

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* menggunakan pendekatan *post-test only control group design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak metanol bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap pembentukan biofilm *S. aureus*. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *Microtiter Plate Test* yang kemudian dibaca pada spektrofotometer untuk mengetahui efek ekstrak bunga cengkeh terhadap penghambatan pembentukan biofilm dari bakteri *S.aureus* secara kuantitatif.

Kelompok kontrol bakteri adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan dosis konsentrasi 0%, 0,0009375%, 0,00185%, 0,00375%, 0,0075%, 0,015%, 0,03%, dan 0,06%.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah bakteri *S. aureus*. Sampel penelitian ini diperoleh dari isolat *S. aureus* pembentuk biofilm yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.1 Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan sampel *S.aureus* pembentuk biofilm. Rumus untuk menghitung estimasi jumlah pengulangan adalah (Notobroto, 2005):

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 4$$

p : perlakuan → dosis ekstrak bunga cengkeh yaitu dosis 0% (kontrol positif), 0,0009375%, 0,00185%, 0,00375%, 0,0075%, 0,015%, 0,03%, dan 0,06%.

n : pengulangan → berdasarkan rumus banyaknya pengulangan yang dilakukan minimal 4 kali.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan April 2013 sampai dengan bulan Juni 2013 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan ekstrak bunga cengkeh dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB Malang. Pembacaan spektrofotometer dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak bunga cengkeh. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 0%, 0,0009375%, 0,00185%, 0,00375%, 0,0075%, 0,015%, 0,03%, dan 0,06%.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah *optical density (OD)* pembentukan biofilm dari bakteri *S.aureus* yang bisa dihitung menggunakan spektrofotometer.

4.5 Definisi Operasional Penelitian

1. *Staphylococcus aureus* tergolong dalam bakteri Gram positif yang berbentuk kokus, bergerombol seperti buah anggur, anaerob fakultatif, menunjukkan tes katalase positif. *S.aureus* yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat swab tenggorok *S.aureus* strain pembentuk biofilm milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang diidentifikasi dengan menggunakan metode *congo red agar*.
2. Biofilm adalah suatu produk dari bakteri yang membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat/ media. Pada penelitian ini, penghambatan pembentukan biofilm akan diuji dengan menggunakan metode *microtiter plate*.
3. Ekstrak bunga cengkeh adalah hasil ekstraksi bunga cengkeh dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Bunga cengkeh diambil dari perkebunan cengkeh di Kabupaten Blitar khususnya di daerah Kesamben. Bunga cengkeh yang diambil adalah cengkeh tipe Zanzibar. Bunga cengkeh dikeringkan dengan panasnya matahari selama 1 minggu. Setelah kering, bunga cengkeh dibawa ke Laboatorium untuk selanjutnya diekstrasi.

4. Metode *microtiter plate* menurut Christensen *et al.* (2000) digunakan untuk mendeteksi pembentukan biofilm dan menguji efek ekstrak bunga cengkeh terhadap pembentukan biofilm *S.aureus*. Pada penelitian ini menggunakan *96-well plate*.
5. Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk menghitung *Optical Density* pada *well-microplate* yang diukur. Dari *Optical Density*, dapat ditentukan jumlah biofilm yang terbentuk di setiap *well-microplates*. Spektrofotometer yang digunakan adalah milik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
6. *Optical Density* adalah satuan yang digunakan untuk mengukur *biomass*, *cell count* dll. Menggunakan prinsip *refraction of light* dari spektrofotometri.

4.6 Instrumen Penelitian (Bahan dan Alat)

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Bunga Cengkeh

Alat yang dibutuhkan:

1. Oven
2. Timbangan (1)
3. Gelas Erlenmeyer (2)
4. Corong Gelas (1)
5. Kertas saring (1)
6. Labu evaporator (1)
7. Labu penampung metanol (1)
8. Evaporator (1)
9. Pendingin spiral/ rotary evaporator (1)
10. Selang water pump (1)
11. Water pump

12. Water bath
13. Vakum pump (1)

Bahan yang dibutuhkan:

1. Bunga cengkeh 100 Gram
2. Metanol 96%
3. Aquades
4. Botol hasil ekstrak

4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri Pembenihan Murni

Alat yang dibutuhkan:

1. minyak emersi, alat ose dan mikroskop
2. lampu spiritus
3. tabung reaksi
4. gelas objek

Bahan yang dibutuhkan:

1. isolat *Staphylococcus aureus*
2. NAP (*Natrium Agar Plate*)
3. bahan tes Katalase : H₂O₂ 3%
4. bahan pengecatan Gram : kristal violet, lugol, alkohol 95% dan safranin

4.6.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm dan Efek Anti Biofilm

Alat yang dibutuhkan:

1. *Microtiter plate*
2. *Congo Red Agar Plates*
3. *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*
4. Spektrofotometer

Bahan yang dibutuhkan:

1. Tyticase Soy Broth (TSB) dengan 1% glukosa
2. Biakan *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm
3. Phosphate Buffer Saline (PBS) PH 7,3
4. Kristal violet 0,2 mL 2%
5. HCl Isopropanol 200 µl
6. Ekstrak bunga cengkeh 0,0009375%, 0,00185%, 0,00375%, 0,0075%, 0,015%, 0,03%, dan 0,06%.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*)

4.7.1.1 Pembuatan Ekstrak Bunga Cengkeh

1. Proses Pengeringan
 - a. Bunga cengkeh (sampel basah) yang akan dikeringkan dicuci bersih
 - b. Bunga cengkeh dikeringkan dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air)
 - c. Bunga cengkeh kering diblender sampai halus
2. Proses ekstrasi
 - a. Setelah kering, bunga cengkeh dihaluskan dengan blender sampai halus
 - b. Kemudian ditimbang sebanyak 100 gr (sampel kering)
 - c. 100 gr sampel kering dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter
 - d. Kemudian direndam dengan metanol sampai volume 1000 ml
 - e. Seluruhnya dikocok sampai benar – benar tercampur (kurang lebih 30 menit)

- f. Campuran didiamkan 1 malam sampai mengendap
3. Proses Evaporasi
 - a. Lapisan atas campuran metanol dengan zat aktif yang sudah terpisah diambil
 - b. Kemudian dimasukkan ke dalam labu evaporasi 1 liter
 - c. Labu evaporasi dipasang pada evaporator
 - d. Water bath diisi dengan air sampai penuh
 - e. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk rotary evaporator, pemanas water bath, dan disambungkan dengan aliran listrik
 - f. Larutan metanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu
 - g. Kemudian ditunggu sampai aliran metanol berhenti menetes pada labu penampung (kurang lebih 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu)
 - h. Hasil ekstrasi dimasukan dalam botol plastik/ kaca
 - i. Botol disimpan dalam freezer.

4.7.2 Persiapan Biofilm *Staphylococcus aureus*

4.7.2.1 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

A. Pemeriksaan Mikroskopis (Forbes *et al*, 2007)

1. Pembuatan sediaan slide

Membersihkan gelas obyek dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak, dibiarkan dingin. Dibuat sediaan sedemikian rupa, sehingga tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis dengan cara :

- a. Satu ose aquades steril ditetaskan pada gelas obyek. Kemudian biakan kuman diambil sedikit menggunakan ose, selanjutnya

kuman disuspensikan dengan aquades pada gelas objek dan diratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.

- b. Sediaan kering dibiarkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.

2. Pewarnaan Gram

- a. Suspensi bakteri yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkannya di atas api beberapa kali siap untuk diwarnai.
- b. Sediaan kemudian ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama satu menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan air perlahan-lahan.
- c. Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit, lalu lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- d. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian alkohol segera dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- f. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 100x.

B. Tes Katalase

Tes katalase digunakan untuk membedakan bakteri *Streptococcus* dan *Staphylococcus*

- a. Biakan bakteri diambil sedikit dengan ose dan diusapkan ke gelas objek.

- b. Cairan H₂O₂ 3% diteteskan ke gelas objek
- c. Kemudian dilakukan observasi pembentukan gelembung
- d. Hasil positif bila ada gelembung, menunjukkan *Staphylococcus* sp.
- e. Hasil negatif bila tidak ada gelembung, menunjukkan *Streptococcus* sp.

C. Tes Sensitivitas

Tes ini menggunakan cakram antibiotik 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 dapat dinilai berdasarkan ukuran diameter atau daerah hambat kuman di sekitar *disk* atau cakram antibiotik sesuai kriteria NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*). Interpretasinya diameter kurang dari atau sama dengan 19 mm disebut resisten dan lebih dari atau sama dengan 20 mm disebut sensitif (Levine, 2007)

4.7.2.2 Pembentukan Perbenihan Cair Bakteri

1. Setelah dipastikan bakteri adalah bakteri *S. aureus* bakteri dipindahkan dalam tabung yang berisi MH *broth* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
2. Dilakukan pengenceran pada perbenihan cair bakteri sehingga didapatkan konsentrasi bakteri 10⁸ CFU/ml.
3. Dari konsentrasi bakteri 10⁸ CFU/ml ini, kemudian dilakukan pengenceran dengan menambahkan 1ml perbenihan (10⁸ CFU/ml)

ke dalam 9ml MH *broth* untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10^7 CFU/ml.

4. Setelah itu, dilakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1ml perbenihan cair (10^7 CFU/ml) untuk ditambahkan pada 9ml MH *broth* sehingga akhirnya didapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu sebesar 10^6 CFU/ml.

4.7.2.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

Congo Red Agar method (Moore, 2009)

1. *Congo Red Agar* yang telah disiapkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
2. *S.aureus* diinokulasi pada CRA.
3. CRA ini lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .
4. Hasil positif ditunjukkan dengan koloni yang berwarna hitam.
5. Hasil negatif ditunjukkan dengan koloni yang berwarna pink.

4.7.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Microtiter method (Christensen *et al.*, 1987)

1. Kultur *S. aureus* semalaman pada masing-masing media *trypticase soy broth* glukosa (TSBglu) didilusi sampai 1:100 pada TSBglu.
2. Kemudian 200 μl *S. aureus* konsentrasi 10^6 bakteri/ml diisikan pada baris pertama 96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate.
3. Kemudian di tiap kolomnya ditambahkan ekstrak bunga cengkeh dengan konsentrasi yang berbeda-beda, yaitu 0% (kontrol positif), 0,0009375%, 0,001875%, 0,00375%, 0,0075%, 0,015%, 0,03%, dan 0,06%.

4. Mikrotiter diinkubasi semalaman pada suhu 37°C
5. Kemudian isi dari tiap mikrotiter *plate* diaspirasi dan dicuci tiga kali dengan 0,2 mL *phosphate-buffered saline* (pH 7,2) dengan *pipetting* perlahan. *Well-plates* dikocok secara hati-hati untuk menghilangkan seluruh bakteri yang tidak menempel.
6. Mikroorganisme yang menempel pada *well* diwarnai dengan *crystal violet* 2%, didiamkan selama 30 menit.
7. Setelah 30 menit, aspirasi kristal violet lalu cuci dengan aquadest steril sampai bersih dan biarkan sampai kering.
8. Untuk menganalisis secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 200 µl dari HCl isopropanol di setiap well.
9. Setelah dikeringkan, *optical density* (OD) dari mikroorganisme yang terwarnai diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm.

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari pembacaan di Spektrofotometri yang berupa *Optical Density* setiap *well-plates* yang diberi perlakuan berbeda, yaitu pemberian ekstrak bunga cengkeh dengan konsentrasi 0% (kontrol positif), 0,0009375%, 0,00185%, 0,00375%, 0,0075%, 0,015%, 0,03%, dan 0,06%. Analisis yang digunakan adalah uji *one-way Anova* dan uji korelasi. Semua perangkat analisis menggunakan fasilitas *SPSS 16.0* dari *Windows*.

4.9 Rancangan Operasional Penelitian

