

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris (*true experiment – post test only control group design*) dengan menggunakan metode difusi sumuran.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari stok Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah pengulangan dapat diketahui dengan menggunakan rumus Loekito (1998) sebagai berikut:

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14$$

$$n = 4$$

Keterangan:

n = Jumlah Pengulangan (4 kali pengulangan)

p = Jumlah perlakuan (7, yaitu 5 konsentrasi, 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif)

Jadi pada penelitian ini, setiap perlakuan dilakukan empat kali pengulangan.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%. Konsentrasi tersebut didapatkan dengan metode pengenceran seri.

4.3.2 Variabel Tergantung

Tingkat pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang dilaksanakan dari bulan April sampai Juli 2014.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

Peralatan yang digunakan meliputi: cawan petri, corong *Buchner*, neraca analitik, blender, pisau, penguap putar vakum, lampu Uv, desikator, tabung reaksi, plat tetes, batang pengaduk, botol semprot, pipa kapiler, lidi kapas steril, spektrofotometer, jangka sorong, pinset.

4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun belimbing wuluh muda (*Averrhoa bilimbi* Linn.), *Staphylococcus aureus*, Agar BHI (*Brain Heart Infusion*), NAP (*Nutrient Agar Plate*), alkohol 96%, NaCl, kristal violet, lugol, safranin, aquades, minyak imersi, kertas penghisap, kapas, H₂O₂ 3%, Perbenihan cair, *Chlorhexidine gluconate* 0,2%, larutan standar *Mc Farland*.

4.6 Definisi Operasional

- a) Daun belimbing wuluh yang digunakan adalah daun belimbing wuluh yang masih muda, segar, berwarna hijau dan diambil diujung ranting.
- b) Ekstrak etanol daun belimbing wuluh adalah ekstrak yang diperoleh dari daun belimbing wuluh yang telah dikeringkan, kemudian dihaluskan, direndam dalam etanol 96%, diaduk, didiamkan (maserasi), dan diambil filtratnya dengan penyaring yang kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 60⁰C.
- c) Isolat *Staphylococcus aureus* adalah isolat yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- d) Kontrol positif adalah obat kumur *Chlorhexidine gluconate 0,2%*.
- e) Kontrol negatif adalah pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak daun belimbing wuluh yaitu aquades.
- f) Zona hambatan *Staphylococcus aureus* yaitu berupa zona bening yang terbentuk di daerah sekeliling lubang sumuran yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan diukur dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan mm.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Identifikasi Bakteri

1. Pewarnaan Gram

- a) Satu ose aquades steril ditetaskan pada gelas objek, lalu diambil sedikit bakteri untuk disuspensi dengan aquades yang telah diletakkan di atas gelas objek, lalu dibiarkan kering di udara.

- b) Suspensi bakteri yang sudah kering difiksasi dengan cara melewati beberapa kali di atas api. Sediaan siap untuk diwarnai.
- c) Kristal violet diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama satu menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- d) Lugol diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- e) Alkohol 96% diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 5 - 10 detik. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- f) Safranin diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- g) Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
- h) Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 100x.
- i) Hasil positif: *Staphylococcus aureus* berbentuk bulat berwarna ungu (Gram positif).

2. Tes Katalase

Untuk membedakan antara kuman *Staphylococcus* dan *Streptococcus* dilakukan uji katalase yaitu dengan menambahkan larutan H_2O_2 3% pada perbenihan cair. *Staphylococcus* akan memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan munculnya gelembung udara. Langkah uji katalase sebagai berikut:

- a) Sediakan perbenihan cair bakteri pada tabung.
- b) Menetesi dengan 1 ml larutan H_2O_2 3%.
- c) Bila terbentuk gelembung udara, maka koloni bakteri dalam tabung reaksi bersifat katalase positif (bakteri *Staphylococcus*).

3. Uji koagulase

Uji koagulase bertujuan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan strain *Staphylococcus* lain serta untuk mengetahui *patogenesis* kuman.

Staphylococcus aureus bersifat koagulase positif.

Langkah-langkah uji koagulase sebagai berikut:

Dibuat *suspensi* kuman pada gelas objek:

- a) 1 tetes larutan salin / aquades steril
- b) Ditambahkan 1 koloni kuman
- c) Ditambahkan 1 tetes plasma darah dan dicampurkan dengan cara menggoyangkan gelas objek secara melingkar selama 5 - 10 detik. Hasil positif apabila didapatkan gumpalan - gumpalan putih (*clumping*). Apabila hasil uji negatif harus dikonfirmasi dengan uji koagulase pada tabung.

4. Kultur pada medium NAP (*Nutrient Agar Plate*)

Bakteri ditanam dalam NAP (*Nutrient Agar Plate*) setelah itu diinkubasi selama 18 - 24 jam pada suhu 37°C akan terlihat pigmen berwarna kuning emas. Koloni yang tumbuh berbentuk bulat berdiameter 1 - 2 mm, konveks dengan tepi rata, permukaan mengkilat dan konsistensi lunak.

4.7.2 Pembuatan medium dan Inokulasi bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasi pada media *Brain Heart Infusion* (BHI) cair dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 - 24 jam. Selanjutnya perbenihan tersebut distandarisasi dengan menggunakan larutan standar *Mc Farland* 0,5 dengan kepadatan 10⁸ CFU/ML.

Menyiapkan cawan petri yang berisi media agar *Brain Heart Infusion* (BHI) steril. Mengambil biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dari media *Brain Heart Infusion* (BHI) cair yang telah disetarakan kekeruhannya dengan larutan standar *Mc Farland* 0,5 sebanyak 100 µl lalu ditanamkan pada 20 ml BHI dengan cara mencampurkan bakteri dengan BHI pada sebuah cawan petri kemudian diputar - putar untuk memastikan pemerataan bakteri (Erturk, 2011).

4.7.3 Pembuatan Ekstrak daun belimbing wuluh

Daun belimbing wuluh yang muda dikumpulkan sebanyak 1200 gram, dicuci bersih dan dikeringkan dengan cara diangin - anginkan (tidak dipanaskan dengan sinar matahari langsung, bertujuan agar zat - zat yang terkandung dalam daun belimbing wuluh tidak rusak karena terpapar sinar matahari). Daun belimbing wuluh yang telah kering kemudian dihaluskan dengan blender sehingga menjadi serbuk. Serbuk kemudian direndam dengan etanol 96% sampai seluruh bagian terendam selama 24 jam, lalu disaring dengan corong *Buchner* hingga didapatkan *filtrat* yang terpisah dari ampasnya. Ampas kemudian direndam kembali dengan etanol 96% sampai seluruh ampas terendam selama 24 jam, lalu disaring kembali dengan corong *Buchner* pengulangan perendaman dan penyaringan ini, dilakukan sebanyak 3 kali. Pada perendaman ketiga, banyak etanol 96% yang digunakan juga sama, hingga semua bagian terendam dan direndam selama 24 jam. Selanjutnya *filtrat* penyaringan ketiga ini, etanol 96% nya diuapkan dengan menggunakan *Rotary Evaporator* (penguap putar) pada suhu 60⁰C selama 1 jam hingga menjadi ekstrak kental dengan konsentrasi 100%. Ekstrak daun belimbing wuluh ini kemudian dimasukkan ke dalam botol steril, tutup rapat dan disimpan ditempat sejuk.

4.7.4 Perhitungan Pembuatan konsentrasi ekstrak

Pembuatan konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh menggunakan rumus sebagai berikut:

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

Keterangan:

V1 = Volume larutan ekstrak yang diambil (ml)

C1 = Konsentrasi ekstrak yang diambil (%)

V2 = Volume larutan yang akan dibuat (ml)

C2 = Konsentrasi larutan yang akan dibuat (%)

Perhitungan konsentrasi :

a) Konsentrasi (100%) : $V1 \times C1 = V2 \times C2$
 : $1 \text{ ml} \times 100 \% = V2 \times 100 \%$

$$V2 = 1 \text{ ml (konsentrasi 100 \%)}$$

b) Konsentrasi (50%) : $V1 \times C1 = V2 \times C2$
 : $1 \text{ ml} \times 100\% = V2 \times 50 \%$

$$: 1 \text{ ml} = 0,5 \times V2$$

$$V2 = 2 \text{ ml (1 ml konsentrasi 100\% + 1 ml aquades)}$$

c) Konsentrasi (25%) : $V1 \times C1 = V2 \times C2$
 : $1 \text{ ml} \times 50 \% = V2 \times 25 \%$

$$: 0,5\text{ml} = 0,25 \times V2$$

$$V2 = 2 \text{ ml (1 ml konsentrasi 50\% + 1 ml aquades)}$$

d) Konsentrasi (12,5%) : $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

: $1 \text{ ml} \times 25 \% = V_2 \times 12,5 \%$

: $0,25 \text{ ml} = 0,125 \times V_2$

$V_2 = 2 \text{ ml}$ (1 ml konsentrasi 25% + 1 ml aquades)

e) Konsentrasi (6,25%) : $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

: $1 \text{ ml} \times 12,5 \% = V_2 \times 6,25 \%$

: $0,125 \text{ ml} = 0,625 \times V_2$

$V_2 = 2 \text{ ml}$ (1 ml konsentrasi 12,5% + 1 ml aquades)

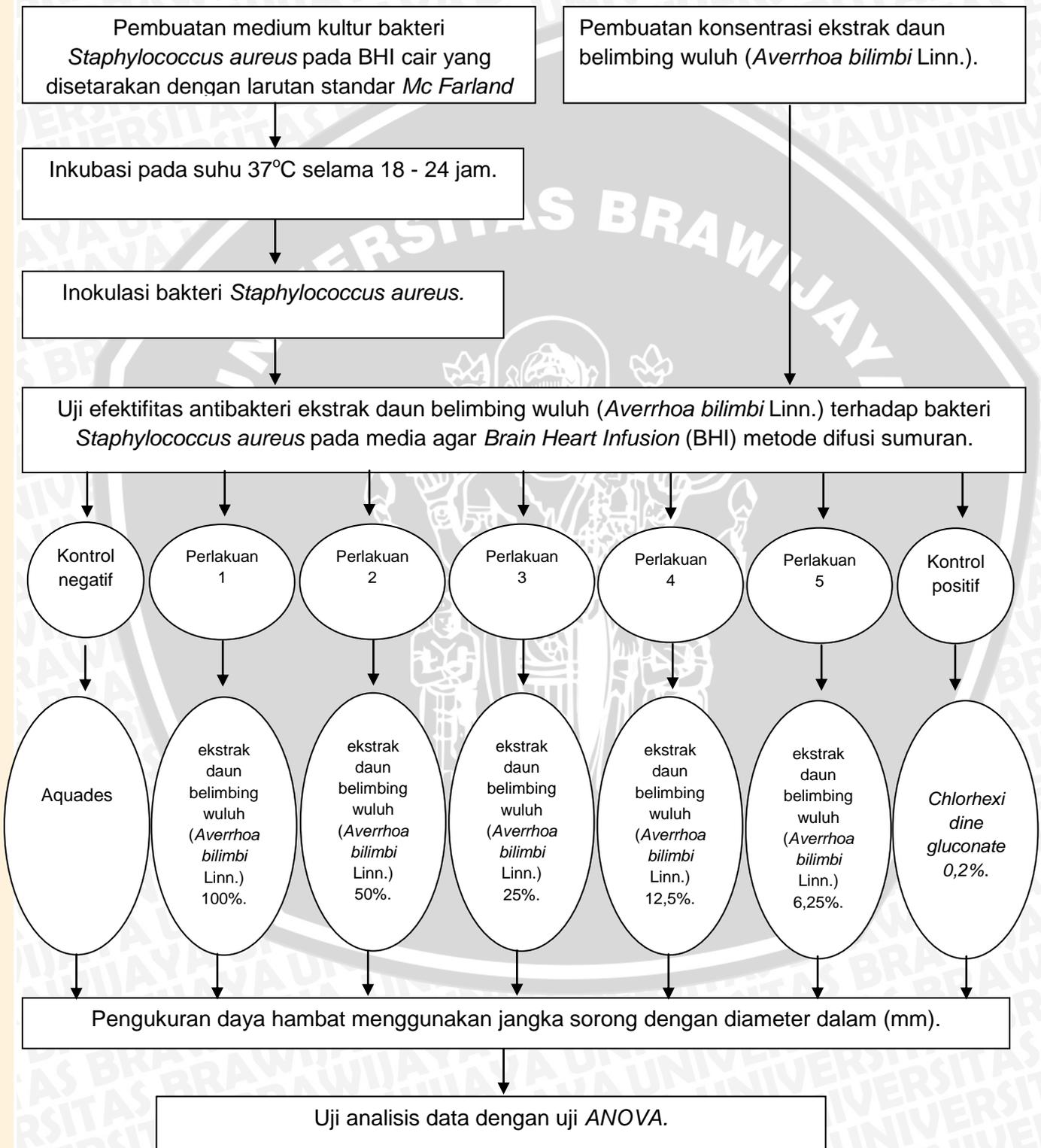
4.7.5 Uji Aktivitas Antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn.) terhadap *Staphylococcus aureus*

Menyiapkan cawan petri yang berisi agar *Brain Heart Infusion* (BHI) yang sudah dicampurkan dengan biakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah disetarakan kekeruhannya dengan larutan standar *Mc Farland* 0,5 sebanyak 100 μl . Pada agar *Brain Heart Infusion* (BHI) dibuat 7 lubang sumuran dengan menggunakan perforator dengan masing - masing berdiameter 6 mm. Setelah itu dimasukkan 50 μl (Darjono, 2011) ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, *Chlorhexidine gluconate* 0,2% sebagai kontrol positif, aquades sebagai kontrol negatif.

Uji antibakteri diamati dengan adanya zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran yang telah berisi ekstrak daun belimbing wuluh. Pengukuran zona hambat diukur menggunakan jangka sorong.

Setiap zona bening diukur diameternya sebanyak dua kali di tempat berbeda dan hasil yang didapat dirata - ratakan.

4.7.6 Kerangka Operasional Penelitian



4.8 Analisa Data

Dilakukan uji distribusi data terlebih dahulu yaitu, uji distribusi normalitas menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov*. Bila data terdistribusi normal, analisa data yang digunakan adalah uji statistik *One - Way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

