

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini, digunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorium (*True experiment*) dengan *Post test only control group design* dengan menggunakan metode *Microtiter-Plate Test* untuk mengetahui efektivitas ekstrak daun jambu biji (*Psidium folium*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan dosis berdasarkan uji eksplorasi dari penelitian.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm dengan isolat salah satu urin koleksi kelompok studi MRSA Indonesia yang disimpan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian dihitung dengan rumus (Notobroto, 2005):

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

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

$$5-(n-1) \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$n \geq 4$

Keterangan :

p : jumlah perlakuan → dosis ekstrak daun jambu biji (*Psidium folium*)

n : jumlah pengulangan → berdasarkan rumus banyaknya pengulangan yang dilakukan minimal 4 kali

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak daun jambu biji (*Psidium folium*). Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi berdasarkan eksplorasi dari penelitian.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pembentukan biofilm dari *Staphylococcus aureus* yang diukur terlebih dahulu dengan menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui apakah bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki biofilm atau tidak.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak daun jambu biji dila (*Psidium folium*) dilakukan di Materia Medica, Batu dan Laboratorium Politeknik Negeri Malang. Uji penghambat biofilm dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Juni 2013 sampai dengan bulan Mei 2014.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium folium*)

1. Daun jambu bijisegar 1000 gram.
2. Pelarut ekstrak (etanol 96%)
3. Aquades
4. Oven
5. Blender
6. Saringan
7. Kertas saring
8. Neraca analitik
9. Seperangkat alat evaporasi vakum
 - *Rotary Evaporator*
 - Pompa vakum
 - Tabung pendingin dan alat pompa sirkulasi air dingin
 - Bak penampung air dingin
 - Labu penampung hasil evaporasi
 - Labu penampung etanol
 - Batu didih
 - Cawan penguap
 - Alat pemanas aquades (*water bath*)
 - Pipa plastik

4.5.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri Pembenihan Murni

1. Isolat *Staphylococcus aureus*
2. NAP (*Natrium Agar Plate*)
3. bahan tes Katalase : H₂O₃ 3%

4. bahan tes Koagulase : plasma darah dengan EDTA
5. bahan pengecatan Gram : kristal violet, lugol, alkohol 95% dan safranin
6. minyak emersi, alat ose dan mikroskop
7. lampu spiritus
8. tabung reaksi

4.5.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm dan Efek Anti Biofilm

1. Tyticase Soy Broth (TSB) dengan 1% glukosa
2. Biakan *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm
3. Phospate Buffer Saline (PBS) PH 7,3
4. Kristal violet 0,2 mL 2%
5. HCl Isopropanol 200 µl
6. *Microtiter plate*
7. *Congo Red Agar Plates*
8. *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*
9. Spektrofotometri
10. Spektrofotomete
11. Ekstrak daun jambu biji

4.6 Definisi Operasional

1. *Staphylococcus aureus* tergolong dalam bakteri Gram positif yang berbentuk kokus, bergerombol seperti buah anggur, anaerob fakultatif, menunjukkan tes katalase positif dan tes koagulase positif dan membentuk koloni berwarna kuning emas pada *Nutrient Agar Plate* sesuai dengan namanya; *aureus* yang berarti emas dalam

bahasa latin. *Staphylococcus aureus* yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* strain pembentuk biofilm yang diidentifikasi dengan menggunakan metode tabung.

2. Biofilm adalah komunitas bakteri yang memiliki karakteristik berupa menempel secara ireversibel pada substrat atau permukaan atau saling menempel antara satu dengan yang lain, yang dilindungi oleh sebuah matriks dari substansi polimer ekstraseluler yang diproduksinya. Pada penelitian ini, penghambatan pembentukan biofilm akan diuji dengan menggunakan *microtiter plate*.
3. Ekstrak daun jambu biji adalah hasil ekstraksi berbentuk pasta daun jambu biji dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak yang didapat dianggap dapat memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Daun dipilih yang muda, segar, berwarna hijau, dan berasal dari satu pohon. Metode tabung adalah metode deteksi biofilm dengan menggunakan tabung sebagai media.
4. Spektrofotometri adalah alat yang digunakan untuk menghitung *Optical Density* pada well-microplate yang diukur. Dari *Optical Density*, dapat ditentukan jumlah biofilm yang terbentuk di setiap *well-microplates*. Dari pengukuran ini akan didapatkan *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC). Spektrofotometri yang digunakan adalah milik Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. *Optical Density* adalah satuan yang digunakan untuk mengukur *biomass*, *cell count* dll. Menggunakan prinsip *refraction of light* dari spektrofotometri.

6. *Standard Deviation* adalah suatu ukuran penyimpangan. Jika nilainya kecil maka data yang digunakan mengelompok di sekitar nilai rata-rata.
7. Metode *microtiter plate* menurut Christensen *et al.*, 1985 digunakan untuk mendeteksi pembentukan biofilm dan untuk menguji efek ekstrak daun kayu putih terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian ini menggunakan 96-well plate.
8. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi ekstrak daun kayu putih terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan tidak tampaknya bentukan cincin dan lapisan ungu kebiruan pada dinding dan dasar tabung.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Ekstraksi dan Evaporasi Daun Jambu Biji (*Psidium folium*)

Metode yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun jambu biji ini adalah metode ekstraksi Soxhlet. Metode ini merupakan salah satu cara untuk memisahkan campuran padat-cair. Prinsip yang dilakukan adalah pemanasan (penguapan), kondensasi, dan proses pengekstrakan. Proses ekstraksi daun salam dilakukan dengan cara maserasi, yaitu dengan pelarut etanol 96% karena pelarut etanol larut dalam air (Soxhlet, 1879).

4.7.1.1 Proses Ekstraksi (Ehrman, 1994)

1. Daun jambu biji segar/basah 1000 gram dikeringkan dengan sinar matahari secara tidak langsung atau diangin-anginkan.
2. Kemudian daun dimasukkan ke oven agar daun jambu biji tersebut menjadi kering secara sempurna dengan suhu oven 60° C.
3. Setelah kering, daun jambu biji diblender kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik sehingga didapatkan serbuk kering 100 gram.
4. Serbuk daun jambu biji dibungkus kertas saring, dimasukkan ke dalam tabung untuk direndam dengan etanol.
5. Pelarut etanol dimasukkan ke dalam tabung tersebut sampai serbuk yang ada di dalam kertas saring terendam dalam pelarut etanol selama kurang lebih 1 minggu.
6. Hasil ekstrak dalam etanol selanjutnya dievaporasi (untuk memisahkan ekstrak daun jambu biji dengan pelarut etanol).

4.7.1.2 Proses Evaporasi (Ehrman, 1994)

1. Alat evaporasi dirangkaikan sehingga membentuk sudut 30°-40°, dari bawah ke atas, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator*, dan tabung pendingin.
2. Selain tabung pendingin dihubungkan dengan alat pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak air dingin melalui pipa plastik, tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan labu penampung hasil penguapan.

3. Labu penampung hasil evaporasi diisi dengan hasil ekstraksi, kemudian dirangkai kembali, *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin, dan alat pompa vakum semua dinyalakan.
4. Pemanas aquades dinyalakan juga sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi ikut mendidih dan pelarut etanol mulai menguap.
5. Hasil penguapan etanol akan dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap yang lain disedot dengan alat pompa vakum.
6. Proses ini ditunggu hingga hasil ekstraksi yang dievaporasi volumenya berkurang dan menjadi kental.
7. Setelah kental, yang ditandai dengan batu-batu pengaduk yang ikut berputar, maka proses evaporasi dapat dihentikan dan hasil evaporasi diambil.
8. Hasil evaporasi kemudian ditampung dalam cawan penguap, kemudian di oven pada suhu 50^o-60^o C selama 1-2 jam, untuk menguapkan pelarut yang tersisa.
9. Didapat hasil ekstrak daun jambu biji 100% yang berupa pasta. Hasil inilah yang akan digunakan dalam percobaan.

4.7.2 Persiapan Bakteri *Staphylococcus aureus* Pembentuk Biofilm

4.7.2.1 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

A. Pemeriksaan Mikroskopis (Forbes *et al*, 2007)

1. Pembuatan sediaan slide

Membersihkan gelas objek dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak. Biarkan dingin. Sediaan dibuat sedemikian rupa, sehingga tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis dengan cara:

- Meneteskan satu ose aquades steril pada gelas objek. Mengambil sedikit biakan kuman menggunakan ose, selanjutnya suspensikan dengan aquades pada gelas objek dan ratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
- Sediaan dibiarkan kering di udara, kemudian melakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.

2. Pewarnaan Gram

- Menuangkan sediaan pada gelas objek dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan bilas dengan air.
- Menuangkan sediaan dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan bilas dengan air.
- Menuangkan sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alcohol dibuang dan bilas dengan air.
- Menuangkan sediaan safranin selama $\frac{1}{2}$ menit. Sisa safranin dibuang dan bilas dengan air.
- Mengeringkan sediaan dengan kertas penghisap

- Melihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x

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

Tes katalase digunakan untuk membedakan bakteri *Streptococcus* dan *Staphylococcus* dengan cara :

- Menuangkan 0,2 mL H₂O₃ 3% ke dalam tabung reaksi.
- Mengambil sedikit biakan bakteri dengan ose.
- Mengusapkan ose pada dinding tabung di atas permukaan cairan.
- Menutup tabung reaksi, lalu goyangkan agar cairan H₂O₃ 3% dapat mengenai usapan biakan bakteri.

Hasil keseluruhan :

- Hasil positif bila ada gelembung dan itu menunjukkan *Staphylococcus* sp.
- Hasil negatif bila tidak ada gelembung dan itu menunjukkan *Streptococcus* sp.

C. Tes Latex Aglutinase (Remel, 2011)

Tes Latex Aglutinase digunakan untuk mengetahui bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* :

- Ambil sedikit biakan bakteri dengan ose.
- Usapkan ose pada slide yang sudah disediakan
- Teteskan reagen latex aglutinase
- Tunggu sampai ± 20 detik
- Hasil positif bila terjadi aglutinasi pada slide
- Hasil negatif bila tidak ada aglutinase pada slide

4.7.2.2 Pembentukan Perbenihan Cair Bakteri

1. Setelah dipastikan bakteri adalah bakteri *Staphylococcus aureus*, bakteri dipindahkan dalam tabung yang berisi MH *broth* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
2. Dilakukan pengenceran pada perbenihan cair bakteri sehingga didapatkan konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml.
3. Dari konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml ini, kemudian dilakukan pengenceran dengan menambahkan 1ml perbenihan (10^8 CFU/ml) ke dalam 9ml MH *broth* untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10^7 CFU/ml.
4. Setelah itu, dilakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1ml perbenihan cair (10^7 CFU/ml) untuk ditambahkan pada 9ml MH *broth* sehingga akhirnya didapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu sebesar 10^6 CFU/ml.

4.7.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

Congo Red Agar Method (Moore, 2009) :

1. *Congo Red Agar* yang telah disiapkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
2. *Staphylococcus aureus* diinokulasi pada CRA.
3. CRA ini lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
4. Hasil positif ditunjukkan dengan koloni yang berwarna hitam.
5. Hasil negatif ditunjukkan dengan koloni yang berwarna pink.

Microtiter method (Christensen *et al.*,2000):

1. Kultur *Staphylococcus aureus* isolate darah dan urin selama semalam pada masing-masing *trypticase soy broth* (TSB) didilusi sampai 1:100 pada TSB glukosa.
2. 0,2 mL dari hasil pengenceran diinokulasikan pada mikrotiter (96-well) yang steril.
3. Mikrotiter diinkubasi semalaman pada suhu 37°C
4. Isi dari tiap mikrotiter *plate* diaspirasi dan dicuci tiga kali dengan 0,2 mL *phosphate-buffered saline* (pH 7,2)
5. Mikroorganisme yang menempel pada *well* dicat menggunakan *Huckers crystal violet* 2 %.
6. Setelah dikeringkan, *optical density* (OD) dari *Staphylococcus aureus* yang terwarnai dilunturkan dengan 5% v/v 1M HCl, isopropanol sebanyak 0,2 mL
7. *Microtiter plate* yang sudah terisi dengan HCl.isopropanol dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm.
8. Prosedur ini diulang sebanyak enam kali.

4.7.4 Uji Hambat Pembentukan Biofilm (Nuryastuti, 2010)

1. Bakteri *Staphylococcus aureus* dikultur semalaman di media TSB di dilusi sampai 1:100 pada TSBglu.
2. Kemudian 200 µl *Staphylococcus aureus* konsentrasi 10^6 bakteri/ml diisikan pada baris pertama 96-well *flat-bottomed plastic tissue culture plate*.
3. Kemudian di tiap kolomnya ditambahkan ekstrak daun jambu biji dengan konsentrasi yang berbeda-beda.

4. Mikrotiter diinkubasi 24 jam dengan suhu 37° C.
5. Setelah itu, isi setiap mikrotiter di aspirasi dan dicuci 3 kali menggunakan 200 µl *phosphate-buffered saline (pH 7,2)*. *Well-plates* di kocok secara hati-hati untuk menghilangkan seluruh bakteri yang tidak menempel.
6. Kemudian dilakukan pengecatan dengan *crystal violet*.
7. Lalu dilakukan pembilasan dengan menggunakan aquades dan dikeringkan.
8. Untuk menganalisis secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 200 µl dari HCl isopropanol di setiap well.
9. Kemudian dilakukan pengukuran *Optical Density (OD)* pada 570 nm menggunakan spektrofotometer dengan metode sama dengan spektrofotometri. Prosedur ini diulang sebanyak lima kali.

4.6 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah Uji *One Way ANOVA* dan Uji Regresi Linier Sederhana. Uji *One Way ANOVA* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh antara konsentrasi ekstrak daun jambu biji terhadap intensitas warna biofilm yang dicat dengan kristal violet (*Optical Density*) pada *microtiter plate*. Sedangkan Uji Regresi Linier Sederhana digunakan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak daun jambu biji terhadap intensitas warna biofilm yang dicat dengan kristal violet (*Optical Density*) pada *microtiter plate*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 16.0.