

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan rancangan *true experimental* untuk mengetahui pengaruh ekstrak teh hitam (*Camellia sinensis* var. *Assamica*) terhadap pembentukan biofilm pada bakteri Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Desain penelitian ini adalah *post-test only control group design* dengan menggunakan metode *tube-test*.

4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm. Sampel ini diperoleh dari isolat Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* swab tenggorok pembentuk biofilm yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah pengulangan penelitian dihitung dengan rumus sebagai berikut (Notobroto, 2005):

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,1$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak teh hitam): 0% (kontrol), 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1%, 1,25%, 1,50%. perlakuan dipilih berdasarkan hasil uji eksplorasi yang dilakukan sebelumnya.

Berdasarkan hasil penghitungan menggunakan rumus tersebut, minimal harus dilakukan 4 kali pengulangan pada penelitian ini.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak teh hitam. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 0% (kontrol), 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1%, 1,25%, 1,50%.

4.3.1 Variabel Tergantung

Variable tergantung pada penelitian ini adalah pembentukan biofilm oleh *Staphylococcus aureus* yang diukur dengan metode *tube-test*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Maret 2015 sampai dengan bulan April 2015 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembuatan ekstrak teh hitam dilakukan di Politeknik Negeri Malang.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Teh Hitam

1. Teh hitam (*Camelia sinensis var. Assamica*)
2. Kertas saring
3. Timbangan analitik
4. Sokhlet
5. Gelas kimia 250 ml
6. Cawan petri
7. Spatula
8. Desikator

9. Penjepit cawan petri
10. Timble
11. Pelarut etanol 96%
12. Pemanas aquades
13. Oven

4.5.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Isolat *Staphylococcus aureus*
2. NAP (*Nutrient Agar Plate*)
3. Mannitol Salt Agar
4. Mueller Hinton Agar
5. Cakram antibiotik Sefoksitin

4.5.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. Tryticase Soy Broth dengan 1% glukosa (TSBglu)
2. Biakan *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm
3. Tabung reaksi
4. Kristal Violet
5. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,3
6. Deionized water
7. Ose
8. Pipet
9. Beaker Glass
10. Inkubator

4.6 Definisi Operasional

1. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* adalah bakteri kokus Gram positif dengan hasil tes katalase positif, dan tes koagulase positif, dan membentuk koloni berwarna kuning emas pada medium *Nutrient Agar Plate* (Dezfulian et al., 2010). Penelitian kali ini menggunakan *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm yang diidentifikasi menggunakan metode *tube-test*. Bakteri *Staphylococcus aureus* didapatkan dari swab tenggorok di Laboratorium Mikrobiologi FKUB.

2. Biofilm merupakan matriks polimer yang menyelimuti sel bakteri dan menempel pada permukaan yang inert atau hidup. Biofilm pada penelitian ini dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus* yang dapat dilihat pada dinding medium tabung.

3. Ekstrak teh hitam adalah hasil ekstraksi cair teh hitam dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Teh hitam berasal dari Teh hitam kemasan "Bless Tea" karena teh kemasan ini mengonfirmasi varietas dan jenisnya teh hitam, yang dibeli di distributor Surabaya.

4. Metode tabung merupakan metode standart kualitatif uji biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan media tabung.

5. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi paling kecil dari ekstrak teh hitam yang dapat menghambat pertumbuhan biofilm *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan menipisnya cincin biru pada dinding tabung

6. *Mean Gray Value* adalah rata-rata intensitas warna pada program Adobe Photoshop CS3 yang memiliki *range* 0-255. Semakin kecil angka menunjukkan semakin pekat warna yang dinilai.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Teh Hitam

4.7.1.1 Ekstraksi Metode Soxhlet

- Teh hitam kemasan “Bless Tea” yang siap pakai ditimbang sebanyak 100 gram dengan timbangan analitik kemudian ditempatkan pada gelas kimia 250 ml.
- Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%.
- Timble yang sudah berisi bahan teh hitam dimasukkan ke dalam ekstraktor soxhlet.
- Soxhlet disambungkan dengan labu yang berisi batu didih dan ditempatkan pada pemanas air dan kondensor
- Alat pendingin juga disambungkan dengan Soxhlet, air pendingin dijalankan, pemanas mulai dinyalakan.
- Proses ekstraksi dilakukan selama 5 jam sampai senyawa terlarut benar-benar terpisah dari pelarutnya.
- Pelarut dipisahkan dari ekstrak dengan cara melepas timble dan dilanjutkan dengan proses destilasi dengan cara yang sama dengan ekstraksi Soxhlet sehingga ekstrak yang diperoleh menjadi lebih pekat.
- Ekstrak yang diperoleh dipindahkan ke dalam botol timbang (dapat menggunakan cawan petri atau *beaker glass*).
- Pelarut yang mungkin masih tersisa dihilangkan dengan cara memasukkan ke dalam oven pada suhu 70-80°C hingga diperoleh bobot yang konstan.
- Kadar ekstrak yang diperoleh kemudian dihitung.

4.7.2 Persiapan Biofilm *Staphylococcus aureus*

4.7.2.1 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

A. Pemeriksaan Mikroskopis

- Gelas objek yang akan digunakan dibersihkan dulu menggunakan kapas kemudian disterilkan dengan cara dilewatkan beberapa kali diatas api lalu didinginkan.
- Satu tetes aquades steril ditetaskan di atas gelas objek kemudian disuspensikan dengan biakan kuman yang diambil menggunakan ose. Apabila biakan berupa biakan cair, tidak perlu disuspensikan terlebih dahulu dengan aquades.
- Sediaan dibiarkan mengering kemudian difiksasi dengan cara dilewatkan kembali diatas api.
- Kristal violet dituangkan ke atas gelas objek kemudian ditunggu selama 1 menit, lalu dibilas dengan air bersih
- Lugol ditetaskan ke atas gelas objek kemudian ditunggu selama 1 menit, lalu dibilas dengan air bersih
- Alkohol 96% dituangkan ke atas gelas objek, ditunggu selama 5-10 detik atau sampai cat luntur, kemudian dibilas dengan air
- Safranin ditetaskan ke atas gelas objek kemudian ditunggu selama 30 detik, kemudian dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. (Gyure, 2010)

B. Tes Katalase

- Gelas objek yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu, dengan menggunakan kapas dan dilewatkan diatas api
- Suspensi bakteri yang akan diuji diletakkan diatas gelas objek
- Larutan H₂O₂ 3% diteteskan ke suspense bakteri kemudian dicampurkan kemudian ditunggu selama 5-10 detik.
- Hasil tes katalase positif apabila dihasilkan gelembung oksigen pada sediaan
- Hasil tes katalase negative apabila tidak didapatkan gelembung
- 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).

C. Tes Koagulase

- Plasma kelinci atau manusia dicampurkan dengan sitrat kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:5
- Tabung steril disiapkan sebanyak dua buah. Satu tabung diberi perlakuan dan satu tabung sebagai kontrol
- Masing-masing tabung diberi 2 cc plasma yang telah diencerkan
- Tabung perlakuan diberi biakan koloni *Staphylococcus aureus* sedangkan tabung kontrol diberi kaldu steril.
- Kedua tabung diinkubasi pada suhu 37°C dan dibiarkan 1-4 jam

- Hasil tes koagulase positif apabila ditemukan endapan pada dasar tabung.

D. **Pembiakan pada *Mannitol Salt Agar***

Bakteri yang telah dibiakkan pada NAP diambil dan dihapus pada medium *Mannitol Salt Agar* yang sudah disiapkan.

Staphylococcus kebanyakan tidak menfermentasikan manitol sehingga bakteri yang tumbuh tidak menyebabkan perubahan warna pada medium. *Staphylococcus aureus* memfermentasikan manitol sehingga tampak koloni berwarna kuning cerah.

E. **Identifikasi Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus***

Tes ini menggunakan cakram antibiotic sefoksitin 30 mg. Inokulum bakteri disiapkan dengan membuat suspensi kuman dalam cairan NaCl 0,9% steril dan distandarisasi dengan 0,5 McFarland. Suspensi ditanam merata pada permukaan media agar *Mueller Hinton* lalu diinkubasi 35°C. Sensitivitas atau resistensi koloni kuman di sekitar *disc* atau cakram antibiotic sesuai kriteria NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*) dan CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*). Interpretasinya ialah diameter kurang dari atau sama dengan 19 mm disebut resisten dan lebih dari atau sama dengan 20 mm disebut sensitif.

4.7.2.2 **Perbenihan Cair Bakteri *Staphylococcus aureus***

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang sudah ditanam pada medium NAP dikultur pada medium Nutrient Broth (NB) selama 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri yang sudah dikultur kemudian dilakukan pengukuran kepadatan bakteri dengan spektrofotometri menggunakan panjang gelombang (λ) 610 nm dengan

kepadatan bakteri yang diharapkan sebanyak 10^8 bakteri/ml. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$ kemudian kepadatan bakteri dicampur dengan TSBglu (Puspitasari *et al.*, 2010)

$$\text{Rumus : } V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 1,521 = 30 \times 0,1$$

$$V_1 = 1,97$$

Keterangan :

V1 : jumlah suspensi bakteri yang diambil (mL)

N1 : *Optical Density* (OD) bakteri hasil spektrofotometri (bakteri/mL)

V2 : Volume keseluruhan dalam satu tabung (mL)

N2 : OD bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/mL

Suspensi bakteri akan diambil sebanyak 1,97 mL dan ditambahkan 28,3 mL TSBglu menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/mL.

4.7.2.3 Uji Pembentukan Biofilm

Staphylococcus aureus yang sudah diidentifikasi sebelumnya, ditanam pada *Nutrient Broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 38°C . Kultur ini kemudian ditanam pada *Nutrient Agar Plate* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 38°C . *Trypticase Soy Broth* sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril dan diinokulasikan dengan 1 loop ose bakteri yang berasal dari kultur NAP kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 38°C . Tabung yang telah diinkubasi dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan pada suhu ruangan. Tabung tersebut kemudian dicat dengan Kristal violet. Cat yang berlebih dibuang dan dicuci dengan aquades. Tabung dikeringkan dan dilihat pembentukan biofilmnya (Taj *et al.*, 2012)

4.7.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm

- Delapan buah tabung steril disiapkan untuk penelitian kali ini dan diberi label. Masing-masing tabung akan diberi konsentrasi ekstrak yang berbeda, yaitu : 0% (kontrol), 0,25 %, 0,50%, 0,75%, 1%, 1,25%, 1,50%.
- Bakteri yang sudah dikultur sebelumnya disiapkan dengan kepadatan bakteri 1×10^8 bakteri/mL.
- Suspensi bakteri dengan TSBglu disiapkan berdasarkan perhitungan OD hasil spektrofotometri di dalam falcon.
- Tujuh tabung diisi dengan 2mL suspensi bakteri sedangkan tabung kontrol (0%) diisi dengan 4 mL suspense bakteri.
- Selanjutnya tujuh tabung yang berisi 2 mL suspense bakteri diberikan larutan ekstrak teh hitam sesuai konsentrasi yang ditentukan berdasarkan rumus : $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$

Keterangan :

V1 : volume ekstrak teh hitam yang harus diberikan (mL)

N1 : Konsentrasi awal ekstrak teh hitam (%)

V2 : Volume keseluruhan ekstrak teh hitam (mL)

N2 : Konsentrasi yang diinginkan (%)

- Tabung tersebut kemudian diinkubasi dalam incubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Kemudian tabung-tabung tersebut dikeluarkan dari incubator, dicuci dengan PBS (pH 7,3) lalu dikeringkan.
- Tabung-tabung yang sudah kering, dicat dengan Kristal violet (0,1%) sebanyak 5 mL lalu didiamkan selama 15 menit, kelebihan cat dibuang dan dibilas dengan *deionized water*.

- Tabung yang sudah dicat kemudian dikeringkan dan diamati pembentukan biofilmnya.

4.7.4 Pengukuran Mean Gray Value

Hasil pembentukan biofilm pada tabung difoto dengan menggunakan kamera digital. Untuk mengetahui intensitas warna pada area cincin dan dinding tabung pada masing-masing kelompok digunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS3*. Langkah-langkahnya adalah dengan membuka *Photoshop CS3*, pilih *File* dan masukkan hasil fotonya. Selanjutnya pilih *tab Window* dan pilih *Measurement Log*, blok area yang akan dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool*, lalu klik *Record Measurements* maka akan didapatkan nilai *Mean Gray Value* yang merupakan rerata dari intensitas warna pengecatan tabung.

4.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah Uji *One Way ANOVA* dan Uji Korelasi Pearson. Uji *One Way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh antara berbagai konsentrasi ekstrak rimpang jahe merah terhadap intensitas warna yang ditimbulkan oleh biofilm pada tabung (*Mean Gray Value*). Sedangkan Uji Korelasi Pearson digunakan untuk mengetahui hubungan antara masing-masing konsentrasi ekstrak teh hitam terhadap intensitas warna biofilm pada tabung (*Mean Gray Value*). Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 17.0.

4.9 Rancangan Operasional Penelitian





