

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Desain Penelitian**

Pada penelitian ini penulis menggunakan metode eksperimental *in vitro* dengan uji laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan efek antimikroba dari ekstrak lengkuas merah terhadap pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode dilusi agar (*agar dilution test method*) untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM).

#### **4.2 Populasi dan Sampel**

Sampel yang digunakan di dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Sampel bakteri MRSA merupakan sampel uji yang didapatkan dari pasien di Rumah Sakit Umum Daerah Saiful Anwar, Malang.

#### **4.3 Tempat dan waktu Penelitian**

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Ekstraksi Lengkuas Merah dilakukan di Politeknik Negeri Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada tahun 2013.

#### 4.4 Estimasi Jumlah Pengulangan

Jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian dihitung dengan rumus

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

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

$$7n \geq 22$$

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

Keterangan : p = jumlah perlakuan (konsentrasi 7 level)

n = jumlah pengulangan yang diperlukan (Santoso, S.2005)

Jadi jumlah pengulangan yang harus dilakukan untuk mendapat jumlah sampel yang dapat dipercaya adalah 4

#### 4.5 Variabel Penelitian

##### 4.5.1. Variabel Bebas

Setelah dilakukan eksplorasi awal didapatkan variabel bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak rimpang lengkuas merah dengan konsentrasi 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%, 2%.

##### 4.5.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Rimpang lengkuas merah didapat dari pasar di kota Malang.
2. Ekstrak rimpang lengkuas merah adalah lengkuas merah yang telah diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 96%, dan menghasilkan ekstrak etanol rimpang lengkuas merah dengan konsentrasi 100 %.
3. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan di dalam penelitian ini berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Konsentrasi yang digunakan adalah 0%; 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8%; 1%; dan 2%. Konsentrasi uji, diperoleh setelah melakukan uji pendahuluan.
5. Uji kepekaan antimikroba pada penelitian ini menggunakan metode dilusi agar.
6. Kontrol bakteri yaitu sediaan bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditetaskan pada media agar dengan konsentrasi ekstrak 0% atau tanpa larutan ekstrak rimpang lengkuas merah.
7. Pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* digunakan untuk menentukan KBM. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak rimpang lengkuas merah yang mampu membunuh bakteri uji *Staphylococcus aureus*, ditandai dengan tidak dijumpai lagi adanya koloni bakteri pada permukaan media *Nutrient Agar Plate*.
8. Hasil penelitian untuk KBM dinyatakan dalam bentuk angka hasil histogram dari foto masing-masing *plate* menggunakan histogram Corel Photo Paint X6

untuk mengevaluasi tingkat pertumbuhan koloni bakteri (daerah koloni yang dievaluasi berupa lingkaran).

#### **4.7 Bahan dan Alat /Instrumen Penelitian**

##### **4.7.1 Alat**

- Plate
- Blender
- Oven
- Timbangan analitik
- Kertas saring
- *Beaker glass*
- *Shaker*
- Evaporator set
- Obyek glass
- Minyak emersi
- Kapas lidi
- Bunsen
- Ose
- Alat inkubasi
- Korek api
- Pipet ukur
- Vortex

#### 4.7.2 Bahan

- Lengkuas merah
- Etanol 96%
- *Staphylococcus aureus*
- Medium cair *Nutrient Broth*
- Medium padat (*Nutrient Agar*)
- Akuades steril
- NaCl
- Standard 0,5 Mc.Farland

#### 4.8 Cara Membuat Ekstrak

##### 4.8.1 Proses Ekstraksi

100 gram rimpang lengkuas merah dikeringkan dibawah sinar matahari. Kemudian rimpang tersebut dihaluskan dengan menggunakan blender. Jika telah halus, dibungkus menggunakan kertas saring dan direndam dalam etanol 96% selama ( $\pm$  12 jam). Siklus perendaman dalam etanol, diulang hingga 3 hari. Kemudian hasil ekstraksi siap untuk dievaporasi.

##### 4.8.2 Proses Evaporasi

Evaporasi set dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja dengan susunan dari bawah keatas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin yang terhubung dengan bak penampungan air dingin melalui pompa plastik. Tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.

Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu penampung sedangkan *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyatalakan. Pemanas aquades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih dengan suhu 80°C (sesuai titik didih etanol) dan etanol menguap.

Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur, hasil evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian dioven selama 2 jam pada suhu 80°C untuk menguapkan pelarut yang tersisa.

Hasil akhirnya adalah ekstrak etanol rimpang lengkuas merah dengan konsentrasi 100 %.

## **4.9 Identifikasi Ulang Bakteri *Staphylococcus aureus***

### **4.9.1 Pewarnaan Gram**

Prosedur pengecatan Gram:

1. Dibuat sediaan (slide), dikeringkan di udara kemudian dilakukan fiksasi
2. Sediaan dituangi Kristal violet dan dibiarkan 1 menit
3. Sisa bahan pewarna dibuang dan dibilas dengan air
4. Sediaan dituangi larutan lugol dibiarkan selama 1 menit.
5. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
6. Sediaan dituangi alcohol 96% sebagai peluntur selama 10-15 detik.
7. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air

8. Sediaan dituangi safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik.
9. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air
10. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 100x

#### 4.9.2 Tes Katalase

1. Sediakan perbenihan cair kuman pada gelas obyek
2. Kemudian sediaan tersebut ditetesi dengan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%.
3. Perhatikan ada tidaknya gelembung yang terjadi.
4. Tes Katalase positif apabila adanya gelembung yang menunjukkan adanya enzim katalase dibakteri tersebut biasanya didapat di *Micrococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*
5. Tes Katalase negatif apabila tidak adanya gelembung yang menunjukkan tidak adanya enzim katalase dibakteri tersebut biasanya didapat di *Enterococcus spp.*, *Gemale spp.*, *Lactococcus spp.*, *Sterptococcus spp.*, *Lactobacilus spp.*

#### 4.9.3 Tes Koagulase

1. Gelas obyek dibersihkan
2. Suspensi kuman dibuat diatas gelas obyek dari 1 tetes aquades steril dengan 1 koloni kuman.

3. Satu tetes plasma darah diteteskan pada suspensi kuman dan diusahakan agar tercampur, dengan cara menggoyangkan gelas obyek dalam arah melingkar dalam waktu 5-10 detik.
4. Perhatikan ada tidaknya gumpalan putih (*clumping*) pada sediaan tersebut.
5. Tes Koagulase positif apabila adanya gumpalan putih pada sediaan.
6. Tes Koagulase negatif apabila tidak adanya gumpalan putih pada sediaan.

#### **4.9.4 Penanaman Bakteri ke Medium MSA**

1. Menyiapkan medium MSA sehari sebelum digunakan, dan menyimpannya di tempat yang gelap pada suhu ruangan.
2. Mengambil bakteri dan pembedahan.
3. Menggoreskan bakteri tersebut ke medium MSA.
- 4.. Menginkubasi biakan bakteri pada medium selama 18-24 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .
5. Memperlihatkan adanya fermentasi manitol oleh bakteri berupa adanya daerah terang (halo) berwarna kuning disekitar koloni.

#### **4.10 Prosedur Penelitian**

Pada metode ini digunakan standar yang setara dengan Mc Farland 0,5. Pembuatan biakan bakteri dengan standar Mc Farland 0,5 dimulai dengan diambilnya bakteri pada kultur bakteri sebanyak satu ose dan dicampur dengan *broth* dengan volume 10 ml dan dikocok sampai memperoleh kepadatan yang sama

dengan standar Mc Farland 1 ( $3 \times 10^8$  bakteri/ml). Kemudian dari larutan bakteri tersebut ditambahkan dengan *broth* sebanyak 10 ml sehingga didapatkan suspensi kuman dengan standar Mc Farland 0,5 ( $1-1,5 \times 10^8$  bakteri/ml). Dari larutan bakteri tersebut diambil sebanyak 1 ml dan dicampur dengan *broth* sebanyak 9 ml sehingga kepadatan  $10^7$  bakteri/ml setelah diambil lagi sebanyak 1 ml dan dicampur dengan *broth* sebanyak 9 ml sehingga diperoleh kepadatan  $10^6$  bakteri/ml.

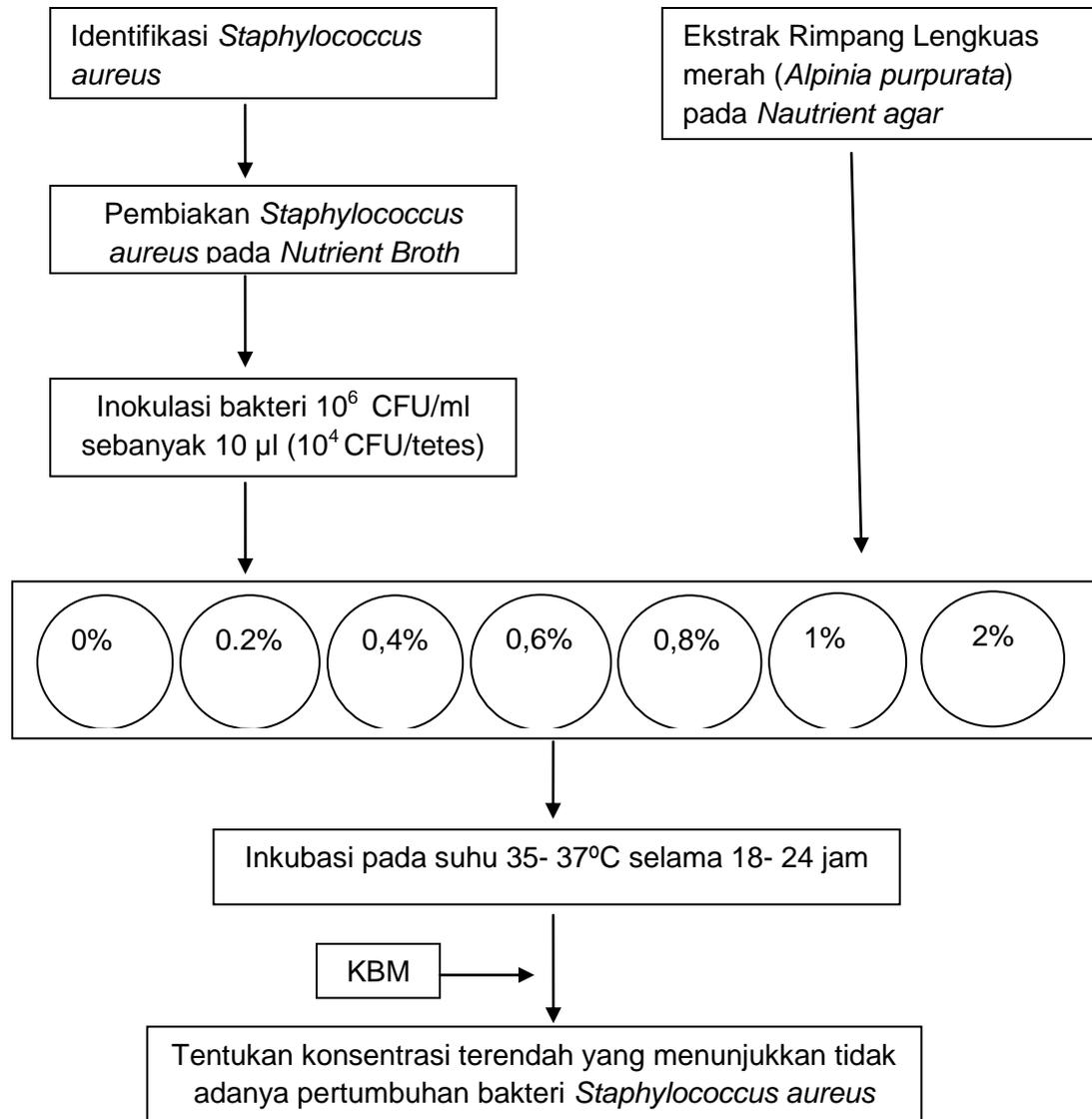
Uji Antimikroba Ekstrak Rimpang Lengkuas Merah terhadap *Staphylococcus aureus*

- Siapkan suspensi bakteri dengan konsentrasi  $10^6$  bakteri/ml
- Disediakan 7 plate steril, beri tanda masing-masing perlakuan kadar ekstrak rimpang lengkuas merah 0%, 0,2%, 0,4%, 0,8%, 1%, 2% dan 1 tabung kontrol yaitu 1 kontrol bahan.
- Plate 1 diisi dengan 20 ml Nutrient Agar ke dalam plate bertanda 0%.
- Plate 2 diisi dengan 19,92 ml Nutrient Agar ke dalam plate bertanda 0,2% lalu tambahkan 0,04 ml ekstrak rimpang lengkuas merah.
- Plate 3 diisi dengan 19,92 ml Nutrient Agar ke dalam plate bertanda 0,4% lalu tambahkan 0,08 ml ekstrak rimpang lengkuas merah.
- Plate 4 diisi dengan 19,88 ml Nutrient Agar ke dalam plate bertanda 0,6% lalu tambahkan 0,12 ml ekstrak rimpang lengkuas merah.
- Plate 5 diisi dengan 19,84 ml Nutrient Agar ke dalam plate bertanda 0,8% lalu tambahkan 0,16 ml ekstrak rimpang lengkuas merah.
- Plate 6 diisi dengan 19,8 ml Nutrient Agar ke dalam plate bertanda 1% lalu tambahkan 0,2 ml ekstrak rimpang lengkuas merah.

- Plate 7 diisi dengan 19,6 ml Nutrient Agar ke dalam plate bertanda 2% lalu tambahkan 0,4 ml ekstrak rimpang lengkuas merah.
- Diamkan media agar tersebut pada laminary cabinet hingga mengeras dan uapnya menghilang.
- Bagi plate menjadi 4 bagian sama luas dengan spidol marker.
- Setelah agar dingin, setiap plate tersebut dibagi 4 untuk ditetesi bakteri uji dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml sebanyak 10  $\mu$ l ( $10^4$ CFU/tetes) pada setiap bagiannya.
- Plate 2-7 diinkubasi pada suhu 35°C-37°C selama 18-24 jam.
- Amati *Staphylococcus aureus* yang tumbuh. Konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah Kadar Bunuh Minimum (KBM).

Kemudian, setelah diamati, plate difoto dan dievaluasi tingkat pertumbuhan koloni bakterinya dengan histogram. Histogram menilai ketebalan melalui identifikasi terhadap *tone* (tingkat kecerahannya) suatu objek. Ketebalan objek sebanding dengan tingkat kecerahannya (Welander *et al*, 2003). Histogram memiliki grafik batang horizontal yang membagi nilai keterangan suatu *pixel* (*picture element*) gambar pada skala 0 (gelap) sampai 255 (terang). Nilai *tone* berupa jangkauan (*range*) dan data yang digunakan adalah rata-ratanya (*mean*). Besar lingkaran untuk membatasi daerah mana yang dievaluasi harus sama, dengan demikian jumlah *pixel*nya sama.

#### 4.11 Kerangka Operasional Penelitian



**Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian**

#### 4.12 Analisis Data

Dari data yang diperoleh adalah data kuantitatif berupa histogram dari foto *plate* daerah koloni bakteri dan *plate* KBM (daerah evaluasi tidak ada ketentuan) yang masing-masing memiliki konsentrasi ekstrak rimpang lengkuas merah yang berbeda, menggunakan histogram Corel Photo Paint X6.

Dalam penelitian ini, analisis data menggunakan program SSPS (*Statistic Product of Service Solution*) versi 22 dengan besar interval kepercayaan yang dipakai adalah 95% ( $\alpha=0,05$ ). Karena, data tidak memenuhi uji asumsi normalitas dan homogenitas, maka penelitian ini menggunakan uji analisis non parametrik.

Langkah-langkah uji statistik dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Melakukan analisis uji komparatif Kruskal Wallis untuk mengetahui ada perlakuan yang hasilnya berbeda secara bermakna (signifikan).
2. Kemudian dilakukan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbandingan perlakuan mana saja yang hasilnya berbeda secara bermakna (signifikan).
3. Kemudian dilakukan uji korelasi Spearman's untuk mengetahui keeratan dan arah hubungan antara perlakuan pemberian variasi dosis ekstrak rimpang lengkuas merah terhadap pertumbuhan bakteri MRSA