

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan *posttest only control group* untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) sebagai antimikroba terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Pengujian antimikroba ekstrak daun sirsak dilakukan dengan metode *tube dilution test* yang meliputi 2 tahap yaitu tahap pengujian bahan pada medium cair untuk menentukan KHM dan tahap *streaking* pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*) untuk mengetahui KBM.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang yang dilakukan selama bulan Juni sampai bulan November 2013.

4.3 Sampel dan Pengulangan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan bakteri gram positif *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Pada penelitian ini, digunakan 6 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda serta 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus estimasi pengulangan sebagai berikut (Notobroto, 2005) sebagai berikut:

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \approx 4$$

keterangan : n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan

Dengan demikian, untuk memenuhi persyaratan uji statistik pengulangan yang dilakukan adalah paling sedikit empat kali.

4.4 Identifikasi Variabel

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah beberapa konsentrasi bertingkat ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.). Pada penelitian ini dibuat 6 macam variabel konsentrasi, dimana sebelumnya dilakukan eksplorasi dosis awal dan lanjutan untuk menentukan 6 macam variasi konsentrasi ekstrak daun sirsak tersebut.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yang tumbuh pada media perbenihan yang akan diukur KHM dan KBM.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Potensi adalah kemampuan dari ekstrak etanol daun sirsak yang memiliki kemungkinan untuk dikembangkan dan dapat diukur. Pada penelitian ini potensi ekstrak etanol daun sirsak ditunjukkan oleh hasil pengamatan KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum).

4.5.2 Daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak tua segar didapatkan dari Balai Materia Medika di kota Batu, Malang.

4.5.3 Ekstrak etanol daun sirsak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak cair menggunakan bahan pengestraksi etanol 96% dengan metode maserasi yang dilakukan di Politeknik Negeri Malang.

4.5.4 Isolat MRSA yang digunakan pada penelitian ini adalah galur *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik methicillin yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yaitu isolat *S.aureus* yang dilakukan uji resistensinya dengan Cefoxitin 30µg disc pada agar (Santosaningih, 2008). *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) merekomendasikan penggunaan cefoxin daripada oxacillin ketika menggunakan metode difusi cawan untuk menentukan *S. aureus* yang resistensi terhadap methicillin karena lebih mudah diinterpretasi sehingga lebih sensitif untuk pendeteksian resistensi

berperantara gen mecA. Titik maksimum resistensi dan kerentanan yang direkomendasikan untuk uji cawan cefoxitin 30µg adalah ≥ 22 mm (Masdin, 2010).

4.5.5 Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri MRSA. Hal ini ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada larutan yang berisi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan suspensi bakteri tersebut dalam tabung setelah diinkubasikan 18-24 jam (Dzen *et al.*, 2003). Interpretasi kejernihan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) ini dibandingkan dengan larutan kontrol daun sirsak (*Annona muricata* L.).

4.5.6 Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi minimal ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri MRSA.

4.5.7 Kontrol bahan adalah ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) murni yang tidak dicampur bakteri MRSA yang digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril dimana nilai kontrol positif adalah 0 (tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri jenis apapun).

4.5.8 Kontrol kuman adalah biakan bakteri MRSA murni yang tidak dicampur dengan larutan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang dapat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain.

4.5.9 *Original inoculum* adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi, dan digunakan untuk mencari kategori KBM.

4.5.10 Pengamatan kuantitatif digunakan untuk menentukan pertumbuhan bakteri uji MRSA dengan menghitung koloni bakteri pada metode *colony counter*.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak

Pisau, *blender*, penimbang, kertas saring, tabung ekstraksi / *Erlenmeyer*, pengaduk, *rotary evaporator*, alat pemanas air, tabung pendingin, pompa sirkulasi air dingin, pipa plastik, pompa vakum, penampung hasil penguapan, labu penampung hasil evaporasi, oven, etanol 96%, dan daun sirsak tua segar didapatkan dari Balai Materia Medika Batu, Malang

4.6.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi MRSA

Biakan MRSA, bahan pewarna untuk pewarnaan Gram (Kristal violet, Lugol, Alkohol 96%, Safranin), minyak emersi, ose, mikroskop, larutan H₂O₂, tabung reaksi, mikro pipet, bunsen spiritus, korek api, akuades steril, air, kertas penghisap, *nutrient broth* 9 ml, NAP (*Nutrient Agar Plate*), MSA (*Mannitol Salt Agar*), CA (*Chrom Agar*), inkubator, dan penggaris.

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Preparasi *Original Inoculum* MRSA

Biakan MRSA, *nutrient broth* 9 ml, larutan NaCl 9 ml, tabung reaksi, pipet steril ukuran 1 ml dan 10 ml, karet penghisap, dan inkubator.

4.6.4 Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Tabung

Tabung reaksi, pipet steril ukuran 1 ml dan 10 ml, karet penghisap, inkubator, ekstrak daun sirsak, vortex, Bunsen (lampu spiritus), korek api, kapas steril, inokulum MRSA, akuades steril, dan rak kayu.

4.6.5 Alat dan Bahan untuk Uji *Streaking Plate*

Nutrient Agar Plate (NAP), ose, lampu spiritus, *colony counter*.

4.7 Rancangan Operasional Penelitian

4.7.1 Proses Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak

4.7.1.1 Proses Pengeringan (Armando, 2009; Cowan, 1999)

- Daun sirsak yang akan dikeringkan dicuci bersih
- Daun sirsak yang sudah dibersihkan, dimasukkan oven dengan suhu 80°C sampai kering atau bebas kandungan air

4.7.1.2 Proses Ekstraksi (Armando, 2009; Cowan, 1999)

- Daun sirsak yang sudah kering dihaluskan dengan blender
- Daun sirsak yang sudah halus ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik sebanyak 100 gram (sampel kering)
- Dimasukkan dalam gelas Erlenmeyer berukuran 1 liter
- Rendam dengan etanol sampai volume 900 ml
- Campuran diinapkan selama semalam sampai mengendap

4.7.1.3 Proses Evaporasi (Armando, 2009; Cowan, 1999)

- Ambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terampil
- Masukkan dalam labu evaporasi berukuran 1 liter
- Pasang labu evaporasi pada evaporator
- Isi *water bath* dengan air sampai jenuh
- Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas, *water bath* (atur sampai 90°C) kemudian sambungkan dengan aliran listrik.

- f. Biarkan etanol menguap
- g. Ditunggu proses berjalan sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 hingga 2 jam untuk satu labu)
- h. Hasil evaporasi dimasukkan dalam botol plastik kemudian disimpan di dalam *freezer*.

4.7.2 Identifikasi MRSA

Proses identifikasi MRSA terdiri dari 5 macam tahap yakni pewarnaan gram, kultur pada media NAP, uji katalase, kultur pada media MSA, dan kultur pada media CA.

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

- 1) Pengecatan gram dilakukan dengan preparat olesan bakteri MRSA difikasi pada pembakar spiritus
- 2) Kemudian ditetaskan larutan Kristal violet sebanyak 2-3 tetes selama 2 menit.
- 3) Dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan tissue
- 4) Lalu ditetaskan larutan lugol dan dibiarkan selama 20-30 detik
- 5) Kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan larutan alcohol 96% dan dibiarkan selama 30 detik
- 6) Dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan tissue. Selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan pembesar 100X
- 7) MRSA yang dicat dengan pewarnaan gram bila diamati dengan mikroskop perbesaran 100 kali, akan menunjukkan tampilan sel-sel

berbentuk bola membentuk kluster tidak beraturan (dapat berupa kokus tunggal, berpasangan, maupun membentuk gerombol rantai) dan berwarna ungu.

4.7.2.2 Kultur Pada Media NAP

Proses kultur MRSA pada media NAP melalui langkah-langkah sebagai berikut:

- 1) Bakteri MRSA yang berasal dari biakan persediaan kultur diambil menggunakan ose, kemudian dilakukan inokulasi MRSA pada media NAP
- 2) Inokulasi MRSA tersebut diinkubasikan dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- 3) Dilakukan pengamatan terhadap inokulasi MRSA dan akan didapati koloni bakteri yang berbentuk bulat, konveks dengan tepi yang rata, konsistensi yang lunak, serta memiliki pigmen warna kuning emas (pigmen warna kuning keemasan dapat terlihat lebih jelas setelah durasi 1-2 jam dari pengeluaran inokulasi dari dalam inkubator, hal ini berkaitan dengan penyesuaian suhu inokulasi terhadap suhu ruang).

4.7.2.3 Uji Katalase

Proses uji katalase dilakukan melalui langkah-langkah berikut:

- 1) Setelah dilakukan pengambilan sejumlah koloni pada agar NAP yang telah diuji pada tahap sebelumnya, kemudian dikultur pada tabung reaksi.

- 2) Pada hasil kultur tersebut, diambil sebanyak 1ml kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan *nutrient broth* 9ml pada tabung reaksi tersebut, lalu diinkubasikan selama 20 jam pada suhu 37°C.
- 3) Tabung reaksi diambil dan diletakkan pada subu ruang selama 10 menit, kemudian ditetesi larutan H₂O₂
- 4) Dilakukan pengamatan pada tabung reaksi apakah terbentuk buih-buih (reaksi dari enzim katalase yang disekresikan oleh bakteri). *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri yang mensekresikan enzim katalase.

4.7.2.4 Kultur pada media MSA (*Mannitol Salt Agar*)

Proses kultur pada media MSA dilakukan melalui langkah-langkah berikut:

- 1) Setelah dilakukan pengambilan sejumlah koloni pada agar NAP yang telah diuji pada tahap kedua, kemudian dilukur pada tabung reaksi
- 2) Pada hasil kultur langkah nomer 1, dilakukan pengambilan bakteri menggunakan ose, kemudian dilakukan inokulasi MRSA pada media MSA
- 3) Inokulasi MRSA tersebut diinkubasikan dalam inkubator selama 20 jam pada suhu 37°C
- 4) Dilakukan pengamatan terhadap inokulasi MRSA. Dari hasil pengamatan maka akan didapati koloni bakteri yang berbentuk bulat, konveks dengan tepi yang rata, konsistensi yang lunak, serta memiliki pigmen warna kuning. Diantaranya kumpulan koloni bakteri tersebut

akan nampak area bewarna kekuningan atau area terfermentasi (area bewarna kekuningan dapat terlihat lebih jelas setelah durasi 1-2 jam dari pengeluaran inokulasi dari dalam inkubator, hal ini berkaitan dengan penyesuaian suhu inokulasi suhu ruang).

4.7.2.5 Kutur pada media CA (*Chrom Agar*)

Proses kultur pada media CA dilakukan melalui langkah-langkah sebagai berikut:

- 1) Setelah dilakukan pengambilan sejumlah koloni pada agar NAP yang telah diuji pada tahap kedua, kemudian dikultur pada tabung reaksi.
- 2) Pada hasil kultur tersebut kemudian diambil bakteri menggunakan ose, kemudian dilakukan inokulasi MRSA pada media CA
- 3) Inokulasi MRSA tersebut diinkubasikan dalam incubator selama 20 jam pada suhu 37°C.
- 4) Dilakukan pengamatan terhadap inokulasi MRSA, maka akan didapati koloni bakteri yang berbentuk bulat, konveks dengan tepi yang rata, konsistensi yang lunak, serta memiliki pigmen warna merah muda (pigmen warna merah muda dapat terlihat lebih jelas setelah durasi 1-2 jam dari pengeluaran inokulasi dari dalam incubator, hal ini berkaitan dengan penyesuaian dengan suhu ruang).

4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Koloni Bakteri Kepadatan 10^6 Bakteri/ml

- Koloni MRSA pada medium MH *broth* diambil, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril berisi MH *broth*

- Tabung reaksi diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- Kepadatan bakteri (OD = *Optical Density*) diukur dengan spektrofotometri pada tabung reaksi dengan panjang gelombang 625 nm. Untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10⁸ CFU/ml yang setara dengan OD = 0,1 (Murray *et al.*, 1999) maka dilakukan perhitungan sebagai berikut:

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

Keterangan:

N₁ = Hasil spektrofotometri

V₁ = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengencer

N₂ = OD (0,1 setara dengan 10⁸)

V₂ = Volume suspensi bakteri uji (10mL)

- Sehingga diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10⁸/ml sebanyak 10 ml
- Dari 10 ml bakteri dengan konsentrasi 10⁸CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml aquades sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10⁷ CFU/ml.
- Diambil 1 ml larutan dengan konsentrasi bakteri 10⁷ CFU/ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml aquades sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10⁶ CFU/ml

4.7.4 Uji Sensitivitas Antimikroba

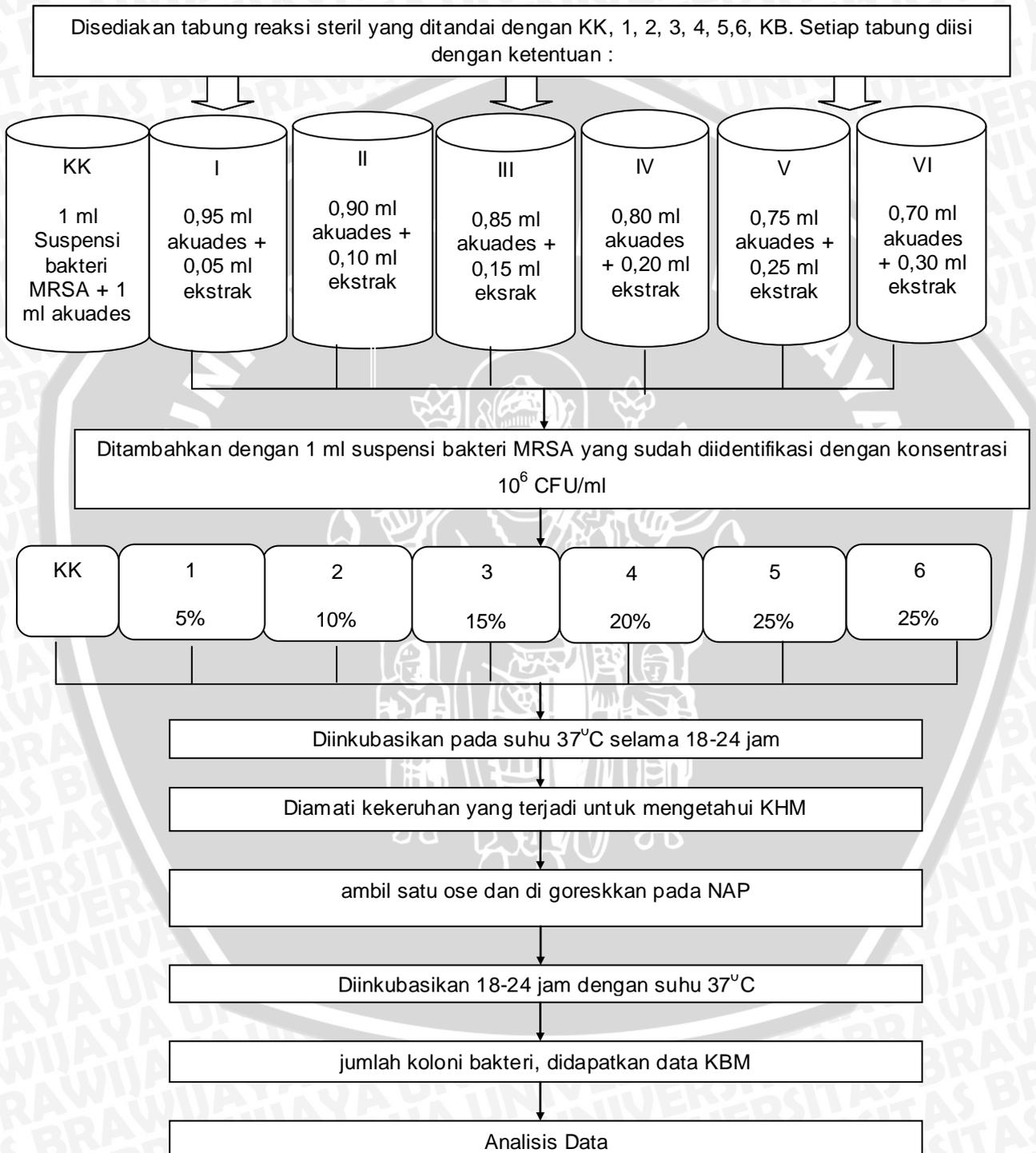
Uji sensitivitas antimikroba terhadap MRSA menggunakan metode dilusi tabung. Prosedur metode dilusi tabung menurut Murray *et al*, (1999) adalah sebagai berikut:

- a. Masing-masing tabung steril di beri label konsentrasi ekstrak yang telah ditentukan
- b. Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan jumlah tertentu dimasukkan ke tabung sesuai konsentrasi yang telah ditentukan
- c. Kemudian ditambahkan aquades ke dalam masing-masing tabung pada konsentrasi ekstrak tertentu sehingga campuran antara jumlah ekstrak dan aquades berjumlah 1 ml
- d. Ke dalam masing-masing tabung, dimasukkan 1 ml suspensi bakteri dengan kepadatan 10^6 bakteri/ml. Dengan demikian dalam 1 tabung berisi total larutan sebanyak 2 ml.
- e. 2 tabung masing-masing sebagai kontrol positif / kontrol kuman (KK) berisi suspensi bakteri tanpa ekstrak, dengan proporsi bakteri 1 ml + aquades 1 ml dan Kontrol negatif / kontrol bahan (KB) berisi konsentrasi ekstrak 100% tanpa biakan maupun aquades
- f. Semua tabung diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam
- g. Keesokan harinya, dari masing-masing tabung diambil sebanyak 1 ose kemudian ditanam (digoreskan) pada NAP, kemudian dieramkan pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan esok harinya dilihat ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri

- h. Dihitung jumlah koloni pada NAP untuk masing-masing konsentrasi ekstrak, kemudian dilakukan analisis



4.7.5 Skema Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian



4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh untuk uji statistik adalah konsentrasi daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan jumlah koloni MRSA. Jika sebaran data normal dan varians sama maka dipilih uji one way ANOVA. Jika tidak memenuhi syarat diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya sebaran menjadi normal dan varian menjadi sama. Jika variabel hasil transformasi tidak berdistribusi normal atau varians tetap tidak sama, maka dipilih uji Kruskal-Wallis (Setianingsih, 2012).

Analisis statistik dilakukan dengan program SPSS (*Statistic Product of Service Solution*) versi 20.0 dengan signifikansi 0,05%. Hipotesis dilakukan melalui H_0 diterima bila nilai signifikansi yang diperoleh $p > 0,05$ sedangkan H_0 ditolak bila nilai signifikansi yang diperoleh $p < 0,05$. Adapun H_0 dari penelitian ini adalah tidak ada perbedaan efek antimikroba pada pemberian ekstrak etanol daun sirsak antara setiap perlakuan terhadap jumlah koloni bakteri MRSA yang dihasilkan pada medium NAP. Sedangkan H_1 adalah terdapat perbedaan efek antimikroba pemberian ekstrak etanol daun sirsak antara setiap perlakuan terhadap jumlah koloni MRSA yang dihasilkan pada medium NAP.

Bila pada uji ANOVA atau Kruskal-Wallis menghasilkan nilai $p < 0,05$, dilanjutkan dengan analisis post hoc. Analisis post hoc untuk ANOVA adalah uji Tuckey, sedangkan untuk Kruskal-Wallis adalah uji Mann-Whitney. Analisis post hoc bertujuan untuk mengetahui perlakuan mana yang menyebabkan jumlah koloni bakteri MRSA menunjukkan perbedaan yang bermakna dan tidak bermakna. Setelah itu diteruskan dengan uji korelasi regresi dimana menggunakan uji Spearman atau uji Pearson. Hal

tersebut bertujuan mengetahui keerataan hubungan pemberian perlakuan ekstrak etanol daun sirsak dengan jumlah koloni bakteri MRSA serta uji regresi, untuk mengetahui arah hubungan tersebut (Setianingsih, 2012).

