

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan penelitian eksperimental dengan desain *post test control group* yang menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun beringin yang dapat memberikan efek antibakteri terhadap *MRSA* secara *in vitro*. Metode ini meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada media *NB* untuk menentukan KHM, dan tahap penggoresan pada media *NAP* untuk mengetahui KBM. Pada penelitian ini dibuat 2 kelompok, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan yaitu kelompok bakteri yang diberi ekstrak daun beringin. Sedangkan kelompok kontrol yaitu kelompok bakteri yang tidak diberi ekstrak daun beringin atau konsentrasi 0%. Data hasil penelitian diambil pada akhir penelitian.

4.2 Sampel dan Estimasi Jumlah Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan isolat bakteri *MRSA* dengan kepadatan 10^6 CFU/ml yang dikembangbiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Penelitian menggunakan 7 konsentrasi (6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, dan 12%) ekstrak daun beringin dan 1 kelompok kontrol *MRSA* tanpa diberi ekstrak sehingga ada 8 kelompok. Berdasarkan rumus berikut, p adalah jumlah kelompok, dan n adalah jumlah pengulangan, maka : (Notobroto, 2005).

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

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,142 = 4$$

Jadi dari hasil perhitungan di atas, untuk memenuhi persyaratan uji statistik, diperlukan empat kali ulangan untuk sampel.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat : Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Waktu : September 2013 - Desember 2013

4.4 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel tergantung.

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun beringin (*Ficus benjamina* L.) yang dibuat dalam konsentrasi tertentu.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *MRSA*.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Daun beringin yang digunakan adalah daun beringin hijau yang dibeli dari Materia Medika, Batu, Malang, lalu setelah dibersihkan dengan cara

dicuci dengan air bersih yang mengalir, dipotong-potong lalu dikeringkan dengan oven (suhu 40-50°C) selama lima hari.

4.5.2 Ekstrak daun beringin didapatkan dengan metode maserasi daun beringin dengan pelarut etanol 96%.

4.5.3 Isolat *MRSA* yang digunakan adalah galur *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik *methicillin* yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, berusia antara 18-24 jam. Sebelumnya, *MRSA* telah diuji dengan pewarnaan Gram, uji katalase dan koagulase, serta tes kepekaan dengan difusi cakram *cefoxitin / methicillin*.

4.5.4 Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi ekstrak daun beringin terendah yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *MRSA* yang ditandai dengan kejernihan di dalam tabung.

4.5.5 Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi ekstrak daun beringin terendah yang mampu membunuh bakteri *MRSA* yang dapat dilihat dari ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada *agar plate* atau jumlah koloni kurang dari 0,1% dari jumlah koloni pada *original inoculum*.

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Beringin

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun beringin (*Ficus benjamina* L.) adalah pisau, timbangan analitik, kertas saring, tabung reaksi, oven (Memmert), labu erlenmeyer, saringan, gelas ukur, blender dan *rotary vacuum evaporator*. Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun beringin adalah daun beringin (*Ficus benjamina* L.), etanol 96%, dan *aquadest* steril.

4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi dan Tes Kepekaan Bakteri *MRSA*

Alat yang digunakan untuk identifikasi dan tes kepekaan bakteri *MRSA* adalah cawan petri, ose, tabung reaksi, labu erlenmeyer, termometer, inkubator, gelas obyek, *cover glass*, pembakar Bunsen, korek api, spidol permanen, pipet steril 10 ml, mikroskop, penggaris plastik, dan *colony counter*.

Bahan yang digunakan untuk identifikasi dan tes kepekaan bakteri *MRSA* adalah pewarnaan Gram (larutan lugol, safranin, *aquadest* steril, *crystal violet*), minyak imersi, H_2O_2 3%, serum plasma kelinci, dan cakram *methicillin / cefoxitin*.

4.6.3 Alat dan Bahan Uji Kepekaan Bakteri *MRSA* terhadap Ekstrak Daun Beringin

Alat yang digunakan untuk uji kepekaan bakteri *MRSA* terhadap ekstrak daun beringin terdiri dari tabung reaksi steril, cawan petri, ose, mikropipet 1 ml, pembakar Bunsen, inkubator, label, *vortex*, *blue tip*, *colony counter* dan spektrofotometer.

Bahan yang digunakan dalam uji efek antibakteri ekstrak daun beringin terhadap *MRSA* terdiri dari perbenihan cair *MRSA*, ekstrak etanol daun beringin, *Nutrient broth*, NAP, Standar Mc Farland 0.5, dan *aquadest* steril.

4.7 Metode Pengumpulan Data dan Prosedur Penelitian

4.7.1 Identifikasi Bakteri

Untuk dapat mengidentifikasi bakteri *MRSA*, pertama-tama harus dilakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu dengan menanam bakteri yang diduga *MRSA* pada media *Nutrient Agar Plate (NAP)*, diinkubasikan di dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, lakukan uji identifikasi

bakteri dengan pewarnaan Gram, tes katalase, tes koagulase, dan tes kepekaan bakteri *MRSA* terhadap *methicillin* / *cefoxitin* dengan metode difusi cakram.

a. Pewarnaan Gram

Langkah-langkah melakukan pewarnaan Gram adalah sebagai berikut:

- Bersihkan gelas obyek dengan kapas steril. Lewatkan beberapa kali di atas api untuk menghilangkan lemak, lalu biarkan dingin.
- Teteskan satu tetes *aquades* steril atau larutan *saline* di atas gelas obyek.
- Dengan menggunakan ose yang sudah disterilkan dengan cara dibakar di atas api sampai berpijar, ambillah sedikit koloni *MRSA* yang tumbuh pada media padat. Suspensikan dengan satu tetes *aquades* steril atau larutan *saline* yang telah ditetaskan terlebih dahulu di atas gelas obyek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.
- Hapusan dibiarkan kering di udara, lalu difiksasi dengan cara melewatkan sediaan sebanyak tiga kali di atas api. Sediaan siap untuk diwarnai.
- Tuangi sediaan dengan *crystal violet* lalu biarkan selama 1 menit. Buang sisanya, dan bilas dengan air.
- Tuangi sediaan dengan lugol, biarkan selama 1 menit, lalu buang sisanya dan bilas dengan air.
- Tuangi sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna catnya luntur, kemudian buang sisanya dan bilas dengan air.
- Tuangi sediaan dengan safranin, biarkan selama 30 detik, kemudian buang sisa safranin dan bilas dengan air.
- Keringkan sediaan dengan kertas penghisap.

- Amati sediaan di bawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran lensa obyektif 100x. Hasil positif apabila nampak *MRSA* tercat ungu.

b. Tes Katalase

Tes katalase dilakukan untuk membedakan *Staphylococcus* dengan *Streptococcus*. Tes ini dilakukan dengan cara menambahkan larutan H_2O_2 3% sebanyak 1-2 tetes atau secukupnya pada perbenihan cair. Cara lainnya yaitu dengan mengambil 1 koloni bakteri pada kaca objek, dan ditetesi larutan H_2O_2 3% secukupnya, kemudian diamati. Pada *Staphylococcus*, hasil tes katalase positif yang ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara.

c. Tes Koagulase

Tes koagulase dilakukan untuk membedakan *S.aureus* dengan spesies *Staphylococcus* lainnya dan untuk menentukan patogenitasnya. *S. aureus* bersifat koagulase positif. Tes ini dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu koagulase slide dan koagulase tabung. Pada kaca objek ditetesi dengan 1 tetes larutan *saline* atau *aquadest* steril dan ditambahkan 1 koloni bakteri kemudian ditambah dengan 1 tetes plasma darah dan dicampur dengan cara menggoyangkan kaca objek arah melingkar selama 5-10 detik. Hasilnya dinyatakan positif apabila terbentuk gumpalan-gumpalan putih. Apabila hasilnya negatif, maka harus dilakukan koagulase tabung guna memastikan jenis *Staphylococcus*. Caranya dengan menggunakan plasma kelinci dan pemeriksaan dilakukan setelah masa inkubasi selama 4 jam dan 24 jam. Apabila hasil tes pada 4 jam negatif, maka harus diulang dengan diinkubasi selama 24 jam.

d. Uji Kepekaan terhadap *Methicillin* / *Cefoxitin* (*Disc Diffusion Method*)

Tes uji kepekaan terhadap *methicillin* dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri lebih lanjut. Caranya adalah dengan metode difusi cakram menggunakan cakram antibiotik *cefoxitin* konsentrasi 30 μ g. Beberapa hal yang harus diingat adalah jarak cakram dari tepi *plate* tidak kurang dari 15 mm, jarak cakram dengan cakram lainnya tidak kurang dari 24 mm, cakram harus diletakkan agak ditekan supaya menempel pada media agar, dan sekali cakram sudah ditempelkan pada agar, tidak boleh dipindah-pindahkan. Setelah cakram *cefoxitin* terpasang, *plate* diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Menurut standar kepekaan antimikroba yang ditetapkan oleh CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) tahun 2009, bakteri dikatakan resisten terhadap *methicillin* apabila diameter zona hambat pada cakram *cefoxitin* 30 μ g \leq 21 mm dan \leq 16 mm pada cakram *cefoxitin* 10 μ g.

4.7.2 Pembuatan Standar McFarland 0,5

Standar McFarland 0,5 dibuat dengan cara memasukkan 85 ml larutan H₂SO₄ 1% ke dalam gelas ukur 100 ml. Dengan menggunakan pipet volumetrik, tambahkan 0,5 ml larutan barium klorida (BaCl₂) 1%, sambil memutar gelas ukur secara konstan. Tambahkan dengan larutan H₂SO₄ hingga volume mencapai 100 ml. Aduk campuran selama 3-5 menit sambil diamati, hingga campuran homogen dan bebas gumpalan. Periksa *optical density* larutan standar dengan menggunakan spektrofotometri. Ambil sejumlah kecil larutan, masukkan dalam kuvet bening, masukkan di spektrofotometri dan baca dengan panjang gelombang 625 nm. Rentang absorbansi untuk standar McFarland 0,5 adalah 0,08-0,1 OD. Bila sudah sesuai, masukkan larutan standar ke tabung kaca bertutup rapat sesuai volume yang biasa digunakan untuk pemeriksaan. Beri

label tanggal kadaluarsa, tutup tabung dengan rapat dan segel tabung dengan paraffin. Simpan standar di tempat gelap, pada suhu ruang selama 3 bulan atau lebih, tergantung pada kontrol kualitas standar (dengan spektrofotometri ulang sebelum dipakai) (SMILE, 2009).

4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Uji Bakteri *MRSA*

Dilakukan pemeriksaan spektrofotometri hasil kultur media cair *NB* dengan panjang gelombang 625 nm untuk memperkirakan jumlah bakteri pada perbenihan cair. Dari pemeriksaan spektrofotometri, didapatkan nilai absorbansi larutan atau *optical density* (OD) yang ekuivalen dengan kepadatan bakteri tertentu. Misalnya apabila didapatkan OD = 0,1, maka ekuivalen dengan kepadatan bakteri 10^8 Colony Forming Unit / ml atau 10^8 CFU/ml). Sedangkan jika OD masih lebih besar daripada 0,1 berarti harus diencerkan lagi dengan larutan NaCl 9% sejumlah tertentu. Misalnya, untuk membuat suspensi uji dengan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml, dari suspensi awal yang memiliki OD = 0,5 maka dilakukan penghitungan sebagai berikut :

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

$$0,5 \times V_1 = 0,1 \times 10$$

$$V_1 = 1/0,5$$

$$V_1 = 2$$

Keterangan :

V_1 = volume bakteri yang akan ditambah pengencer (ml)

N_1 = nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V_2 = volume bakteri suspensi uji (10 ml)

N_2 = nilai absorbansi 0,1 yang setara dengan jumlah bakteri 10^8 CFU/ml

Jadi, menurut perhitungan diatas, untuk mendapatkan suspensi dengan kepadatan 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml, dibutuhkan 2 ml suspensi awal untuk dicampur dengan 8 ml larutan NaCl 9% sebagai pengencer. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml, selanjutnya

dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali menggunakan larutan NaCl 9% sehingga diperoleh suspensi bakteri sebanyak 10 ml dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml yang siap digunakan untuk penelitian.

4.7.4 Pembuatan Ekstrak Daun Beringin

Ekstrak daun beringin dibuat dari daun beringin hijau (*Ficus benjamina* L.) dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, diulang dua kali, lalu hasilnya dikondensasikan dengan *rotary vacuum evaporator* untuk mendapatkan ekstrak yang kental. Sampel basah diambil dari daun beringin hijau segar sebanyak 2 kilogram. Kemudian sampel dibersihkan dan dicuci dengan air bersih, lalu dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 60°C selama lima hari untuk mengurangi kadar air. Sampel harus dikeringkan dahulu sebelum digunakan untuk ekstraksi karena kadar air yang tinggi pada bahan sampel bisa mengurangi konsentrasi zat terlarut dengan pelarut, juga menyebabkan pembusukan produk metabolit sekunder (Permatasari, 2011). Selanjutnya sampel kering digiling menggunakan blender, dan dimasukkan ke dalam labu kocok dan diberi pelarut etanol 96%, sebanyak 1500 ml, didiamkan selama dua hari pada suhu ruang sambil sesekali diaduk-aduk. Pada hari berikutnya, maserat dipisahkan, dan kembali ditambahkan pelarut baru sebanyak 600 ml, lalu didiamkan selama 24 jam. Hari berikutnya, maserat dipisahkan, dan ditambahkan pelarut baru sebanyak 600 ml lalu kembali didiamkan selama 24 jam. Keesokannya, maserat diambil dan simplisia dibuang. Semua maserat dikumpulkan dan dievaporasikan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu rendah (60°C) selama 2 jam. Didapatkan hasil ekstraksi kental sebanyak 80 ml. Hasil ekstraksi ini diasumsikan sebagai konsentrasi 100%, dan disimpan di lemari es sebelum digunakan untuk uji kepekaan.

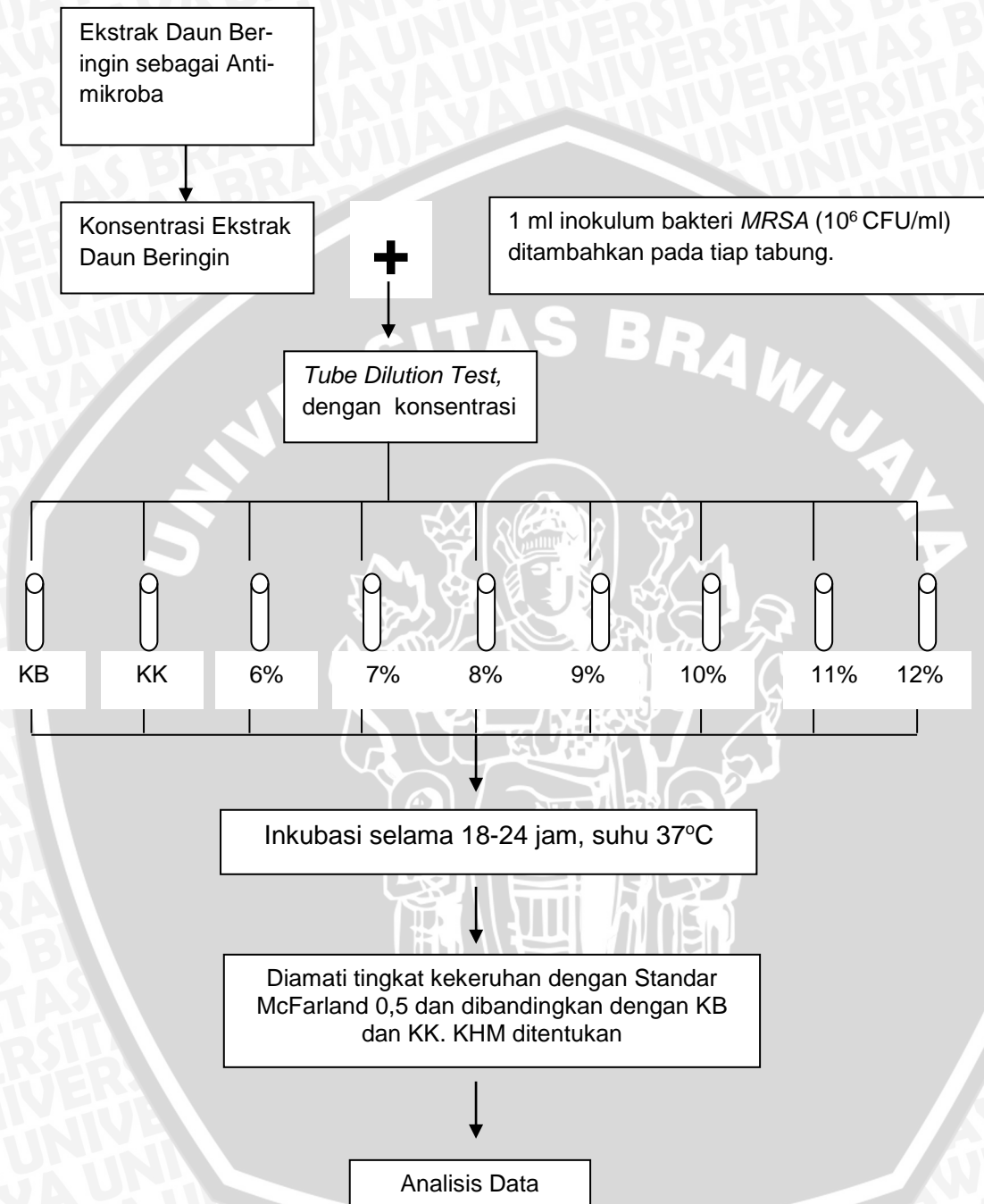
4.7.5 Uji Kepekaan Bakteri *MRSA* terhadap Ekstrak Daun Beringin

- a. Siapkan 28 buah tabung steril (untuk 4 kali pengulangan), beri tanda 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, dan 12%. Siapkan juga 2 tabung steril, beri tanda KB (kontrol bahan) dan KK (kontrol kuman – 0%). Kontrol bahan adalah ekstrak daun beringin 50% tanpa diberi bakteri *MRSA*. Konsentrasi ekstrak 0% adalah biakan *MRSA* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml dalam media *NB*.
- b. Masukkan 0,06 ml ekstrak pekat ke dalam tabung 6%, tambahkan 0,94 ml *aquadest* steril hingga volumenya menjadi 1 ml. Tambahkan 1 ml suspensi bakteri *MRSA*, *vortex* agar menjadi homogen.
- c. Masukkan 0,07 ml ekstrak pekat ke dalam tabung 7%, tambahkan 0,93 ml *aquadest* steril hingga volumenya menjadi 1 ml. Tambahkan 1 ml suspensi bakteri *MRSA*, *vortex* agar menjadi homogen.
- d. Masukkan 0,08 ml ekstrak pekat ke dalam tabung 8%, tambahkan 0,92 ml *aquadest* steril hingga volumenya menjadi 1 ml. Tambahkan 1 ml suspensi bakteri *MRSA*, *vortex* agar menjadi homogen.
- e. Masukkan 0,09 ml ekstrak pekat ke dalam tabung 9%, tambahkan 0,91 ml *aquadest* steril hingga volumenya menjadi 1 ml. Tambahkan 1 ml suspensi bakteri *MRSA*, *vortex* agar menjadi homogen.
- f. Masukkan 0,1 ml ekstrak pekat ke dalam tabung 10%, tambahkan 0,9 ml *aquadest* steril hingga volumenya menjadi 1 ml. Tambahkan 1 ml suspensi bakteri *MRSA*, *vortex* agar menjadi homogen.
- g. Masukkan 0,11 ml ekstrak pekat ke dalam tabung 11%, tambahkan 0,89 ml *aquadest* steril hingga volumenya menjadi 1 ml. Tambahkan 1 ml suspensi bakteri *MRSA*, *vortex* agar menjadi homogen.

- h. Masukkan 0,12 ml ekstrak pekat ke dalam tabung 12%, tambahkan 0,88 ml *aquadest* steril hingga volumenya menjadi 1 ml. Tambahkan 1 ml suspensi bakteri *MRSA*, *vortex* agar menjadi homogen.
- i. Masukkan 2 ml suspensi bakteri cair *MRSA* ke dalam tabung 0%.
- j. Masukkan 1 ml ekstrak pekat ke dalam tabung kontrol bahan (KB). Tambahkan 1 ml *aquadest* steril sehingga volumenya menjadi 2 ml.
- k. Ulangi percobaan sampai 4 kali.
- l. Semua tabung diinkubasikan pada suhu 37°-37,5°C selama 18-24 jam.
- m. Setelah 18-24 jam, perhatikan dan catat derajat kekeruhan pada semua tabung. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan selembar kertas putih yang telah ditandai dengan sebuah garis hitam, di belakang tabung, kemudian amati garis hitam tersebut dari arah depan tabung. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.
- n. Kemudian, menggunakan mikropipet, ambil 10⁻³ml dari tiap-tiap tabung reaksi, tanam pada NAP dan diinkubasikan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.
- o. Setelah 18-24 jam, hitung jumlah koloni *MRSA* yang tumbuh dengan *colony counter*. Konsentrasi terendah dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% *original inoculum* adalah KBM.
- p. Dibuat grafik pengaruh ekstrak selada air dalam berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan koloni bakteri *MRSA*.
- q. Dibuat analisis dan kesimpulan mengenai data yang diperoleh dari hasil percobaan yang dilakukan.

4.8 Alur Kerja Penelitian

Tahap I : Penentuan KHM



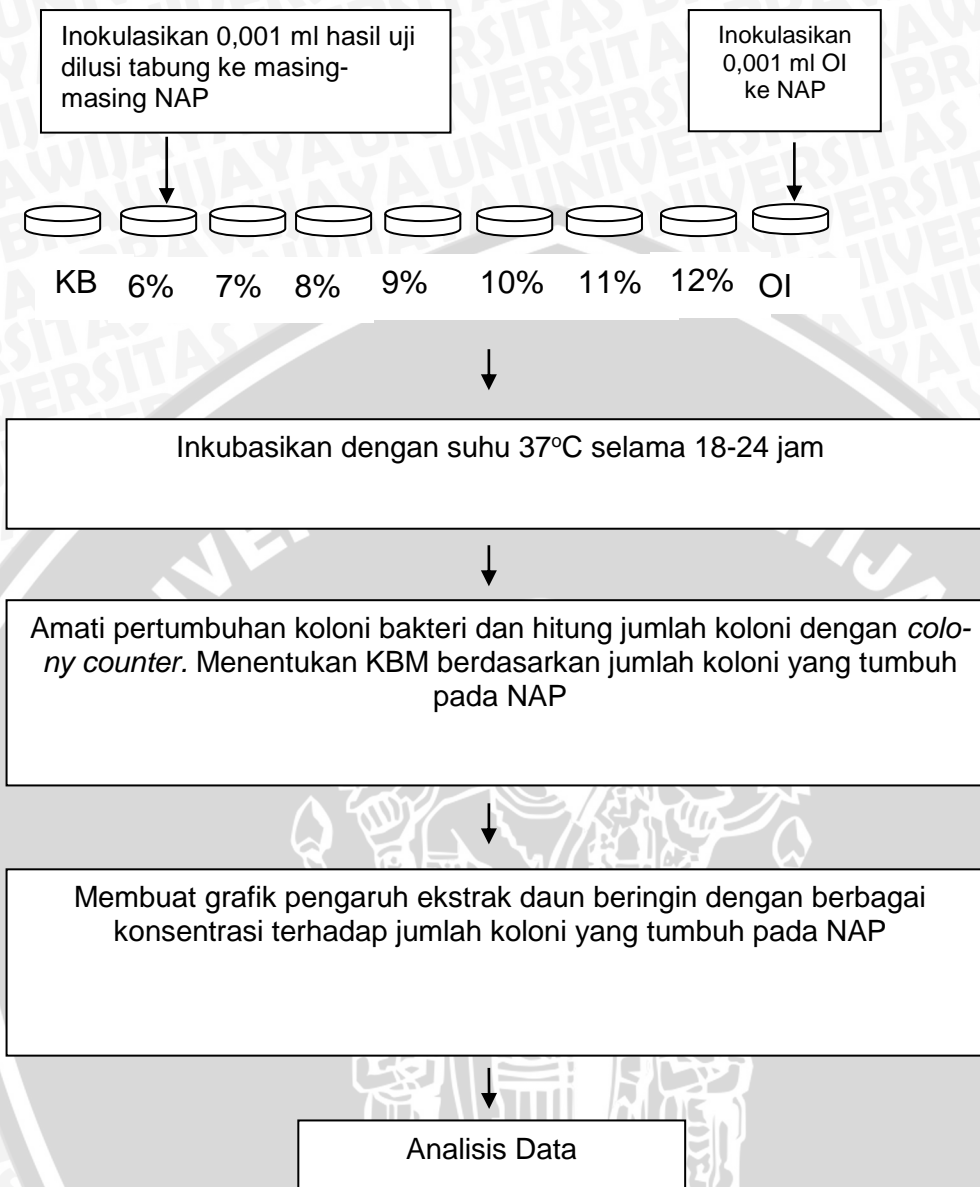
Gambar 4.1 Penentuan KHM

Keterangan :

KB : Kontrol bahan (ekstrak daun beringin)

KHM : Kadar Hambat Minimal

Tahap II : Penentuan KBM



Gambar 4.2 Penentuan KBM

Keterangan :

NAP : *Nutrient Agar Plate*

OI : *Original Inoculum* bakteri *MRSA* pada *Nutrient Broth* (NB).
(Kepadatan bakteri 10^6 CFU/ml).

KB : Kontrol Bahan (ekstrak etanol daun beringin)

KBM : Kadar Bunuh Minimal

4.9. Pengambilan & Pengolahan Data

Data yang diperoleh adalah data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif diperoleh dari melihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri secara tidak langsung dengan cara mengamati kekeruhan yang terjadi pada tes dilusi tabung setelah sebelumnya diinkubasi selama 18 - 24 jam, untuk mendapatkan KHM. Data kuantitatif diperoleh dari hasil penghitungan jumlah koloni *MRSA* pada NAP larutan subkultur yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, untuk mendapatkan KBM.

4.9.1 Pengamatan Kualitatif

Pengamatan kualitatif digunakan untuk menentukan skor pertumbuhan *MRSA* berdasarkan perbandingan kekeruhan yang menunjukkan pertumbuhan bakteri pada tabung-tabung yang berisi konsentrasi uji dengan inokulum standar bakteri *MRSA* yang tidak diberi ekstrak atau dengan standar McFarland 0,5 (yang ekuivalen dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml) berdasarkan bayangan 3 garis hitam pada latar belakang putih yang tampak di balik tabung (diadaptasi dari kartu Wickerham). Konsentrasi terendah yang tidak menunjukkan kekeruhan dibaca sebagai KHM.



4.9.2 Pengamatan Kuantitatif

Pengamatan kuantitatif dilakukan dengan cara menghitung koloni yang terbentuk pada NAP menggunakan *colony counter* dan dibandingkan dengan jumlah koloni yang tumbuh pada *original inoculum* untuk mengetahui KBM. Setiap NAP dihitung secara manual, diulang dua kali, dan diperiksa oleh dua

pengamat. Rentang beda rata-rata yang diijinkan tidak melebihi 5% dari jumlah pertama. KBM yang ditentukan adalah konsentrasi terendah yang menunjukkan pertumbuhan koloni kurang dari 0,1% jumlah koloni pada *original inoculum*.

Data yang diperoleh yaitu data konsentrasi ekstrak daun beringin dan jumlah koloni bakteri, dimasukkan dalam tabel jumlah koloni bakteri per konsentrasi ekstrak, lalu dianalisis yang digunakan adalah uji korelasi - regresi linier sederhana dan uji ANOVA searah (*one way ANOVA*). Uji regresi linier digunakan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun beringin terhadap pertumbuhan koloni bakteri *MRSA*, serta dapat digunakan untuk memprediksi jumlah koloni bakteri. Uji ANOVA searah dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) bertujuan untuk mencari tahu pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun beringin terhadap jumlah koloni *MRSA*.

