

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik secara *in vitro* dengan metode dilusi agar. Sampel bakteri yang digunakan dibagi menjadi 6 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol tanpa pemberian ekstrak buah kawis dan 5 kelompok perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak. Adapun penentuan konsentrasi yang digunakan dalam penelitian berdasarkan hasil dari penelitian pendahuluan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui hubungan antara berbagai konsentrasi ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) dengan potensi efek ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* sehingga diperoleh KHM dari ekstrak tersebut. Metode penelitian yang digunakan adalah dengan dilusi agar karena hasil ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) yang digunakan berwarna gelap (coklat).

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian ini adalah empat isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dari pasien berbeda yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan nomor registrasi 2103, 20536, 20732, dan 20734. Jumlah isolat tersebut dapat diketahui dengan menggunakan rumus:

$$P(n-1) \geq 15 \quad (\text{Notobroto, 2005})$$

Dari rumus di atas, didapatkan perhitungan sebagai berikut:

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

- n = Jumlah isolat
p = Jumlah perlakuan
(5 konsentrasi ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) dan 1 kontrol kuman)

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada tanggal 9 September 2013 – 22 November 2013.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian adalah konsentrasi ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) sebesar 1%; 1,2%; 1,4%; 1,6%; dan 1,8% %/.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung yang digunakan dalam penelitian adalah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada media MHA.

4.5 Definisi Operasional

- Buah *kawis* (*Limonia acidissima*) yang digunakan adalah buah *kawis* (*Limonia acidissima*) yang sudah matang dengan warna daging buah coklat dan diameter 9 cm, diperoleh dari Desa Peganden, Kecamatan Manyar, Kabupaten Gresik.
- Ekstrak buah *kawis* (*Limonia acidissima*) yang digunakan adalah sediaan hasil dari ekstraksi buah *kawis* (*Limonia acidissima*) dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.
- Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan dalam penelitian adalah 4 isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dari spesimen yang diperoleh dari penderita yang berbeda.
- Pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada media MHA diamati dan dinilai menggunakan sistem skoring sebagai berikut:
 - 0 : Tidak ada pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus*
 - +1 : Koloni nampak tipis, jarak antar koloni tidak rapat, dan dapat dihitung jumlah koloninya
 - +2 : Koloni nampak tipis, jarak antar koloni rapat, dan tidak dapat dihitung jumlah koloninya
 - +3 : Koloni nampak tebal, jarak antar koloni rapat, dan tidak dapat dihitung jumlah koloninya

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Ekstraksi Buah *kawis* (*Limonia acidissima*)

Alat yang digunakan untuk ekstraksi buah *kawis* (*Limonia acidissima*) adalah oven, blender, labu erlemenyser, timbangan, *rotary evaporator*, corong

Buchner, botol steril bertutup, dan kertas saring Whatman no. 1. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi buah kawis (*Limonia acidissima*) adalah buah kawis (*Limonia acidissima*) dan etanol 96%.

4.6.2 Identifikasi Bakteri

4.6.2.1 Pengecatan Gram

Alat yang digunakan untuk pengecatan Gram adalah ose, kaca obyek, kertas penghisap, dan mikroskop. Sedangkan bahan yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus aureus*, air, kristal violet, lugol, alkohol 96% dan safranin.

4.6.2.2 Uji Katalase

Alat yang digunakan untuk uji katalase adalah ose dan kaca obyek. Sedangkan bahan yang digunakan adalah H₂O₂ 3% dan perbenihan cair bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.6.2.3 Uji Koagulase pada Kaca Obyek

Alat yang digunakan untuk uji koagulase pada kaca obyek adalah ose dan kaca obyek. Sedangkan bahan yang digunakan adalah larutan saline, *staphyrex*, dan perbenihan cair bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.6.2.4 Uji Fermentasi Manitol pada MSA

Alat yang digunakan untuk uji fermentasi manitol adalah ose dan *petridish*. Sedangkan bahan yang digunakan adalah perbenihan cair bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Mannitol Salt Agar* (MSA).

4.6.3 Uji Antimikroba Ekstrak Buah kawis (*Limonia acidissima*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Alat yang digunakan untuk uji kepekaan antibakteri adalah *analitical balance*, autoklaf, *blue tip* 1000 µl, *yellow tip* 100 µl, bunsen api, *colony counter*, falcon 15 ml, inkubator, ose, *petridish*, pipet mikro 1000 µl, pipet mikro 200 µl,

spektrofotometer, dan spirtus. Sedangkan bahan yang digunakan adalah empat isolat bakteri *Staphylococcus aureus*, ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*), *Nutrient Broth* (NB), *Mueller Hinton Agar* (MHA), dan aquades steril.

4.7 Metode Pengumpulan Data

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Buah kawis (*Limonia acidissima*)

Langkah-langkah pembuatan ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) melalui proses maserasi adalah sebagai berikut:

- a. Buah kawis (*Limonia acidissima*) matang berjumlah 1 kg dipisahkan dari kulit (tempurung) nya yang keras.
- b. Buah kawis dikeringkan dengan cara dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 80°C selama kurang lebih 8 jam.
- c. Buah kawis dihancurkan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk buah kawis.
- d. Serbuk kering buah kawis ditimbang sebanyak 100 gram.
- e. Serbuk kering buah kawis dimasukkan ke dalam labu erlemenyser berukuran 1 L.
- f. Serbuk kering buah kawis (*Limonia acidissima*) direndam dengan etanol 96% hingga volume mencapai 900 ml.
- g. Labu erlemenyser dikocok hingga serbuk buah kawis tercampur etanol 96% kurang lebih selama 30 menit.
- h. Hasil kocokan didiamkan selama 1 x 24 jam.
- i. Hasil rendaman disaring menggunakan corong *Buchner* hingga didapatkan filtrat yang terpisah dari supernatannya.

- j. Supernatan hasil perendaman pertama direndam lagi dengan etanol 96% sehingga dihasilkan filtrat kedua.
- k. Supernatan hasil perendaman kedua direndam lagi dengan etanol 96% sehingga dihasilkan filtrat ketiga.
- l. Ketiga filtrat yang diperoleh dari perendaman pertama, kedua, dan ketiga dicampur menjadi satu.
- m. Filtrat diuapkan secara bertahap menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C selama 1 jam hingga dihasilkan ekstrak buah kawis 100% yang siap digunakan sebagai bahan penelitian.
- n. Ekstrak buah kawis dimasukkan dalam botol steril, ditutup rapat, dan disimpan di tempat yang sejuk.

4.7.2 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

4.7.2.1 Pengecatan Gram

- a. Buat apusan bakteri pada kaca obyek.
- b. Tuang kristal violet di atas sediaan dan biarkan selama 1 menit. Buang sisa kristal violet dan bilas dengan air.
- c. Tuang lugol di atas sediaan dan biarkan selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
- d. Tuang alkohol 96% di atas sediaan dan biarkan selama 5 – 10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol 96% dan bilas dengan air.
- e. Tuang safranin di atas sediaan dan biarkan selama ½ menit. Buang sisa safranin dan bilas dengan air.
- f. Keringkan sediaan dengan menggunakan kertas penghisap.

- g. Amati sediaan di bawah mikroskop dengan lensa obyektif dan pembesaran 100 kali.
- h. Hasil pengecatan adalah berwarna ungu menunjukkan bakteri yang diuji merupakan Gram positif.

4.7.2.2 Uji Katalase

- a. Buat sediaan 1 koloni bakteri dari perbenihan cair pada kaca obyek.
- b. Tetesi larutan H₂O₂ 3% sebanyak 1 – 2 tetes pada kaca obyek.
- c. Amati ada atau tidaknya gelembung udara.
- d. Hasil uji katalase positif menunjukkan bahwa bakteri yang diuji merupakan *Staphylococcus*, bukan *Streptococcus*.

4.7.2.3 Uji Koagulase pada Kaca Obyek

- a. Tetesi larutan saline atau aquades steril pada kaca obyek.
- b. Tambahkan 1 koloni bakteri dari perbenihan cair pada kaca obyek.
- c. Tambahkan 1 tetes *Staphyrex* pada kaca obyek.
- d. Campur sediaan pada kaca obyek dengan cara menggoyang kaca obyek dengan arah melingkar selama 5 – 10 detik.
- e. Hasil uji koagulase disebut positif apabila tampak gumpalan-gumpalan putih.

4.7.2.4 Uji Fermentasi Manitol pada MSA

- a. Tanam koloni *Staphylococcus aureus* pada MSA.
- b. Inkubasi MSA dengan suhu 37°C selama 24 jam.
- c. Hasil uji fermentasi manitol disebut positif apabila terjadi perubahan warna agar dari merah menjadi kuning karena adanya fermentasi manitol oleh bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.7.3 Preparasi Bakteri Uji

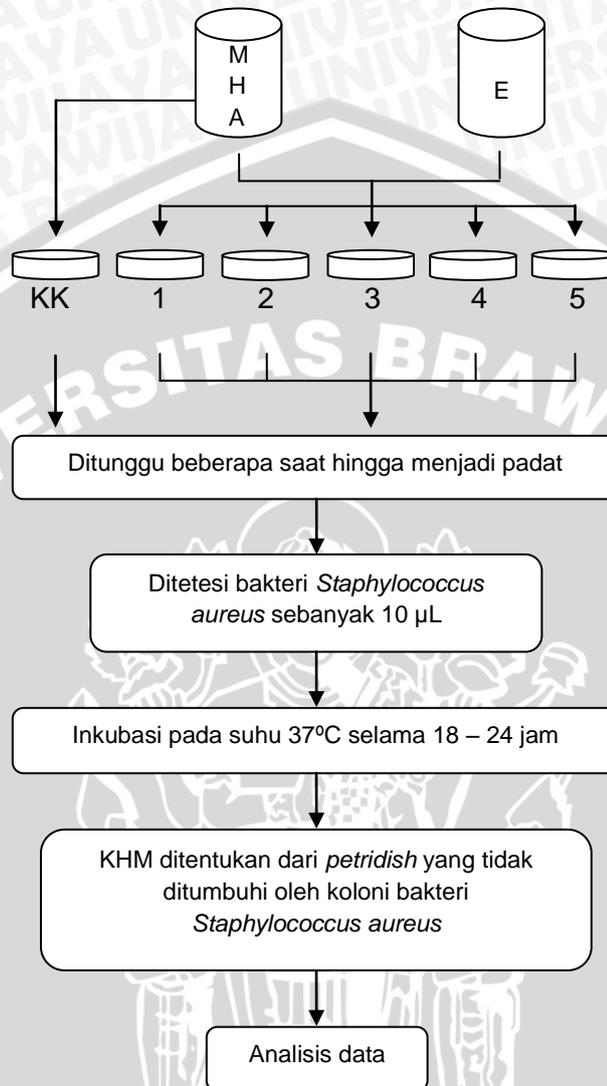
Sebelum membuat suspensi, dilakukan identifikasi terhadap bakteri yang akan digunakan dalam penelitian dengan melakukan pengecatan Gram, uji katalase, uji koagulasi, dan uji fermentasi manitol menggunakan MSA. Persiapan stok bakteri yang akan digunakan dilakukan dengan cara membuat suspensi koloni *Staphylococcus aureus* dengan media *Nutrient Broth* (NB) dalam tabung reaksi yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian suspensi bakteri yang telah diinkubasi tersebut diencerkan dengan menambah aquades untuk memperoleh suspensi koloni bakteri dengan kepadatan sel tertentu. Kekeruhan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* disamakan dengan standar *Mc Farland 0,5* yang setara dengan konsentrasi bakteri sebanyak $1,5 \times 10^6$ CFU/ml menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm. Apabila kekeruhan suspensi bakteri masih belum sesuai, maka suspensi dapat diencerkan atau diberi tambahan bakteri (Forbes, 2007).

4.7.4 Pengujian Bahan dengan Metode Dilusi Agar

- a. Sediakan enam buah *petridish* dan beri label KK, 1, 2, 3, 4, dan 5.
- b. Buat campuran agar hangat dengan berbagai konsentrasi ekstrak buah kawis yakni 1%; 1,2%; 1,4%; 1,6%; dan 1,8% $\frac{1}{v}$ hingga campuran keduanya berjumlah 15 ml. Adapun rincian campuran yang dibuat adalah sebagai berikut:
 - *Petridish* 1 (konsentrasi ekstrak 1%):
0,15 ml ekstrak buah kawis + 14,85 ml MHA hangat.
 - *Petridish* 2 (konsentrasi ekstrak 1,2%):
0,18 ml ekstrak buah kawis + 14,82 ml MHA hangat.

- *Petridish* 3 (konsentrasi ekstrak 1,4%):
0,21 ml ekstrak buah kawis + 14,79 ml MHA hangat.
 - *Petridish* 4 (konsentrasi ekstrak 1,6%):
0,24 ml ekstrak buah kawis + 14,76 ml MHA hangat.
 - *Petridish* 5 (konsentrasi ekstrak 1,8%):
0,27 ml ekstrak buah kawis + 14,73 ml MHA hangat.
- c. Tunggu beberapa saat hingga campuran MHA hangat dengan ekstrak pada *petridish* menjadi dingin.
 - d. Satu buah *petridish* bertanda KK digunakan sebagai kontrol kuman dan diisi 15 ml MHA hangat tanpa pemberian ekstrak.
 - e. Tetesi *petridish* 1, 2, 3, 4, 5, dan KK dengan 10 μ l (1×10^4 CFU/ml) bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan pipet mikro.
 - f. Inkubasi keenam *petridish* yang digunakan sebagai kelompok perlakuan beserta KK dalam inkubator bersuhu 37°C selama kurang lebih 18 – 24 jam.
 - g. Amati pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* hasil inkubasi pada keenam *petridish*. Bandingkan koloni bakteri yang tumbuh pada kelima *petridish* perlakuan dengan koloni bakteri yang tumbuh pada KK.
 - h. Nilai KHM ditentukan pada *petridish* yang tidak ditumbuhi oleh koloni bakteri *Staphylococcus aureus* (Forbes, 2007).

4.7.5 Rancangan Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

Keterangan:

- MHA : *Mueller Hinton Agar*
- E : *Ekstrak buah kawis (Limonia acidissima)*
- KK : *Kontrol Kuman*
- 1-5 : *Kelompok perlakuan*

4.8 Analisis Data

Data yang didapatkan dari penelitian ini dianalisis secara statistik dengan menggunakan *software* SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 17.0 dengan derajat kepercayaan sebesar 95% ($\alpha=0,05$). Adapun uji non parametrik ANOVA (*Analysis of Variance*) yang digunakan adalah sebagai berikut:

- *Kruskall-Wallis*

Uji non parametrik ini dilakukan terhadap penelitian yang memiliki komparatif ≥ 2 kelompok tidak berpasangan. H_0 (perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan pada hasil) ditolak dan H_1 (perlakuan berpengaruh secara signifikan pada hasil) diterima, jika *asympt. sig.* $< 0,05$.

- *Mann-Whitney*

Uji non parametrik ini digunakan untuk dua sampel yang saling bebas atau tidak berhubungan satu sama lain. Interpretasi dari uji ini adalah berbeda signifikan apabila nilai signifikansi $< 0,05$.

- *Korelasi Spearman*

Uji non parametrik ini dilakukan terhadap penelitian yang memiliki komparatif ≥ 2 kelompok berpasangan dengan menggunakan faktor yang berbeda. Interpretasinya berupa besar nilai dan arah koefisien korelasi.