

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan desain penelitian eksperimental. Efek dari ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode dilusi agar untuk menentukan KHM.

## 4.2 Sampel

Pada penelitian ini bakteri yang dipakai adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Brawijaya.

Dasar dari perhitungan pengulangan sampel adalah dengan rumus :

$$P(n-1) \geq 16$$

Keterangan : p = jumlah perlakuan (8 konsentrasi)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

$$p(n-1) \geq 16$$

$$8(n-1) \geq 16$$

$$8n - 8 \geq 16$$

$$6n \geq 18 + 8$$

$$n \geq 3$$

berdasarkan perhitungan di atas, pengulangan yang dilakukan paling sedikit 3 kali. Dalam penelitian ini dilakukan 4 kali pengulangan

### 4.3 Dasar Penentuan Perlakuan

Jumlah perlakuan yang diberikan ialah 8 perlakuan (konsentrasi). Konsentrasi ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) tersebut yaitu 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%; 0,7%; dan 0,8%. Penentuan pemilihan 8 konsentrasi tersebut karena berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilaksanakan sebelumnya.

### 4.4 Variabel Penelitian

#### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) yaitu 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%; 0,7%; dan 0,8%.

#### 4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* terlihat dari Kadar Hambat Minimal (KHM).

### 4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Januari-Februari 2013.

## 4.6 Alat dan Bahan Penelitian

### 4.6.1 Alat

#### 4.6.1.1 Ekstraksi Bunga Cengkeh

- Vakum rotavapor
- Cawan
- Pengaduk/pengocok

#### 4.6.1.2 Uji Ekstrak Bunga Cengkeh terhadap *Staphylococcus aureus*

- *Plate* untuk media agar
- Ose
- Tabung steril
- Rak tabung
- Inkubator
- Mikropipet
- Spektrofotometer
- Bunsen
- Korek api
- Spidol permanen
- Colony counter
- Label

### 4.6.2 Bahan

#### 4.6.2.1 Ekstraksi Bunga Cengkeh

- Bunga cengkeh kering



- Aquades steril
- Etanol 96% (sebagai pelarut)

#### 4.6.2.2 Pembuatan Sediaan Bakteri *Staphylococcus aureus*

- Kristal violet
- Lugol
- Etanol 96%
- Safranin
- Minyak imersi.

#### 4.6.2.3 Uji Ekstrak Bunga Cengkeh terhadap *Staphylococcus aureus*

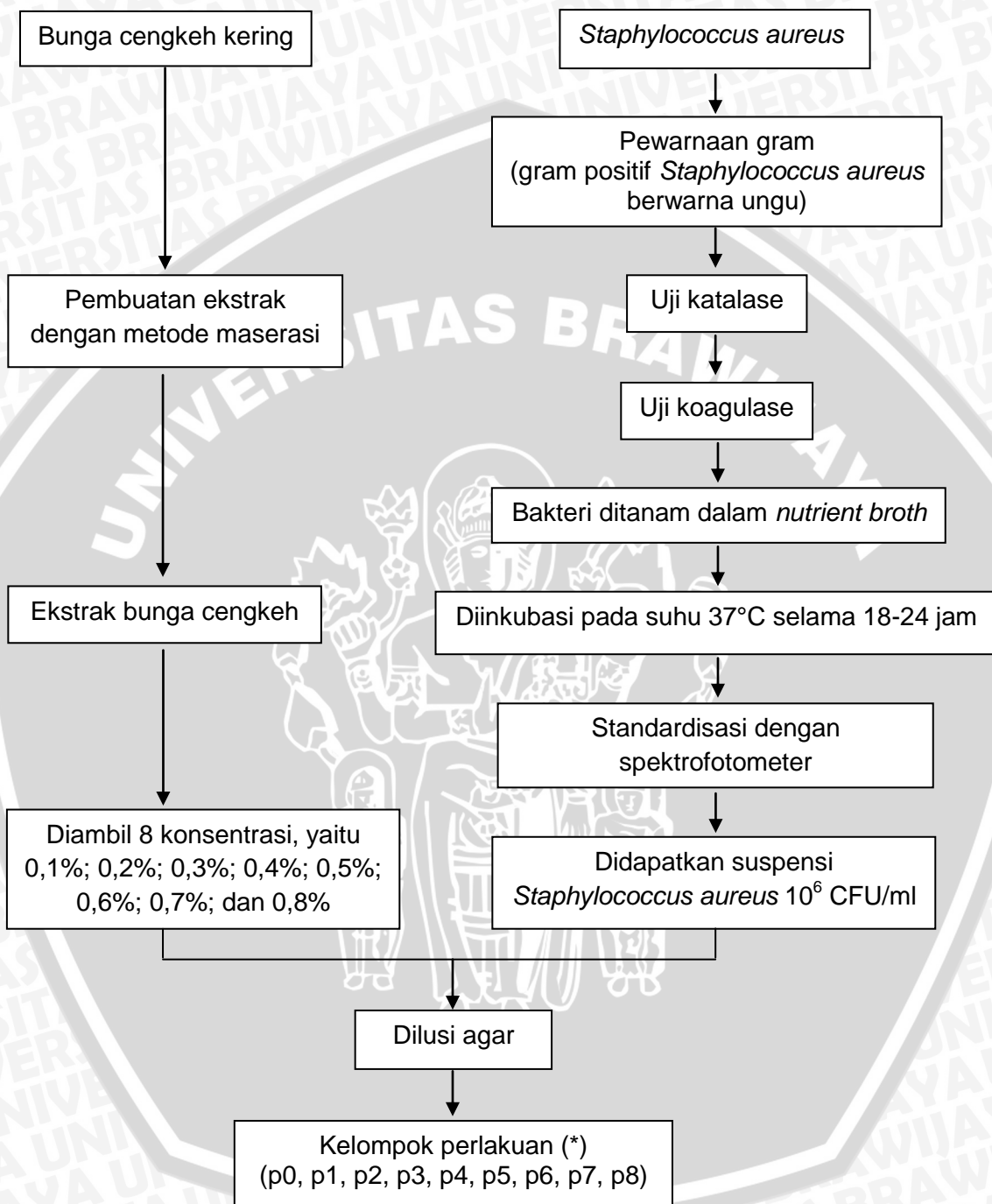
- Isolate bakteri *Staphylococcus aureus*
- Ekstrak bunga cengkeh
- Media agar

### 4.7 Definisi Istilah/Operasional

- a. Ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) berasal dari bunga cengkeh kering tipe Zanzibar yang biasa digunakan sebagai bahan obat dan rokok yang didapatkan dari toko Mekar Sari daerah pasar besar Malang dan kemudian dijadikan ekstrak cair dengan menggunakan etanol 96% melalui metode maserasi yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan mengambil 8 konsentrasi yaitu 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%; 0,7%; dan 0,8%.
- b. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang telah dikultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

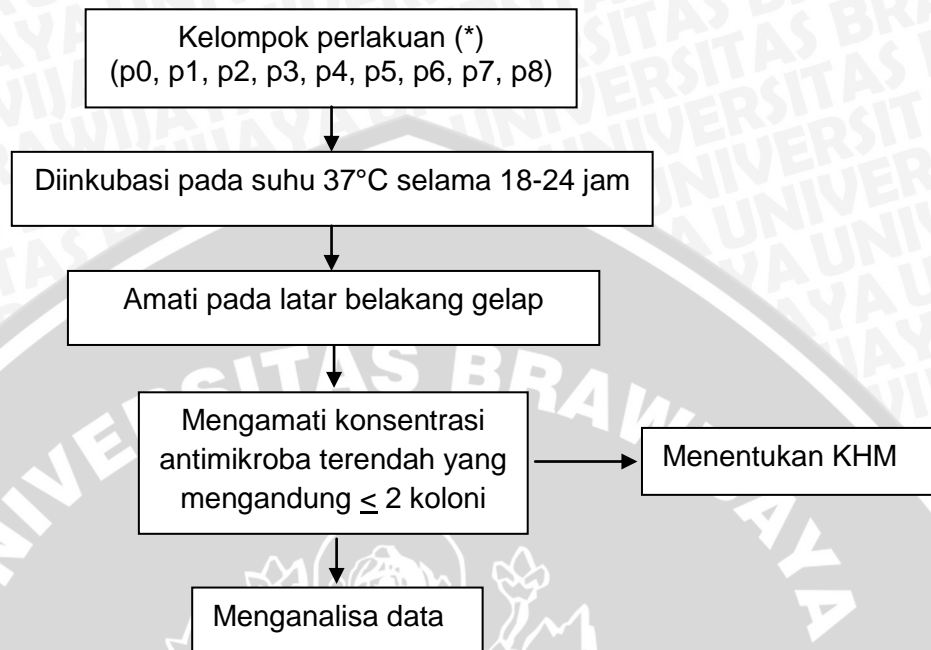
- c. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji yang ditandai dengan pertumbuhan koloni kurang dari tiga pada media agar yang ditetesi  $1 \times 10^4$  CFU/ml.
- d. Skoring adalah penentuan interpretasi hasil pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan cara menetapkan suatu skor terhadap jumlah koloni bakteri yang tidak dapat dihitung karena terlalu banyak, skor tersebut ialah :
- +3 : Koloni tumbuh padat dan tidak terhitung
  - +2 : Koloni tumbuh tipis dan tidak terhitung
  - +1 : Koloni tumbuh tipis dan terhitung
  - 0 : Tidak ada pertumbuhan koloni

4.8 Alur Penelitian



dilanjutkan





Keterangan (\*) :

- p0 = Kontrol bahan (hanya berisi ekstrak bunga cengkeh)
- p1 = Ekstrak bunga cengkeh 0,1% + agar + bakteri
- p2 = Ekstrak bunga cengkeh 0,2% + agar + bakteri
- p3 = Ekstrak bunga cengkeh 0,3% + agar + bakteri
- p4 = Ekstrak bunga cengkeh 0,4% + agar + bakteri
- p5 = Ekstrak bunga cengkeh 0,5% + agar + bakteri
- p6 = Ekstrak bunga cengkeh 0,6% + agar + bakteri
- p7 = Ekstrak bunga cengkeh 0,7% + agar + bakteri
- p8 = Ekstrak bunga cengkeh 0,8% + agar + bakteri

Bagan 4.1 Diagram Alur Penelitian

## 4.9 Prosedur Penelitian

### 4.9.1 Pembuatan Ekstrak Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*)

Bahan uji diperoleh melalui proses ekstraksi maserasi, sebagai berikut:

- 100 gram bunga cengkeh kering (*Syzygium aromaticum*) dihaluskan menggunakan blender. Setelah halus, ditimbang lalu dibungkus menggunakan kertas saring. Bunga cengkeh kering didapatkan dari pasar tradisional.
- Kertas saring yang berisi bubuk bunga cengkeh kering dimasukkan ke dalam tabung ekstraktor.
- Menuangkan etanol ke dalam tabung ekstraksi sampai tumpah ke dalam labu lalu ditambah lagi etanol setengahnya.
- Labu yang telah berisi pelarut etanol dipanaskan hingga mendidih dengan suhu 78,5°C.
- Proses terjadinya sirkulasi kontinyu pelarut etanol diamati hingga semua ekstraksi dianggap telah terekstraksi.
- Hasil ekstraksi lalu dievaporasi. Dari proses tersebut didapatkan 25 ml ekstrak bunga cengkeh.

### 4.9.2 Persiapan Bakteri Uji *Staphylococcus aureus*

Isolate yang ada diidentifikasi ulang dengan cara pewarnaan gram, uji katalase, uji koagulase

#### 4.9.2.1 Pewarnaan Gram Bakteri *Staphylococcus aureus*

- Gelas obyek dibersihkan dengan kapas, kemudian gelas obyek dilewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak, dibiarkan dingin.



- Sediaan bakteri dibuat dalam keadaan cukup (tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis)
- Sediaan bakteri dibiarkan kering di udara. Setelah kering dilakukan fiksasi dengan cara melewati sediaan di atas api sebanyak 3 kali, sediaan siap diwarnai.
- Sediaan dituangi dengan Kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit. Kemudian sisa Kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- Lugol dituang pada sediaan dan dibiarkan selama 1 menit. Kemudian sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- Alkohol 96% juga dituang pada sediaan dengan selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur, lalu sisa alkohol dibuang.
- Safranin juga dituang pada sediaan selama 30 detik, lalu sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan menggunakan kertas penghisap.
- Sediaan dapat dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran obyektif 100X.

#### 4.9.2.2 Uji Katalase

Untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus* dilakukan uji katalase, yaitu dengan menambahkan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pada perbenihan cair. *Staphylococcus* akan memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan munculnya gelembung udara. Langkah –langkah uji katalase sebagai berikut :

Dibuat suspensi bakteri pada gelas obyek :

- 1 tetes larutan saline / aquadest steril
- Ditambahkan 1 koloni bakteri

- Ditetesi dengan 1 tetes  $H_2O_2$  3% dan diamati timbulnya gelembung-gelembung udara pada media perbenihan

#### 4.9.2.3 Uji Koagulase

Uji koagulase bertujuan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan strain *Staphylococcus* lain serta untuk mengetahui ada atau tidaknya sifat patogen pada bakteri tersebut. *Staphylococcus aureus* bersifat koagulase positif. Langkah-langkah uji koagulase sebagai berikut :

Dibuat suspensi bakteri pada gelas obyek :

- 1 tetes larutan saline / aquadest steril
- Ditambahkan 1 koloni bakteri
- Ditambahkan 1 tetes plasma darah dan dicampurkan dengan cara menggoyangkan obyek glass secara melingkar selama 10 detik. Hasil positif apabila didapatkan gumpalan-gumpalan putih (clumping). Apabila hasilnya negative harus dikonfirmasi dengan uji koagulase pada tabung.

#### 4.9.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* ditanamkan pada *nutrient broth* kemudian di inkubasi dengan suhu  $37^{\circ}C$  selama 18-24 jam. Selanjutnya *nutrient broth* tersebut ditandardisasi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 untuk dibaca absorbansinya hingga didapatkan absorbansi yang setara dengan kepadatan bakteri  $10^8$  CFU/ml. *Nutrient broth* kemudian diencerkan agar mendapatkan kepadatan yang diinginkan

yaitu  $10^6$  CFU/ml. Untuk bakteri uji digunakan suspensi *Staphylococcus aureus* sebesar  $10^6$  CFU/ml.

#### 4.9.4 Prosedur Pengujian Kadar Hambat Minimal (KHM) *Staphylococcus aureus* oleh Ekstrak Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Menggunakan Tes Dilusi Agar

Tes dilusi agar dilakukan untuk menentukan KHM yang tidak dapat diketahui apabila menggunakan metode dilusi tabung. Hal ini disebabkan ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) berwarna keruh dan menggumpal sehingga mengganggu visualisasi untuk menentukan KHM.

Prosedur :

- Menyediakan 9 plate steril berdiameter 9 cm dan telah diberi tanda berdasarkan prosentase larutan ekstrak yang dicampur dalam dilusi agar, yaitu 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%; 0,7%; dan 0,8%. Setelah dicampur larutan ekstrak agar kemudian dipanaskan, lalu ditunggu hingga agarnya dingin.
- Volume yang dipakai dalam setiap plate untuk mencampur agar adalah 10 ml, jadi volume ekstrak yang dimasukkan ke dalam plate 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%; 0,7%; dan 0,8% adalah berturut-turut 0ml; 0,01ml; 0,02ml; 0,03ml; 0,04 ml; 0,05 ml; 0,06ml; 0,07 ml; dan 0,08ml. sedangkan sisanya adalah volume agar yang telah dipanaskan.
- Bakteri uji yang dipakai adalah bakteri yang diencerkan sampai  $10^6$  CFU/ml.



- Setelah agar dingin, setiap plate tersebut ditandai menjadi 4 bagian yang pada setiap bagian ditetesi bakteri uji sebanyak  $10^4$  bakteri/10  $\mu$ l. Kemudian semua plate diinkubasi selama 18-24 jam.
- Setelah itu koloni yang tumbuh pada agar plate dibaca. Lakukan pengamatan dengan menempatkan plate pada background gelap.
- Konsentrasi ekstrak pada dilusi agar plate yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni dapat disebut KHM larutan ekstrak.

#### 4.10 Analisis Data

Hasil dari KHM ditentukan melalui pengamatan jumlah pertumbuhan koloni pada plate agar.

Penelitian ini menggunakan batas kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) menggunakan fasilitas SPSS 16.0 for windows. Uji Kruskal Wallis, Uji Mann Whitney, serta Uji Korelasi Spearman digunakan untuk mengetahui dampak dari ekstrak bunga cengkeh terhadap jumlah koloni *Staphylococcus aureus*.