

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain penelitian eksperimental laboratories secara in vitro. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Uji antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode dilusi tabung yang ditujukan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa terhadap biakan bakteri *S.aureus*.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

4.2.1 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan antara bulan Juli – November 2016

4.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Pengekstrakan dilakukan di Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang.

4.3 Sampel dan Besar Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *S. aureus* yang dimiliki oleh laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pada penelitian ini digunakan 7 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda dan 1 kontrol negatif, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus Federe, estimasi pengulangan yaitu,

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

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

$$8n - 8 \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

$$n \geq 2.875$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka banyaknya pengulangan jumlah dari sampel bakteri *S. aureus* yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 3.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah pertumbuhan *S. aureus*.

4.4.2 Variabel Independen

Variable independen dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan konsentrasi yang berbeda-beda.

4.5 Definisi Operasional

- 1) Buah Mahkota Dewa yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging dan kulit buah Mahkota Dewa yang tua sebanyak 20 Kg, dan didapat di area kota Malang.

- 2) Ekstrak buah Mahkota Dewa adalah buah Mahkota Dewa dalam bentuk serbuk kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dan dipartisikan untuk dijadikan ekstrak flavonoid cair dengan menggunakan bahan pengekstrak n-heksana dan n-butanol.
- 3) *S. aureus* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari bakteri *S. aureus* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- 4) Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Hal ini ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada larutan yang berisi ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa dan suspensi bakteri tersebut dalam tabung yang sudah diinkubasi selama 18-24 jam.
- 5) Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa terendah yang mampu membunuh bakteri *S. aureus*. Hal ini ditandai dengan jumlah koloni pada NAP yang telah dilakukan penggoresan sebanyak satu ose larutan ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa yang ditambahkan bakteri uji setelah diinkubasi tersebut, dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% *original inoculums*.
- 6) Original inoculums adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL yang diinokulasi sebagai konsentrasi awal bakteri yang akan dipergunakan untuk mencari kategori KBM.
- 7) Kontrol negatif adalah ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa murni yang tidak dicampur dengan bakteri *S. aureus* yang

digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril dimana nilai kontrol negative adalah 0 (tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri jenis apapun)

- 8) Kontrol positif adalah biakan bakteri *S. aureus* murni yang tidak dicampur dengan ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa yang dapat digunakan sebagai standar jumlah pertumbuhan bakteri tanpa ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa.
- 9) Kadar konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3% dan 3,5%.
- 10) Tingkat kekeruhan pada masing-masing tabung akan dievaluasi menggunakan kertas putih bergaris-garis hitam yang diposisikan tepat dibelakang tabung.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

Alat yang digunakan adalah ose, pipet, tabung reaksi, mikroskop. Kertas penghisap/*tissue*, minyak emersi, dan lampu spiritus. Bahan yang digunakan adalah *S. aureus*, *Nutrient Broth*, *Glass object*, Kristal violet, aquades, larutan lugol, alcohol 96%, safranin, hydrogen peroksida, *Rapid latex test kit*, *Nutrient Agar Plate* dan *Mannitol Salt Agar*.

4.6.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Flavonoid Buah Mahkota Dewa

Alat yang digunakan untuk ekstraksi dan partisi buah Mahkota Dewa adalah oven, blender, timbangan, gelas Erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, labu penampung etanol, evaporator, rotary evaporator, pendingin spiral, selang water pump, water pump, water bath, vacuum pump,

sentrifugal, dan botol hasil ekstrak. Alat yang digunakan untuk uji flavonoid adalah peralatan gelas laboratorium dan kertas saring.

Bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa adalah serbuk buah Mahkota Dewa sebanyak 2500 gram, etanol 96% sebagai pelarut sebanyak 30 liter, aquades, methanol 70%, larutan HCl dan serbuk Mg, n-heksana 1000 ml dan n-butanol 500 ml, larutan Mayer dan Wagner.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Prosedur Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

a. Inokulasi pada *Nutrient Agar Plate*

Menyiapkan biakan bakteri pada *nutrient broth*, melakukan *streaking* bakteri pada NAP, melakukan inkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Mengamati hasil koloni yang muncul, koloni *S. aureus* pada NAP berwarna kuning emas berbentuk bulat, berdiameter 1-2 mm, konveks dengan tepi rata, permukaan mengkilat dan lunak konsistensinya.

b. Pewarnaan Gram

1. Bersihkan *glass object* dengan *tissue* dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak kemudian biarkan dingin
2. Satu ose aquades steril ditetaskan pada *glass object* kemudian ditambahkan dengan sedikit bakteri yang diambil dengan menggunakan ose dai NAP, lalu ratakan dan biarkan kering di udara lalu lakukan fiksasi diatas api
3. Tuang Kristal violet dan biarkan selama 1 menit
4. Sisa bahan perwarna dibuang dan dibilas dengan air
5. Sediaan dituangi larutan lugol selama 1 menit

6. Sisa lugol dibuang dan dibulas dengan air
 7. Sediaan dituangi alcohol 96% sebagai peluntur selama 5-10 detik
 8. Sisa alcohol dibuang dan dibilas dengan air
 9. Sediaan dituangi safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik
 10. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air
 11. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, dan tetsi minyak imersi
 12. Lihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x. hasil gram positif ditunjukkan dengan warna ungu. Bakteri *S. aureus* berbentuk kokus atau bulat menggrombol seperti anggur
- c. Uji Katalase
1. Ambil satu ose bakteri *S. aureus* pada medium NAP yang telah dibuat
 2. Buat apusan pada *glass object*
 3. Teteskan larutan hydrogen peroksida 3% ke atas koloni bakteri NAP
 4. Uji katalase positif jika terbentuk gelembung gas O₂ akibat adanya reaksi enzim katalase yang mengubah hydrogen peroksida menjadi air dan oksigen. *S. aureus* uji katalase positif

d. Uji Koagulase

1. Ambil *glass object* dan tetesi aquades 1 tetes
2. Ambil satu koloni bakteri menggunakan ose
3. Tambahkan satu tetes *latex* dan campur dengan cara menggoyangkan *glass object* selama 5-10 detik dengan arah melingkar

4. Uji koagulase positif jika terbentuk gumpalan putih pada *glass object*
- e. Perbenihan pada Mannitol Salt Agar
 1. Ambil satu ose bakteri *S. aureus* dari media NAP
 2. Lakukan inokulasi pada media MSA selama 20 jam pada suhu 37°C
 3. Lakukan pengamatan. Hasil uji positif jika terlihat koloni bakteri berbentuk bulat, konveks dengan tepi rata, konsistensi lunak, serta memiliki pigmen warna kuning. Pigmen akan tampak jelas 1-2 jam setelah dikeluarkan dari incubator berkaitan dengan penyesuaian suhu inokulasi suhu ruang

4.7.2 Prosedur Ekstraksi Flavonoid Buah Mahkota Dewa

- a. Tahap pengeringan
 1. Mencuci bersih buah Mahkota Dewa yang akan dikeringkan
 2. Buah Mahkota Dewa dioven dengan suhu 80°C (bebas kandungan air)
 3. Menggiling buah Mahkota Dewa untuk dijadikan bubuk sebanyak 2500 gram
- b. Tahap Ekstraksi
 1. Serbuk buah Mahkota Dewa ditimbang dengan menggunakan timbangan sebanyak 2500 gram. Kemudian dimasukkan dalam beberapa gelas Erlenmeyer ukuran besar.
 2. Kemudian direndam didalam larutan etanol 96% sebanyak 30 liter dan diaduk sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit)
 3. Diamkan selama 5 malam sampai mengendap

4. Dilakukan penyaringan dengan corong Buncher hingga didapatkan filtrate yang terpisah dengan ampas

c. Tahap Evaporasi

1. Memasang evaporator set dengan kemungkinan 30° - 40° terhadap meja dengan susunan yang terdiri dari alat pemanas, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator*, dan tabung pendingin
2. Hasil ekstraksi dipindahkan ke labu penampung
3. Menyalakan *rotary evaporator*, alat pompa air dingin dan alat pompa vakum
4. Alat pemanas aquades dinyalakan dengan suhu 50°C dan biarkan etanol menguap
5. Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol agar tidak bercampur dengan hasil evaporasi
6. Proses ini dilakukan sampai volume ekstrak berkurang dan menjadi pekat

d. Partisi Cair-Cair

- Partisi n-heksana

1. Ekstrak Etanol disuspensikan dalam air
2. Ekstrak yang sudah disuspensikan dimasukkan ke dalam corong pisah sebagai cairan lapis pertama
3. Ditambahkan n-heksana sebanyak 1000 ml ke dalam corong pisah sebagai cairan lapis kedua
4. Cairan dalam corong pisah dikocok

5. Didiamkan beberapa menit hingga terbentuk endapan etanol dan endapan n-heksana
6. Lapisan etanol dan n-heksana yang terbentuk dipisahkan dalam wadah terpisah
7. Lapisan n-heksana dihilangkan
8. endapan etanol diuapkan kembali dengan suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$

- Partisi n-butanol

1. Lapisan etanol dicampurkan kembali dengan n-butanol jenuh sebanyak 500 ml
2. Hasil campuran etanol dan n-butanol disentrifugasi dengan kecepatan putaran 3000rpm selama 10 menit
3. Hasil endapan (supernatan) n-butanol yang diperoleh dipisahkan kemudian diuapkan dengan suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ hingga terbentuk ekstrak flavonoid 100% kental

4.7.3 Uji Fitokimia

a. Uji Flavonoid

- Memasukkan serbuk Mg 5 mg dan 1 ml HCl pekat ke dalam 0.5 gram ekstrak
- Dikocok dengan kuat dan membiarkan larutan hingga memisah
- Mengamati perubahan yang terjadi
- Jika berbentuk warna merah dalam ekstrak menandakan adanya flavonoid

b. Uji Alkaloid

- Timbang ekstrak sebanyak 0.5 gram
- Tambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling
- Panaskan di atas pemanas air selama 2 menit, dinginkan dan disaring
- Filtrate yang diperoleh dipakai untuk tes alkaloid sebagai berikut:
 - 1) Filtrate sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes larutan Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning
 - 2) Filtrate sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Wagner, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat.

c. Uji Saponin

- Timbang ekstrak sebanyak 0.5 gram
- Masukkan ke dalam tabung reaksi
- Tambahkan 10 ml air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat selama 10 detik
- Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin

4.7.4 Prosedur *Suspensi Bakteri Staphylococcus aureus*

- a. Pastikan bakteri adalah bakteri *S. aureus* diambil dari *Nutrient Agar Plate* dan lakukan inokulasi bakteri pada *Nutrient Broth* kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C

- b. Lakukan penilaian kepadatan perbenihan cairan bakteri atau penilaian absorbansi suspensi dengan spektrofotometer pada gelombang cahaya 625 nm.
- c. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 /ml atau setara dengan *Optical Density* (OD) dengan nilai 0.1, kemudian perhitungan dilakukan sebagai berikut:

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

Keterangan:

$N1$ = OD bakteri hasil spektrofotometri

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

$V1$ = Volume bakteri ditambah pengencer

$V2$ = Volume *suspense* Bakteri (10 ml)

- d. Dari perhitungan tersebut diperoleh volume (dalam ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /ml sebanyak 10 ml. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 /ml sebanyak 10 ml, selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 10 kali dengan menggunakan NaCl sehingga diperoleh suspensi bakteri sebanyak 10 ml dengan konsentrasi 10^7 /ml. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^7 /ml sebanyak 10 ml, selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 10 kali dengan menggunakan *nutrient broth* sehingga diperoleh suspensi bakteri sebanyak 10 ml dengan konsentrasi 10^6 /ml. Kini suspensi bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

4.7.5 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Flavonoid Buah Mahkota Dewa

Ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa awal dianggap memiliki konsentrasi 100% dan dilarutkan dengan DMSO 1% dengan perbandingan 1:1. Kemudian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi 5% sebanyak 3 ml.

100% → Ekstrak 1 gram + DMSO 1% 1 ml → Divortex

1.7 ml Ekstrak 100%

5% → $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$

$$V_1 \times 100 = 3 \times 5$$

$$V_1 = 0.15 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 2.85 \text{ ml aquades}$$

Dari ekstrak dengan konsentrasi 5% dibuat ekstrak dengan konsentrasi 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, dan 3.5% masing-masing sebanyak 1 ml.

0.5% → $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$

$$V_1 \times 5 = 1 \times 0.5$$

$$V_1 = 0.1 \text{ ml (ekstrak 5\%)} + 0.9 \text{ ml aquades}$$

1% → $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$

$$V_1 \times 5 = 1 \times 1$$

$$V_1 = 0.2 \text{ ml (ekstrak 5\%)} + 0.8 \text{ ml aquades}$$

1.5% → $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$

$$V_1 \times 5 = 1 \times 1.5$$

$$V_1 = 0.3 \text{ ml (ekstrak 5\%)} + 0.7 \text{ ml aquades}$$

$$2\% \longrightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5 = 1 \times 2$$

$$V_1 = 0.4 \text{ ml (ekstrak 5\%)} + 0.6 \text{ ml aquades}$$

$$2.5\% \longrightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5 = 1 \times 2.5$$

$$V_1 = 0.5 \text{ ml (ekstrak 5\%)} + 0.5 \text{ ml aquades}$$

$$3\% \longrightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5 = 1 \times 3$$

$$V_1 = 0.6 \text{ ml (ekstrak 5\%)} + 0.4 \text{ ml aquades}$$

$$3.5\% \longrightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5 = 1 \times 3.5$$

$$V_1 = 0.7 \text{ ml (ekstrak 5\%)} + 0.3 \text{ ml aquades}$$

4.7.6 Uji Kepekaan Ekstrak Flavonoid Buah Mahkota Dewa Terhadap *Staphylococcus aureus* (Penelitian Pendahuluan)

- Disediakan 8 tabung steril, 7 tabung sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol positif (KP).
- Disediakan pula aquades dan larutan bakteri uji (*S. aureus*).
- Larutan ekstrak flavonoid Mahkota Dewa dibuat dengan kadar 5%.
- Dimasukkan aquades dan ekstrak flavonoid Mahkota Dewa (berdasarkan kadar yang sudah ditentukan) dengan volume tertentu sehingga diperoleh 7 konsentrasi ekstrak flavonoid Mahkota Dewa yang berbeda-beda.

- e. Ditambahkan perbenihan cair kuman ke dalam masing-masing tabung ekstrak flavonoid Mahkota Dewa sebanyak 1 ml kemudian mencampur menggunakan vortex.
- f. Semua tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- g. Diperhatikan dan dicatat pada tabung nomor berapa tampak mulai terjadi kekeruhan. Kadar terendah pada tabung yang menunjukkan tidak ada kekeruhan merupakan KHM.
- h. Untuk memperoleh data KBM, dilakukan penanaman isi tabung sebanyak 0,1 ml (satu mata ose) pada medium NAP. Kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam kemudian dilihat ada tidaknya pertumbuhan koloni kuman.
- i. Prosedur penelitian dilakukan dengan sterilisasi alat menggunakan *autoclave*.

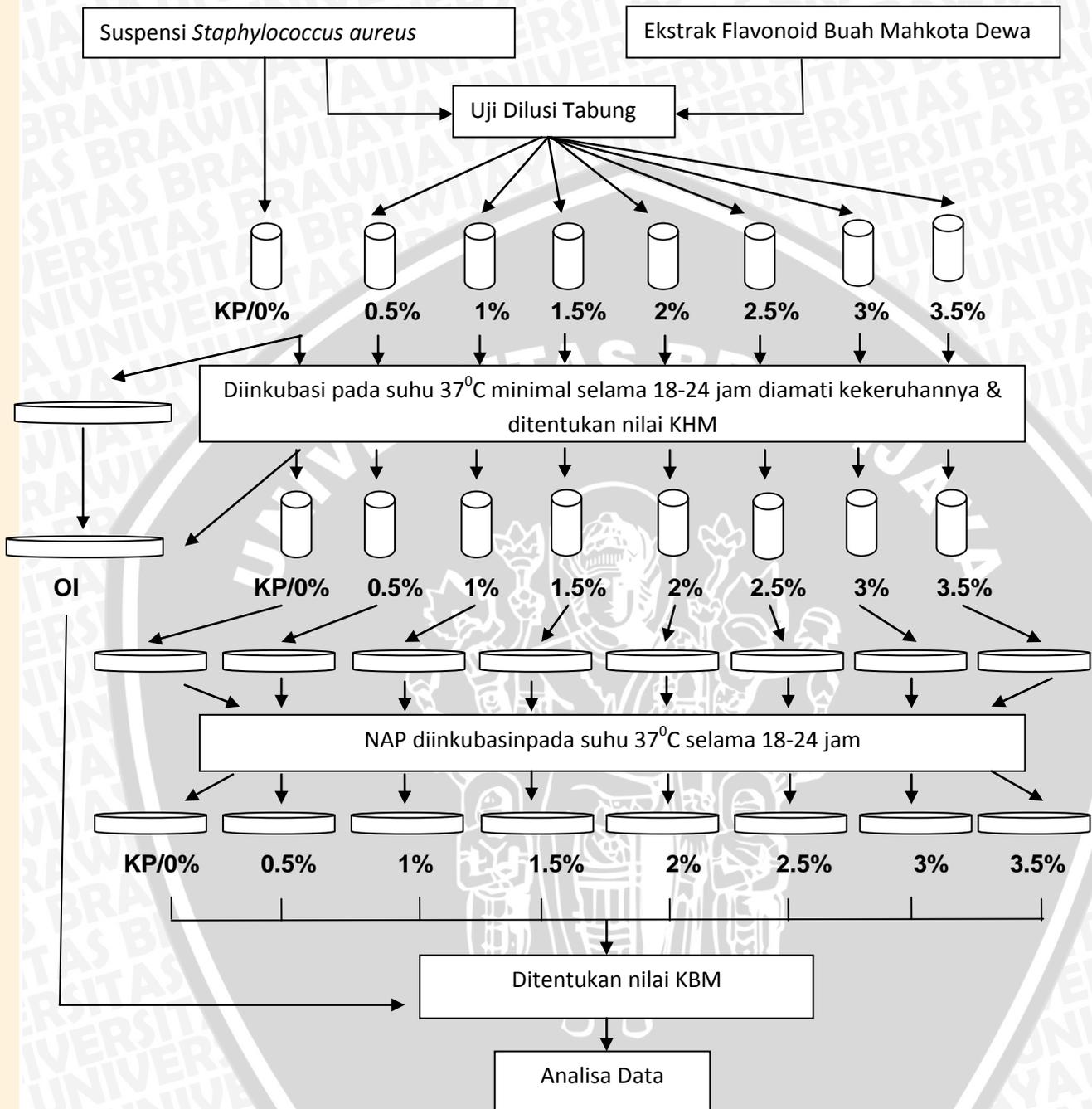
4.7.7 Uji Kepekaan Ekstrak Flavonoid Buah Mahkota Dewa Terhadap *Staphylococcus aureus*

- a. Disediakan 8 tabung steril, 7 tabung sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol positif (KP).
- b. Disediakan pula aquades dan larutan bakteri uji (*S. aureus*).
- c. Larutan ekstrak flavonoid Mahkota Dewa dibuat dengan kadar 5%.
- d. Dimasukkan aquades dan ekstrak flavonoid Mahkota Dewa (berdasarkan kadar yang sudah ditentukan) dengan volume tertentu sehingga diperoleh 7 konsentrasi ekstrak flavonoid Mahkota Dewa yang berbeda-beda.

- e. Ditambahkan perbenihan cair kuman ke dalam masing-masing tabung ekstrak flavonoid Mahkota Dewa sebanyak 1 ml kemudian mencampur menggunakan vortex.
- f. Semua tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- g. Diperhatikan dan dicatat pada tabung nomor berapa tampak mulai terjadi kekeruhan. Kadar terendah pada tabung yang menunjukkan tidak ada kekeruhan merupakan KHM.
- h. Untuk memperoleh data KBM, dilakukan penanaman isi tabung sebanyak 0,1 ml (satu mata ose) pada medium NAP. Kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam kemudian dilihat ada tidaknya pertumbuhan koloni kuman.
- i. Prosedur penelitian dilakukan dengan sterilisasi alat menggunakan *autoclave*.



4.7.8 Alur Kerja Penelitian



Keterangan:

KP : Kontrol Positif

KN : Kontrol Negatif

OI : Original Inoculum

NAP : Natrium Agar Plate

Gambar 4.1 Skema Alur Uji Antimikroba Ekstrak Flavonoid Mahkota Dewa terhadap *S.*

aureus

4.8 Analisis Data

Analisis data menggunakan uji statistik *One Way Anova*, pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha < 0,05$). Uji Anova satu arah ini digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian berbagai macam konsentrasi ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa terhadap koloni bakteri *S. aureus*. Sedangkan untuk mengetahui hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak dengan penurunan jumlah koloni bakteri digunakan Uji Korelasi dan Regresi dengan taraf kepercayaan 95%.

