

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium (*true experimental-post test only group design*) menggunakan uji dilusi tabung untuk mengamati pembentukan biofilm. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 75% (studi observasi). Penelitian inti dilakukan dengan konsentrasi 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, dan 60%. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak namun diberikan NaCl.

#### **4.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Ekstraksi bahan penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Maret 2017 dan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada rentang waktu Juli 2017 – Agustus 2017.

#### **4.3 Sampel Penelitian**

Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol daun eh hijau (*Camellia sinensis*). Sampel bakteri uji yang digunakan pada penelitian adalah *Burkholderia*

*cepacia* ATCC pembentuk biofilm yang diambil dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Bakteri telah diidentifikasi ulang sebelum penelitian dilakukan.

#### 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 7 perlakuan pada penelitian ini yaitu konsentrasi 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, dan 60%, sehingga estimasi besar sampel adalah:

$$(7-1)(n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \approx 4$$

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

#### 4.5 Variabel Penelitian

##### 4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi tertentu (dalam %), yaitu 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, dan 60%.

#### 4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah derajat pembentukan biofilm oleh *Burkholderia cepacia* dengan uji dilusi tabung. Derajat pembentukan biofilm dikuantifikasi dengan menggunakan *Mean Gray Value*.

#### 4.6 Definisi operasional

1. *Burkholderia cepacia* adalah bakteri yang digunakan pada penelitian ini berasal dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Dan bakteri akan diidentifikasi ulang sebelum penelitian.
2. Biofilm adalah agregat multiseluler yang membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat atau medium. Pada penelitian ini biofilm dibentuk oleh *Burkholderia cepacia* pada medium cair dalam tabung.
3. Ekstrak etanol teh hijau (*Camellia sinensis*) adalah hasil ekstraksi cair teh hijau dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Teh hijau berasal dari teh kemasan "Teh Hijau" yang didapat dari Kebun Teh Wonosari, Lawang.
4. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) adalah konsentrasi ekstrak etanol teh hijau (*Camellia sinensis*) terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm *Burkholderia cepacia* yang ditandai dengan tidak tampaknya bentukan cincin dan lapisan ungu kebiruan pada *airfluid border* (area antara medium cair dan udara) dalam tabung uji dan KHBM

ditentukan jika nilai *Mean Gray Value* pada kelompok uji lebih rendah 10% dari nilai *Mean Gray Value* dinding tabung yang masih baru.

5. Kontrol Bahan adalah ekstrak etanol teh hijau (*Camellia sinensis*) yang tidak dicampur bakteri *Burkholderia cepacia* dan digunakan untuk membuktikan bahwa bahan yang digunakan steril.
6. Kontrol Kuman adalah biakan bakteri yang tidak dicampur dengan ekstrak etanol teh hijau (*Camellia sinensis*) sebagai pembanding pertumbuhan bakteri jika tidak diberikan ekstrak. Dan kontrol kuman berlaku sebagai kontrol positif.
7. Derajat pembentukan biofilm merupakan intensitas ketegasan warna cincin biofilm, yang dikuantifikasi dengan *Mean Gray Value*. Semakin tegas warna cincin biofilm yang terbentuk, semakin rendah nilai *Mean Gray Value*.
8. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang diberikan ekstrak dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, dan 60%. Pada tabung yang diisi dengan bakteri.
9. *Mean Gray Value* adalah skala intensitas warna pada program *Adobe Photoshop CS3*. Skala berkisar antara 0-255. Angka mendekati 0 menunjukkannya kepekatan warna yang tinggi. Angka mendekati 255 menunjukkannya kepekatan warna yang rendah.
10. Nilai *Mean Gray Value* tabung kosong merupakan nilai yang didapat dari pengukuran *Mean Gray Value* pada dinding tabung yang tidak terbentuk cincin atau tidak terdapat perlakuan, yang akan digunakan sebagai nilai awal

#### **4.7 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Teh hijau**

1. Teh hijau (*Camellia sinensis*)
2. Etanol 96%
3. 2 buah gelas Erlenmeyer
4. Corong gelas
5. Kertas saring
6. Labu *evaporator*
7. Labu penampung etanol
8. *Evaporator*
9. Pendingin spiral/ *rotatory evaporator*
10. Selang *Water pump*
11. *Water pump*
12. *Water bath*
13. *Vacuum pump*
14. Botol hasil ekstrak

##### **4.7.2 Alat dan bahan untuk Kultur dan identifikasi bakteri**

1. Isolat *Burkholderia cepacia*
2. Bahan tes Oksidase *strip test* : reagen *tetramethyl-D-phenylenediamine dihydrochloride*
3. Bahan pengecatan Gram : lugol, kristal violet, safranin, dan alkohol 96%
4. *Microbact™*
5. Medium *Agar*
6. Minyak imersi, mikroskop, dan ose
7. Lampu spiritus

8. Tabung reaksi

#### 4.7.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. TSBglu
2. Biakan *Burkholderia cepacia* pembentuk biofilm
3. Tabung reaksi
4. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,3
5. *Deionized water*
6. Kristal violet
7. Pipet
8. Ose
9. *Beaker glass*
10. Inkubator
11. Lisol

#### 4.8 Prosedur penelitian

##### 4.8.1 Persiapan Teh Hijau (*Camellia sinensis*)

###### 4.8.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi

1. Menggunakan 100 gr daun kering teh hijau (*Camellia sinensis*) dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian di oven dengan suhu 40°-60° sehingga kandungan airnya berkurang.
2. Kemudian, daun teh hijau yang kering tersebut di *blender* menjadi sediaan bubuk, kemudian dimasukkan kedalam gelas Erlenmeyer ukuran 1L lalu direndam dengan etanol 96% sampai volume 1L, kemudian dikocok sampai benar – benar tercampur, kurang lebih 30 menit dan diamkan satu malam sampai mengendap.

3. Setelah satu malam, diambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif yang sudah terambil, proses ini dilakukan sampai sebanyak 3 kali dan dilanjutkan dengan proses evaporasi.
4. Memasang *evaporator set* pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30°-40° terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanasa air, labu penampung hasil evaporasi, *rotatory evaporator* dan tabung pendingin.
5. Kemudian air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui selang plastik.
6. Hasil maserasi dimasukkan dalam labu evaporasi sedangkan *rotatory evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.
7. Pemanas *aquades* juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih sampai dengan suhu 78°C (sesuai titik didih etanol 96%) dan etanol 96% mulai menguap.
8. Hasil penguapan etanol 96% dikondensasikan menuju labu penampung etanol 96% menuju labu penampung etanol 96% sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.
9. Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven selama kurang lebih 1,5 sampai 2 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa. Setelah itu kita dapatkan hasil ekstraksi sebanyak 15 mL.

## 4.8.2 Identifikasi bakteri

### 4.8.2.1 Pewarnaan Gram

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 steril, diambil sedikit bakteri *Burkholderia cepacia* yang tumbuh pada medium kemudian disuspensikan dengan satu tetes akuades steril yang sudah diteteskan terlebih dulu pada gelas onyek. 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 diwarnani
5. Tuangi sediaan pada gelas objek dengan Kristal violet dengan durasi 1 menit. Buang sisa kristal violet dan bilas dengan air.
6. Tuang sediaan dengan lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
7. Tuang sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alcohol dan bilas lagi dengan air.
8. Tuang sediaan dengan safranin selama ½ menit. Buang sisa safranin dan bilas lagi dengan air.
9. Keringkan sediaan dengan kertas penghisap. Kemudian ditetesi minyak imersi.
10. Lihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaraan 100x.
11. Bakteri *Burkholderia cepacia* yang teramati dibawah mikroskop merupakan bakteri batang Gram negatif.

#### 4.8.2.2 Tes Oksidase *Strip test*

1. Menyiapkan kertas oksidase *strip test* dan bakteri pada sediaan agar.
2. Mengambil bakteri pada sediaan dengan ose kemudian dioleskan pada kertas oksidase *strip test*.
3. Menunggu hingga waktu 10 detik dan diamati area kertas yang dioleskan.
4. Bila warna berubah menjadi ungu maka hasil uji positif, sedangkan bila tidak terjadi perubahan warna selama rentang waktu, maka hasil uji dinyatakan negatif. Bakteri *B. cepacia* merupakan bakteri yang menghasilkan hasil positif untuk uji oksidase

#### 4.8.2.3 Perbenihan Pada *Agar MacConkey*

1. Bakteri *Burkholderia cepacia* diinokulasi pada medium *MacConkey agar*
2. Inkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam kemudian dilanjutkan pengamatan hasilnya.
3. Bila warna media berubah menjadi warna merah artinya bakteri dapat memfermentasikan laktosa, bila warna berubah menjadi bening agak kekuningan artinya bakteri tidak dapat memfermentasikan laktosa. Bakteri *B. cepacia* merupakan bakteri yang tidak memfermentasikan laktosa.

#### 4.8.2.4 *Microbacter*<sup>TM</sup> *Kit*

Uji Biokimia menggunakan *Microbact*<sup>TM</sup> meliputi beberapa uji seperti uji *Indole* dan uji reduksi nitrat. Prosedur uji ini antara lain:

1. Siapkan kultur murni *Burkholderia cepacia* yang telah diidentifikasi selama 24 jam.
2. Lakukan tes oksidase untuk mengetahui jenis *Microbact*<sup>TM</sup> *kit* yang akan digunakan. Bila hasil uji oksidase positif maka menggunakan *Microbact*<sup>TM</sup> *kit* 24E (12A (12E) + 12B).

3. Ambil isolat bakteri dan encerkan dalam larutan *saline* sebanyak 5ml
4. Siapkan *microplate* dan lepaskan lapisan penutupnya
5. Tambahkan empat tetes (kira – kira 100µl) suspensi bakteri pada setiap lubang
6. Tambahkan dua tetes *mineral oil* (MB1093A) pada lubang yang berlingkar hitam
7. Pasang kembali lapisan penutupnya dan inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C
8. Setelah dilakukan inkubasi, beri reagen yang sesuai pada lubang tertentu (indole, reagen nitrat)
9. Amati hasilnya dengan tabel yang tersedia yang tersedia lalu dicocokkan dengan *database Microbact™* pada *software Microbact™*.

#### 4.8.3 Pembuatan Pembenuhan Cair Bakteri Kepadatan 10<sup>6</sup> CFU/ml

1. *Burkholderia cepacia* yang sudah diidentifikasi kemudian dikultur dalam media BHI *broth* selama 24 jam dalam inkubator 37°C.
2. Suspensi bakteri *Burkholderia cepacia* pada BHI *broth* akan dilakukan pengukuran panjang gelombang ( $\lambda$ ) 625 nm.
3. Dari nilai absorbansi dapat diperkirakan jumlah bakteri pada perbenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui yaitu absorbansi 0,1 setara dengan setara dengan kepadatan bakteri 10<sup>8</sup> CFU/ml.
4. Untuk mendapatkan kepadatan bakteri sebesar 10<sup>8</sup> CFU/ml. Maka menggunakan perhitungan :

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

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 (10mL)

5. Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapat kepadatan  $10^8$  CFU/ml sebanyak 10ml.
6. Untuk mendapatkan kepadatan  $10^6$  CFU/ml. Maka dari kepadatan bakteri  $10^8$  CFU/ml dikurangi menjadi  $10^6$  CFU/ml dengan cara :
  - a. 10 ml bakteri dengan kepadatan  $10^8$  CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah terisi 9 ml larutan NaCl, aduk rata sampai larutan homogen. Dengan begini kepadatan bakteri berkurang menjadi  $10^7$  CFU/ml.
  - b. Selanjutnya dari bakteri dengan kepadatan  $10^7$  CFU/ml tersebut diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml larutan NaCl, aduk rata sampai larutan homogen, sehingga didapatkan kepadatan bakteri menjadi  $10^6$  CFU/ml.

#### **4.8.4 Uji Hambat Pembentukan Biofilm**

##### **4.8.4.1. Uji Pendahuluan**

1. Ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*) yang kental diambil sebanyak 1 gr dan dicampur dengan NaCl sebanyak 1 ml, sehingga didapatkan ekstrak teh hijau dengan konsentrasi 50%.
2. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan kepadatan  $10^6$  CFU/ml.
3. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSBglu berdasarkan OD dari spektrofotometri.

4. Menyiapkan tujuh tabung steril yang akan diisi dengan bakteri dan konsentrasi ekstrak yang ditentukan setelah uji pendahuluan, yaitu 0% (kontrol); 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 75%.
5. Mengisi tabung reaksi 1 – 6 dengan suspensi bakteri dari medium TSBglu dan ekstrak etanol daun teh dengan perhitungan sebagai berikut :

Konsentrasi Ekstrak (y%)	Banyaknya Ekstrak (x gr/1,5 ml)	Suspensi bakteri (ml)
0%	0	1,5
6,25%	0,1875	1,5
12,5%	0,375	1,5
25%	1,5	1,5
50%	1,5	1,5
75%	2,25	0,75

6. Kemudian keenam tabung tersebut diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
7. Setelah 24 jam, keenam tabung tersebut dicuci dengan larutan PBS (pH 7,3), lalu dikeringkan.
8. Setelah kering, seluruh tabung dicat dengan kristal violet 0,1% sebanyak 3ml atau hingga larutan kristal violet mengisi lebih tinggi dari batas larutan yang telah dibentuk pada masing – masing tabung. Diamkan selama 15 menit, kemudian buang larutan kristal violet dan cuci dengan air, kemudian dikeringkan.
9. Semua buangan dari tabung dimasukkan kedalam lisol.
10. Pembentukan biofilm dapat diamati pada area *airfluid border* (area antara medium cair dan udara).

#### 4.8.4.2 Penelitian Inti

1. Ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*) yang kental diambil sebanyak 1 gr dan dicampur dengan NaCl sebanyak 1 ml, sehingga didapatkan ekstrak teh hijau dengan konsentrasi 50%.
2. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan kepadatan  $10^6$  CFU/ml.
3. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSBglu berdasarkan OD dari spektrofotometri.
4. Menyiapkan tujuh tabung steril yang akan diisi dengan bakteri dan konsentrasi ekstrak yang ditentukan setelah uji pendahuluan, yaitu 0% (kontrol); 10%; 20%; 30%; 40%; 50%; 60%.
5. Mengisi tabung reaksi 1 – 6 dengan suspensi bakteri dari medium TSBglu dan ekstrak etanol daun teh dengan perhitungan sebagai berikut :

Konsentrasi Ekstrak (y%)	Banyaknya Ekstrak (x gr/1,5 ml)	Suspensi bakteri (ml)
0%	0	3
10%	0,3	1,5
20%	0,6	1,5
30%	0,9	1,5
40%	1,2	1,5
50%	1,5	1,5
60%	1,8	1,2

6. Kemudian keenam tabung tersebut diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
7. Setelah 24 jam, keenam tabung tersebut dicuci dengan larutan PBS (pH 7,3), lalu dikeringkan.

8. Setelah kering, seluruh tabung dicat dengan kristal violet 0,1% sebanyak 3ml atau hingga larutan kristal violet mengisi lebih tinggi dari batas larutan yang telah dibentuk pada masing – masing tabung. Diamkan selama 15 menit, kemudian buang larutan kristal violet dan cuci dengan air, kemudian dikeringkan.
9. Semua bungan dari tabung dimasukkan kedalam lisol.
10. Pembentukan biofilm dapat diamati pada area *airfluid border* (area antara medium cair dan udara).

#### 4.8.5 Pengukuran *Mean Gray Value*

1. Hasil pembentukan biofilm pada tabung kemudian difoto dengan menggunakan kamera digital.
2. Untuk mengetahui intensitas warna pada area cincin pada dinding tabung pada masing – masing kelompok maka digunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS3*. *Mean Gray Value* dinyatakan dalam skala 0 – 255. Nilai *Mean Gray Value* yang makin rendah menunjukkan intensitas warna yang semakin tebal, sementara nilai yang makin tinggi menunjukkan intensitas warna yang semakin tipis.
3. Pengukuran *Mean Gray Value* dilakukan sebagai berikut:
  1. Membuka aplikasi *Adobe Photoshop CS3*.
  2. Pilih *File*, masukkan hasil foto.
  3. Kemudian menentukan *Mean Gray Value* tabung kosong dengan cara:
    - a. Pilih tab *Windows* kemudian pilih *Measurement Log*
    - b. Blok area tabung yang kosong dan tidak terbentuk biofilm dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool*

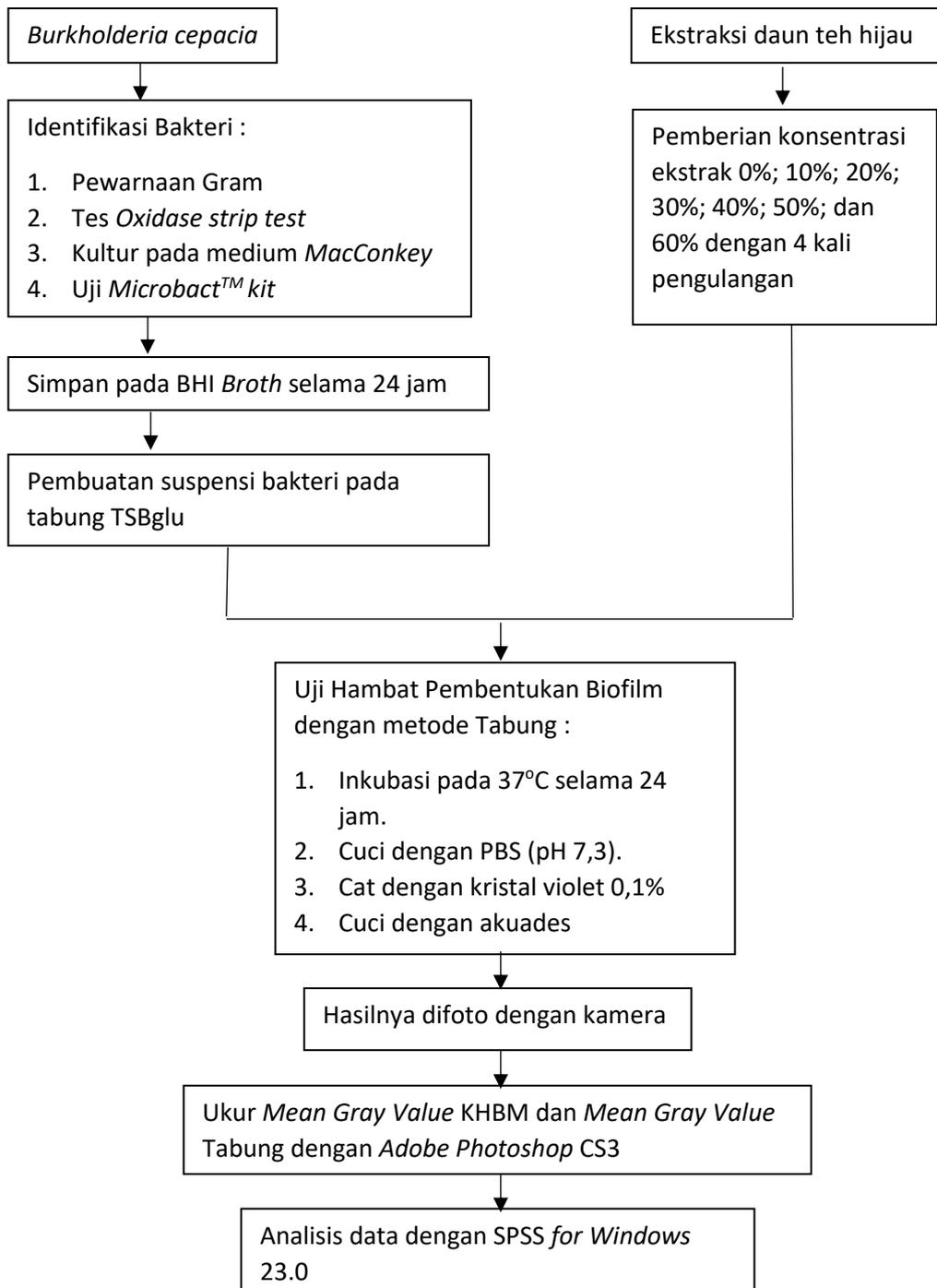
- c. Lalu klik *Record Measurement*
  - d. Pada hasil akan terdapat nilai *Mean Gray Value* yang akan digunakan sebagai *Mean Gray Value* KHBM
4. Kemudian menentukan *Mean Gray Value* masing – masing tabung dengan cara:
- a. Pilih tab *Windows* kemudian pilih *Measurement Log*
  - b. Blok area yang terlihat terbentuknya cincin pada tabung dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool*
  - c. Lalu klik *Record Measurement*
  - d. Ulangi langkah a – c pada semua tabung
  - e. Hasil yang didapat merupakan nilai *Mean Gray Value* yang akan digunakan untuk mengetahui pengaruh ekstrak terhadap penghambatan pembentukan biofilm.

#### **4.8.6 Analisis Data**

Penelitian ini menggunakan variabel numerik dengan satu faktor yang ingin diketahui yaitu perbedaan pengaruh antara berbagai konsentrasi ekstrak etanol teh hijau (*Camellia sinensis*) 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. Analisa data dilakukan dengan menggunakan *IBM Statistic SPSS (Statistical Product of Service Solution)* untuk *windows* versi 23.0. Langkah – langkah pengujian sebagai berikut :

1. Uji normalitas data dengan menggunakan *Kolmogorov Smimov test* untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (nonparametrik) dan homogen atau tidak homogen.
2. Uji komparasi dilakukan dengan cara :
  - a. ANOVA, dengan syarat :
    - i. Sebaran data harus normal
    - ii. Varian data harus sama (homogen)
  - b. Namun, jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka digunakan metode *Kruskal Wallis*.
3. Uji Post Hoc dilakukan dengan cara :
  - a. *Tukey*, dengan syarat :
    - i. Sebaran data normal
    - ii. Data homogen
  - b. Namun, jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka menggunakan metode *Mann Whitney*.
4. Uji Korelasi dilakukan dengan cara :
  - a. *Pearson*, dengan syarat :
    - i. Sebaran data normal.
    - ii. Data homogen.
  - b. Namun, bila data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka menggunakan metode *Spearman*.
5. Uji Regresi dilakukan untuk mengetahui pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen setelah diketahui ada hubungan bermakna antara kedua variabel penelitian.

#### 4.9 Rancangan Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Rancangan Operasional Penelitian