, dibaca hasilnya. Konsentrasi ekstrak pada dilusi agar *plate* yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni disebut sebagai KHM larutan ekstrak.

4.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah Uji One Way ANOVA dan Uji Korelasi regresi. Uji One Way ANOVA digunakan untuk mengetahui adanya

pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak kelopak rosella terhadap jumlah koloni *MRSA*. Sedangkan Uji Korelasi Regresi digunakan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak kelopak rosella terhadap pertumbuhan *MRSA*. Sedangkan untuk menganalisis data, digunakan program SPSS (*Statistic Product of Service Solution*).



4.9 Rancangan Operasional

