

**BAB 4****METODE PENELITIAN****4.1 Desain Penelitian**

Desain penelitian yang digunakan adalah *true experimental post test only control group design* dengan pengulangan yang sesuai dengan rumus pengulangan. Metode penelitian ini yaitu dengan metode difusi sumuran untuk mengetahui kemampuan antibakteri ekstrak biji alpukat (*Persea americana Mill*) terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan cara mengukur zona hambat yang terbentuk.

**4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Oktober – November 2015.

**4.3 Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang didapatkan dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Yogyakarta dan telah dilakukan identifikasi dengan menggunakan *microbact* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

### 4.3.1 Pengulangan Sampel

Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Dalam penelitian ini berdasarkan perhitungan rumus Federer (1977) dalam Dewi dkk. (2013) didapatkan pengulangan:

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

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

(dibulatkan ke atas menjadi 4)

Jadi, jumlah pengulangan yang harus dilakukan untuk mendapatkan jumlah sampel yang dapat dipercaya adalah sebanyak empat kali pengulangan.

### 4.3.2 Variabel Penelitian

#### 4.3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah konsentrasi ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill) 0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

#### 4.3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

#### 4.4 Alat dan Bahan

##### 4.4.1 Penyediaan Biji Alpukat

Bahan yang digunakan adalah biji alpukat yang diperoleh dari Balai Materia Medika di kota Batu Jawa Timur. Pemilihannya didasarkan pada buah alpukat yang masih segar.

##### 4.4.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Biji Alpukat

Alat yang digunakan adalah labu *Erlenmeyer*, timbangan, maserator berpengaduk elektronik, oven, corong, kertas saring, corong pemisah, *grinder*, *aluminum foil* dan *rotary evaporator*. Sedangkan bahan yang digunakan adalah biji alpukat dan etanol 96%.

##### 4.4.3 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

###### 4.4.3.1 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram

- Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- Anaerobic jar*
- Bahan pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%. safranin)

- d. *Nutrient Broth*
- e. Ose
- f. Kertas penghisap
- g. Kapas
- h. Minyak emersi
- i. Mikroskop
- j. Gelas obyek
- k. Tabung reaksi
- l. Lampu spirtus

#### 4.4.3.2 Alat dan Bahan untuk Tes Katalase

- a. Gelas obyek
- b. Pipet
- c. Isolat Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- d. *Anaerobic jar*
- e. Larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%

#### 4.4.3.3 Alat dan Bahan untuk Oksidase

- a. Isolat Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- b. Kertas saring
- c. Reagen oksidase yaitu tetrametil p-fenilendiamin dihidroklorida 1%

#### 4.4.3.4 Alat dan Bahan untuk Kultur Agar *MacConkey*

- a. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

- b. *Anaerobic jar*
- c. Medium *MacConkey* agar
- d. Inkubator

#### 4.4.3.5 Alat dan Bahan untuk Uji Hemolisis

- a. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- b. *Blood Agar Plate* (BAP)
- c. Inkubator

#### 4.4.3.6 Alat dan Bahan Uji Biokimia

- a. Isolat Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- b. *Microbact kit 24 E*
- c. Akuades
- d. Minyak MB1093A
- e. Inkubator

#### 4.4.4 Alat dan Bahan untuk Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana Mill*) terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

- a. Tabung reaksi
- b. Pinset
- c. Cawan petri
- d. Medium BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*)
- e. Inkubator
- f. Mikropipet
- g. Ose
- h. Perforator (pencetak lubang)

- i. Jangka sorong
- j. Kultur bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- k. Akuades steril
- l. Anaerobic jar

#### 4.5 Definisi Operasional

1. Biji alpukat yang digunakan adalah dari buah alpukat yang matang dan segar diperoleh dari Balai Materia Medika di kota Batu Jawa Timur.
2. Ekstrak etanol biji alpukat di proses dengan metode maserasi dengan bahan pelarut etanol 96%.
3. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang digunakan diperoleh dari BBLK Yogyakarta dan telah diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran.
4. Kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah kelompok yang diberi ekstrak etanol biji alpukat 0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% berdasarkan penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh peneliti.
5. Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelompok yang diberi akuades steril.
6. Zona Inhibisi adalah diameter daerah bening pada biakan medium bakteri setelah diinkubasi yang diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong (mm). Semakin lebar zona inhibisi, semakin baik efektivitas agen antimikroba.

## 4.6 Prosedur Penelitian

### 4.6.1 Ekstraksi Biji Alpukat

- a. Biji alpukat yang akan digunakan dipilih terlebih dahulu dilanjutkan pencucian di bawah air mengalir.
- b. Biji alpukat yang telah bersih dikeringkan pada suhu 40-60°C.
- c. Setelah kering biji alpukat diblender sehingga didapatkan serbuk halus biji alpukat, kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik dan diambil 200 gram.
- d. Biji alpukat kering kemudian dimasukkan dalam tabung erlenmeyer.
- e. Kemudian ditambahkan  $\pm 900$  ml etanol.
- f. Tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu kocok perlahan-lahan. Pengocokan dilakukan 1-2 kali sehari.
- g. Tabung erlenmeyer disimpan pada suhu kamar selama 24 jam.
- h. Setelah 24 jam, campur disaring dengan kertas filter hingga diperoleh cairan berwarna hijau kecoklatan yang bebas dari partikel kasar sehingga diperoleh larutan ekstrak biji alpukat dengan konsentrasi 100%.

### Proses Evaporasi

- a. *Evaporator* dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja percobaan.
- b. Hasil rendaman etanol dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi.
- c. Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah *evaporator*, pendingin spiral dihubungkan pada bagian atas *evaporator*, lalu

penampung etanol dihubungkan pada bagian atas *evaporator*, pendingin spiral dihubungkan dengan vakum dengan selang plastik; pendingin spiral dihubungkan dengan *waterpump* dengan selang plastik.

- d. *Waterpump* ditempatkan dalam bak yang berisi akuades, *waterpump* dihubungkan dengan sumber listrik sehingga akuades akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan merata).
- e. Satu set alat evaporasi diletakkan sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *waterbath*.
- f. Vakum dan *waterbath* dihubungkan dengan sumber listrik dan suhu pada *waterbath* diatur sekitar 80°C (sesuai dengan titik didih etanol).
- g. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama  $\pm 2-3$  jam.
- h. Dilanjutkan dengan pemanasan dalam *oven* dengan suhu 50-60°C selama 5 jam.
- i. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak biji alpukat dengan konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol.

## 4.6.2 Uji Identifikasi Bakteri

### 4.6.2.1 Pewarnaan Gram

- a. Dibuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan di udara.
- b. Sediaan yang telah kering difiksasi di atas api Bunsen.



- c. Sediaan diberi larutan kristal violet selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir.
- d. Sediaan diberi larutan lugol selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir.
- e. Sediaan diberi larutan alkohol 96% selama 5-10 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir.
- f. Sediaan diberi safranin, diamkan selama 30 detik, lalu bilas dengan air.
- g. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.
- h. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan bakteri Gram negative berbentuk kokobasil yang akan menunjukkan warna merah.

#### 4.6.2.2 Tes Katalase

Tes katalase ini bertujuan untuk mendeteksi adanya enzim katalase yang diproduksi oleh bakteri. Uji ini dilakukan dengan cara menambahkan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pada perbenihan cair.

- a. Sediakan perbenihan bakteri pada gelas obyek
- b. Kemudian sediaan ditetesi larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%
- c. Mengamati timbulnya gelembung-gelembung udara pada gelas obyek
- d. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil tes katalase positif melalui timbulnya gelembung-gelembung udara.

#### 4.6.2.3 Uji Oksidase

Uji oksidase bertujuan untuk mengetahui adanya enzim *cytochrome oxidase*. Bakteri yang mengandung enzim tersebut dapat mengoksidase reagen sehingga terjadi perubahan warna pada kertas reagen.

- a. Uji oksidase dilakukan dengan mengambil koloni bakteri dari media padat, kemudian digoreskan pada kertas saring yang telah ditetesi dengan reagen oksidase yaitu tetrametil p-fenilendiamin dihidroklorida 1% (Kovac) dan diamati hasilnya.
- b. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil positif yaitu berubahnya warna ungu, ungu tua sampai kehitam-hitaman (Syahrurachman, 2009).

#### 4.6.2.4 Kultur Agar MacConkey

Kultur ini bertujuan untuk membedakan bakteri gram negatif yang memfermentasi laktosa dan yang tidak. Dilakukan inokulasi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan metode *streaking* pada medium *MacConkey* agar.

- a. Inkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya.
- b. Bila tampak perubahan warna menjadi merah pada koloni bakteri, artinya bakteri uji memfermentasi laktosa. Koloni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil tidak memfermentasi laktosa.

#### 4.6.2.5 Uji Hemolisis

Uji hemolisis dilakukan dengan cara *streaking* bakteri pada media *Blood Agar Plate* (BAP) kemudian inkubasi pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, dilakukan pengamatan pada BAP. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil non hemolisis atau  $\gamma$ -hemolisis yaitu tidak tampak perubahan pada BAP (Kumala, 2006).

#### 4.6.2.6 Uji Biokimia dengan *Microbact Kit*

- a. Siapkan biakan murni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang telah diinkubasi selama 18-24 jam.
- b. Lakukan tes oksidase untuk mengetahui *microbact kit* mana yang akan digunakan.
- c. Ambil isolat bakteri dan encerkan dalam larutan saline.
- d. Letakkan *microplate* pada tray dan lepas lapisan pembungkusnya.
- e. Tambahkan 4 tetes suspensi bakteri pada setiap lubang.
- f. Tambahkan 2 tetes minyak (MB1093A) pada lubang yang berlingkar hitam.
- g. Tempatkan kembali lapisan pembungkus dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- h. Setelah 24 jam, tambahkan reagen pada beberapa lubang (indol, TDA).
- i. Catat hasilnya dan interpretasikan menggunakan *microbact identification system*.

#### 4.6.3 Persiapan Suspensi Uji *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

1. Dipersiapkan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dari media BHIB yang telah diuji konfirmasi.
2. Ambil 5 koloni ( $d \geq 1\text{mm}$ ) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur kekeruhannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm dan *Optical Density* (OD) 0,1 (Murray *et al.*, 1999).
3. 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  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

#### 4.6.4 Uji Efektivitas Antibakteri ekstrak biji alpukat (*Persea americana Mill*) terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

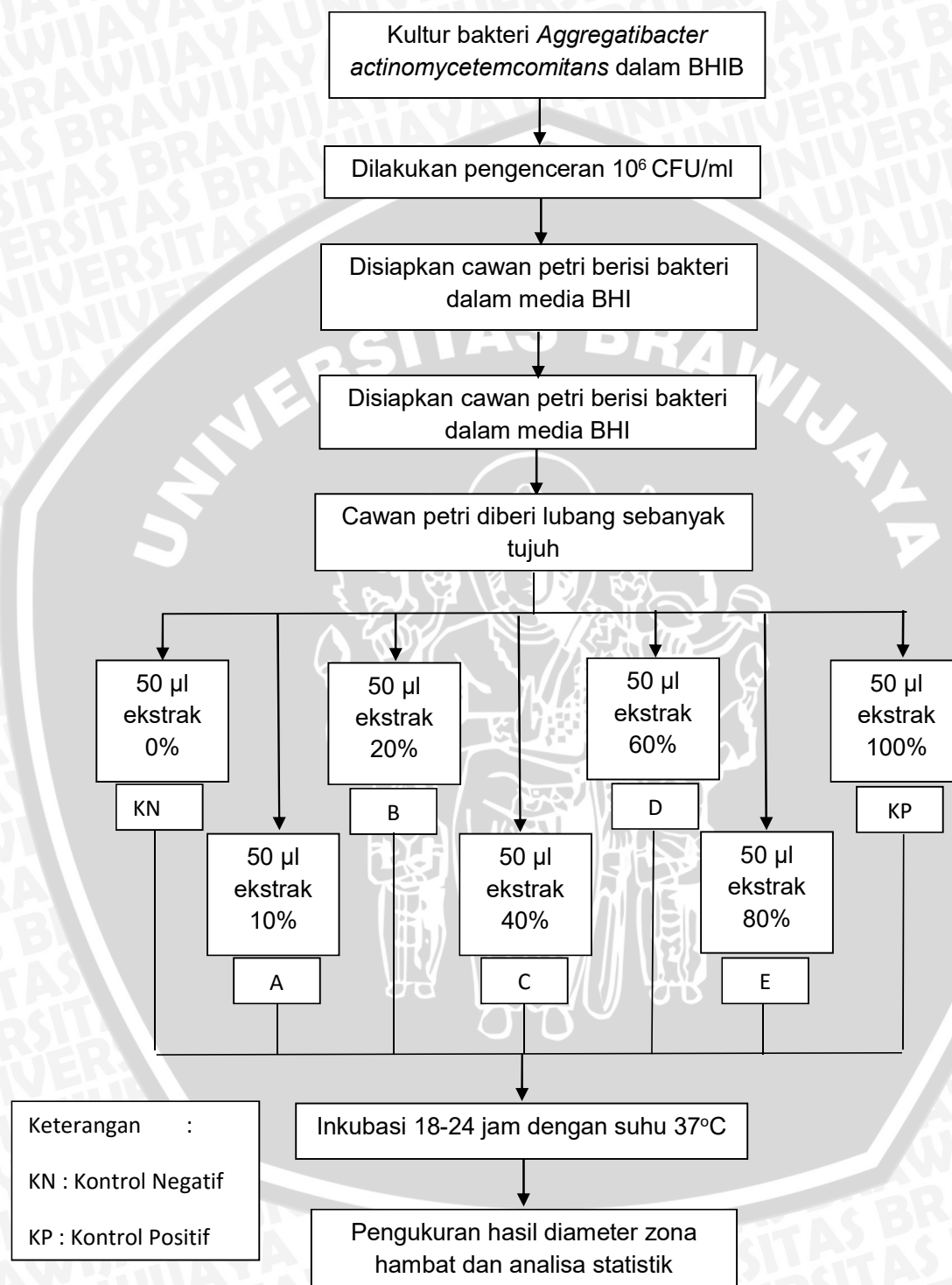
- a. Dipersiapkan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dari BHI broth yang telah diuji konfirmasi
  - a. Disiapkan 4 cawan petri yang berisi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dalam media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*).
  - b. Pada setiap cawan petri dibagi 6 lubang sumuran dengan diameter 6 mm menggunakan perforator.

- c. Masing-masing lubang sumuran diisi dengan ekstrak etanol biji alpukat sebanyak 50  $\mu$ l dengan konsentrasi 3,125% pada lubang pertama, 6,25% pada lubang kedua, 12,5% pada lubang ketiga, 25% pada lubang keempat, 50% pada lubang kelima, 100% pada lubang keenam dan akuades steril sebagai kontrol negatif pada lubang ketujuh.
- d. Setelah semua lubang terisi larutan, cawan petri di dalam *anaerobic jar* diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dengan suasana anaerob.
- e. Setelah 18-24 jam inkubasi, zona hambat yang terbentuk dapat diukur menggunakan jangka sorong. Zona hambat tersebut menjadi parameter daya antimikroba masing-masing bahan.

#### 4.6.5 Pengamatan dan Pengukuran

Bahan yang diletakkan pada lubang sumuran tersebut akan memberikan suatu zona bebas bakteri (zona inhibisi) yang mengelilingi lubang sumuran. Diameter zona tersebut tergantung pada kekuatan sampel (ekstrak maupun kontrol) dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin luas zona yang dihasilkan maka akan semakin kuat pula daya hambat sampel terhadap pertumbuhan bakteri. Zona hambat yang dihasilkan berbentuk lingkaran dan diameternya dapat diukur menggunakan jangka sorong. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan sebanyak empat kali (arah vertikal, horizontal, dan dua arah diagonal) dan dihitung rata-ratanya. Diameter diukur dari batas terluar zona hambat dari satu sisi ke sisi lainnya.

4.7 Skema Prosedur Penelitian



#### 4.8 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas varian menggunakan uji *Kolmogorov-Smimov* dan uji *Levene*. Apabila data normal dan homogen, maka analisis data yang digunakan adalah uji statistik parametrik yaitu uji *one way ANOVA*, uji *Post Hoc Tukey*, dan uji korelasi-regresi. Uji statistik *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak biji alpukat (*Persea americana Mill*) terhadap jumlah koloni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Uji *Post Hoc Tukey* digunakan untuk membandingkan dua sampel kelompok perlakuan yang memberikan perbedaan signifikan dan tidak memberikan perbedaan signifikan. Uji korelasi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak biji alpukat (*Persea americana Mill*) terhadap zona hambat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, uji korelasi yang dilakukan adalah uji korelasi *pearson* Uji regresi berfungsi untuk mengetahui seberapa besar hubungan tersebut.

Apabila data yang tidak normal atau tidak homogen, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *Kruskal Wallis*, uji *Mann Whitney* dan uji statistik korelasi (*Spearman*). Analisa data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 16.0 untuk Windows.