

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Penelitian dilakukan dengan rancangan *true experimental* untuk mengetahui pengaruh ekstrak mahkota bunga mawar (*Rosa indica*) terhadap pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Desain penelitian ini adalah *post-test only control group design* dengan menggunakan metode *tube-test*.

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan dosis 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35% yang ditentukan berdasarkan uji eksplorasi pada penelitian sebelumnya.

4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel *S. aureus* pembentuk biofilm. Sampel ini diperoleh dari isolat *S. aureus* pembentuk biofilm yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah pengulangan penelitian dihitung dengan rumus sebagai berikut (Notobroto, 2005):

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

$$(6-1) (n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak mahkota bunga mawar): 0% (kontrol), 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35% = 6 perlakuan

Berdasarkan hasil penghitungan menggunakan rumus tersebut, minimal harus dilakukan 4 kali pengulangan pada penelitian ini.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak mahkota bunga mawar. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 0% (kontrol), 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35% yang ditentukan berdasarkan uji eksplorasi pada penelitian sebelumnya.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pembentukan biofilm oleh *S. aureus* yang diukur dengan metode *test-tube*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2013 sampai dengan bulan Agustus 2013 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan bubuk mahkota bunga mawar dilakukan di Matera Medika Batu dan pembuatan ekstrak cairnya dilakukan di Politeknik Negeri Malang.

4.5 Definisi Operasional

1. *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif yang memiliki hasil tes katalase positif dan tes koagulase positif. *S. aureus* yang dipakai dalam penelitian ini diambil dari isolat *swab* tenggorok stok kultur Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan telah terbukti dapat membentuk biofilm setelah diidentifikasi dengan medium *Congo Red Agar*.
2. *S. aureus* pembentuk biofilm merupakan bakteri yang mempunyai kemampuan untuk menghasilkan biofilm sehingga bakteri tersebut memiliki kemampuan bertahan hidup lebih tinggi. Uji penghambatan pembentukan biofilm yang digunakan pada penelitian ini adalah metode *tube-test*
3. Ekstrak mahkota bunga mawar adalah hasil ekstraksi cair mahkota bunga mawar dengan pelarut etanol 96%. Etanol digunakan karena aman dan dapat digunakan untuk melarutkan senyawa organik yang bersifat non polar atau tak larut air. Mahkota bunga mawar basah yang digunakan sebanyak 1 kilogram yang kemudian dihaluskan menjadi 100 gram bubuk mahkota bunga mawar, dan selanjutnya akan diekstrak. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Mahkota bunga mawar berasal dari kota Batu milik Materia Medika. Bunga ini memiliki berbagai macam warna dan memiliki kandungan yang dapat menghambat biofilm. Bunga dipilih yang muda, segar, sehat, dan berasal dari satu wilayah.
4. Metode *tube-test* atau metode tabung adalah metode deteksi biofilm dengan menggunakan tabung sebagai medium yang bersifat kualitatif.

5. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi ekstrak mahkota bunga mawar terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* yang ditandai dengan tidak tampaknya bentukan cincin dan lapisan ungu kebiruan pada dinding atau dasar tabung.
6. *Mean Gray Value* adalah skala intensitas warna pada program *Adobe Photoshop CS3*. Skala berkisar antara 0 – 255. Angka mendekati 0 menunjukkan kepekatan warna yang tinggi. Sedangkan angka mendekati 255 menunjukkan kepekatan warna yang rendah.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Mahkota Bunga Mawar

Mahkota bunga mawar yang digunakan adalah yang segar, sehat, dan muda. Oven digunakan untuk mengeringkan mahkota bunga mawar sebelum dihaluskan menjadi bubuk dengan blender. Sebanyak 100 gram bubuk tersebut dibungkus dalam kertas saring, kemudian direndam dalam etanol 96% sebanyak 600 mL selama semalam dalam gelas ukur. *Evaporator set* digunakan untuk memisahkan etanol dari ekstrak. *Evaporator set* terdiri dari *rotary evaporator*, tabung pendingin, pemanas air, dan labu penampung berukuran 250 ml yang digunakan untuk menampung uap etanol yang terkondensasi.

4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

Isolat *S. aureus* diidentifikasi dengan beberapa tes. NAP (*Natrium Agar Plate*) digunakan untuk melihat warna koloni yang terbentuk. Tes katalase menggunakan H_2O_2 3% dalam tabung reaksi untuk melihat pembentukan gelembung oleh bakteri. Tes koagulase menggunakan plasma darah dengan EDTA untuk melihat zona hemolisis bakteri. Pengecatan Gram dengan kristal

violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin dilakukan untuk menentukan apakah bakteri merupakan bakteri Gram positif atau Gram negatif. Sediaan pada kaca objek untuk pengecatan Gram dilihat di bawah mikroskop setelah diberi minyak imersi. Ose digunakan untuk membuat hapusan sediaan pada kaca objek, dan lampu spiritus digunakan untuk fiksasi hapusan.

4.6.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

Penelitian ini menggunakan biakan cair *S. aureus* pembentuk biofilm yang ditanam pada medium *Trypticase Soy Broth* (TSB) dengan 1% glukosa (TSBglu) di dalam tabung reaksi dengan menggunakan pipet. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dengan pH 7,3 digunakan untuk mencuci tabung setelah suspensi diinkubasi dalam inkubator. Kristal violet digunakan sebagai pewarna pada tabung untuk melihat pembentukan biofilm. Aquades digunakan untuk membersihkan sisa kristal violet.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Ekstraksi dan Evaporasi Mahkota Bunga Mawar

Mahkota bunga mawar dicuci dari kotoran, ditiriskan, dikeringkan, lalu ditimbang. Pengeringan dilakukan dengan sinar matahari atau udara. Mahkota bunga mawar kering ditumbuk halus menjadi bubuk lalu ditimbang dalam neraca analitik seberat 100 gram. Hasil tumbukan dibungkus menggunakan kertas saring dan direndam dalam etanol 96% selama semalam. Etanol 96% yang digunakan untuk merendam diganti beberapa kali sampai larutan ekstrak jernih. Kemudian hasil ekstraksi siap untuk dievaporasi. *Evaporator set* dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas, yaitu alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator*, dan tabung pendingin. Kemudian tabung

pendingin dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui pipa plastik. Tabung pendingin juga harus terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan. Bubuk yang telah dicampur etanol dimasukkan dalam labu penampung, sedangkan *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin, dan alat pompa vakum dinyalakan. Pemanas aquades dinyalakan pada suhu 65⁰ C (titik didih etanol) sehingga campuran dalam tabung penampung evaporasi tersebut mendidih dan etanol mulai menguap. Etanol yang telah menguap dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil akhir ekstraksi yang berupa cairan sisa di dalam labu penampung.

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

Kaca objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak atau pencemar lain. Setelah dingin, sediaan dibuat sedemikian rupa sehingga tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis dengan meneteskan satu ose aquades steril pada kaca objek. Sedikit biakan kuman diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquades pada kaca objek tadi dan diratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades. Sediaan dibiarkan hingga kering di udara, kemudian difiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api satu atau dua kali.

2. Pewarnaan Gram

Sediaan bakteri pada kaca objek diberi kristal violet selama 1 menit, lalu sisa kristal violet dibuang dan kaca objek dibilas dengan air. Kemudian sediaan

diberi lugol selama 1 menit, lalu sisa lugol dibuang dan kaca dibilas dengan air. Setelah itu, alkohol 96% diteteskan selama 5-10 detik pada sediaan atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol langsung dibuang setelah 10 detik dan kaca dibilas dengan air. Sediaan diberi safranin selama 30 detik, lalu sisa safranin dibuang dan kaca kembali dibilas dengan air. Kaca objek dikeringkan dengan kertas penghisap lalu diberi minyak imersi. Setelah itu sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100 kali. *S. aureus* menunjukkan gambaran seperti anggur bergerombol (kokus) dan berwarna biru keunguan (Gram positif).

B. Tes Katalase (*Health Protection Agency, 2010*)

Sebanyak 0,2 mL H₂O₂ 3 % dituangkan ke dalam tabung reaksi. Biakan bakteri diambil dengan ose lalu diusapkan pada dinding tabung di atas permukaan cairan. Tabung reaksi ditutup, lalu digoyangkan hingga cairan H₂O₂ dapat mengenai usapan biakan bakteri. Kemudian pembentukan gelembung diamati dalam waktu 10 detik. Hasil disebut positif bila ada gelembung, dan hasil disebut negatif bila tidak ada gelembung. Hasil positif menunjukkan bahwa bakteri adalah *Staphylococcus sp.* Hasil negatif menunjukkan bahwa bakteri adalah *Streptococcus sp.*

C. Tes Koagulase (*Forbes et al, 2007*)

Sebanyak satu ose plasma darah dengan EDTA diteteskan pada kaca objek yang kering dan bersih (kaca objek A). Sedangkan air distilasi/air salin diteteskan pada kaca objek B sebagai kontrol. Sedikit biakan kuman ditambahkan menggunakan ose pada masing-masing kaca objek dan diratakan perlahan selama 5-10 detik. Hasil positif bila terjadi penggumpalan dalam waktu 10 detik atau kurang pada kaca objek A dan tidak ada penggumpalan pada kaca

objek B. Sedangkan hasil negatif bila tidak ada penggumpalan pada kedua kaca objek. Hasil positif menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah *S. aureus*. Sedangkan jika hasil negatif menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah *Staphylococcus* koagulase negatif.

4.7.2.2 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

S. aureus yang sudah ditanam dalam medium *Nutrient Agar Plate* (NAP) dikultur dalam medium *Nutrient Broth* (NB) selama 24 jam dalam inkubator 37°C. Kemudian suspensi bakteri tersebut diukur spektrofotometri dengan panjang gelombang (λ) 610 nm, sehingga diketahui kepadatan bakterinya (OD = *Optical density*) yang setara dengan kepadatan bakteri 10^8 bakteri/mL. Kemudian dengan rumus pengenceran $M1 \times V1 = M2 \times V2$, kepadatan bakteri tersebut ditambahkan ke medium TSBglu. Dasar penghitungannya sebagai berikut:

- Apabila diperoleh OD bakteri hasil spektrofotometri = 0,38 (M1)
OD bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/mL = 0,1 (M2)
Volume keseluruhan dalam satu tabung = 10 mL (V2)
$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$
$$0,38 \times V1 = 0,1 \times 10$$
$$V1 = 1/0,38 = 2,63 \text{ mL}$$
- Suspensi bakteri sebanyak 2,63 ml ditambah dengan 7,37 ml TSBglu menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/ml.

4.7.2.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (Christensen *et al.*, 2000)

S. aureus yang sudah teridentifikasi ditanam pada *Nutrient Broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Bakteri yang sudah tumbuh pada medium tersebut ditanam kembali pada NAP (sebanyak 40 μ L) dan diinkubasi pada suhu

37°C semalam. Mikroba kultur semalam tadi dimasukkan ke tabung TSBglu (10 mL) dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam. Lalu tabung di cuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan aquades. Tabung dikeringkan dan dilihat pembentukan biofilmnya.

4.7.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Sebanyak 11 tabung steril diperlukan dalam satu kali pengulangan, dengan rincian 5 tabung kecil untuk membuat larutan ekstrak dan 6 tabung besar untuk mencampurkan larutan ekstrak dengan biakan bakteri dalam TSBglu. Konsentrasi ekstrak mahkota bunga mawar pada masing-masing tabung kecil adalah sebesar 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35%. Perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi bakteri 1×10^8 CFU/mL digunakan untuk membuat suspensi bakteri dalam medium TSBglu sesuai hasil OD dari spektrofotometri. Tabung besar 1-5 diisi dengan suspensi bakteri dalam medium TSBglu sebanyak 2 mL, sedangkan untuk tabung besar 6 diisi sebanyak 4 mL. Larutan ekstrak sebanyak 2 mL dalam tiap tabung kecil dimasukkan ke dalam tabung besar 1-5 sehingga didapatkan larutan sebanyak 4 mL dalam tiap tabung. Seluruh tabung diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah 24 jam, tabung dikeluarkan dari inkubator dan dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) kira-kira 0,5 mL, lalu setelah 20 menit kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan aquades. Tabung dikeringkan, lalu biofilm yang terbentuk diamati dan dicatat.

4.7.4 Pengukuran Mean Gray Value

Hasil pembentukan biofilm pada tabung difoto dengan menggunakan kamera digital. Untuk mengetahui intensitas warna pada daerah cincin dan

dinding tabung, digunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS3*. Langkah-langkahnya adalah dengan membuka program *Photoshop CS3*, pilih *File* dan masukkan hasil fotonya. Lalu pilih *tab Window* dan pilih *Measurement Log*, pilih daerah yang akan dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool*, lalu klik *Record Measurements*, maka akan didapatkan nilai *Mean Gray Value* yang merupakan rata-rata dari intensitas warna pengecatan tabung.

4.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah Uji *One Way ANOVA* dan Uji Korelasi *Pearson*. Uji *One Way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh antara berbagai konsentrasi ekstrak mahkota bunga mawar terhadap intensitas warna yang ditimbulkan oleh biofilm pada tabung (*Mean Gray Value*). Sedangkan Uji Korelasi *Pearson* digunakan untuk mengetahui hubungan antara masing-masing konsentrasi ekstrak mahkota bunga mawar terhadap intensitas warna biofilm pada tabung (*Mean Gray Value*). Analisis data menggunakan program *SPSS (Statistical Product of Service Solution)* versi 13.0

4.9 Rancangan Operasional Penelitian

