

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris *post-test only control group design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun belimbing wuluh (*averhoa bellimbi L*) terhadap pembentukan biofilm *P. aeruginosa*. Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi biofilm adalah dengan menggunakan *Microtitter Plate Test* dengan cara mengamati struktur biofilm pada permukaan dalam dinding dan dasar dari *microtiter plate*. Selain itu *Microtitter Plate Test* juga digunakan sebagai metode kuantitatif dengan bantuan *Elisa reader*. (Kala et al., 2012).

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan dosis 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, dan 0,05%. Dosis di atas didapatkan dari hasil penelitian eksplorasi.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah bakteri *P. aeruginosa* pembentuk biofilm. Sampel penelitian ini adalah bakteri *P. aeruginosa* pembentuk biofilm isolat sputum yang disimpan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.1 Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan sampel *P. aeruginosa* pembentuk biofilm. Rumus untuk menghitung estimasi jumlah pengulangan adalah (Notobroto, 2005):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

$$p = 6 \text{ perlakuan}$$

$n = \text{pengulangan} \rightarrow$ berdasarkan rumus banyaknya pengulangan yang dilakukan minimal 4 kali.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Uji identifikasi daun belimbing wuluh dilakukan di Laboratorium Taksonomi, Struktur, dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya. Pembuatan ekstrak daun belimbing wuluh dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Uji penghambatan biofilm dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilakukan mulai dari bulan Juni 2013 sampai dengan bulan Agustus 2013.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 0,01% (dosis I), 0,02% (dosis II), 0,03% (dosis III), 0,04% (dosis IV), dan 0,05% (dosis V).

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pembentukan biofilm dari bakteri *P. aeruginosa* yang bisa dihitung menggunakan *Elisa reader*.

4.5 Definisi Operasional

- a) *P. aeruginosa* yang dipakai dalam penelitian ini adalah *P.aeruginosa* isolat sputum galur pembentuk biofilm yang diidentifikasi diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi FKUB.
- b) Ekstrak daun belimbing wuluh adalah hasil ekstraksi daun belimbing wuluh dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan aktif sebesar 100%. Daun belimbing wuluh berasal dari halaman Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Daun dipilih yang muda, segar dan berasal dari satu pohon.
- c) *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak daun belimbing wuluh yang secara signifikan dapat menghambat pembentukan biofilm *P.aeruginosa*. MBIC yang dipakai pada penelitian ini adalah MBIC₅₀ dimana dosis ekstrak yang digunakan mempunyai perbedaan OD 50% atau kurang, dari OD pada kontrol yang tidak diberi perlakuan.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan

Bahan untuk pembuatan ekstrak daun belimbing wuluh adalah daun belimbing wuluh segar 1000 Gram, aquades steril, dan pelarut etanol 96%. Bahan yang digunakan untuk identifikasi bakteri *P. aeruginosa* antara lain pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alcohol 96%, dan safranin), minyak emersi,

aquades steril, medium NAP dan medium *Mc Conkey*. Bahan yang digunakan untuk deteksi biofilm adalah *Trypticase Soy Broth* (TSB) dengan 1% glukosa (TSB glu), biakan *P. aeruginosa* pembentuk biofilm, Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,3, Kristal violet 2% 0,2 mL, dan Isopropanol 200 µl.

4.6.2 Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun belimbing wuluh adalah neraca analitik, blender, kertas saring, *vaccum oven* atau *draying oven*, *rotary evaporator*, tabung pendingin, pemanas aquadest, evaporator dengan vakum, labu penampung hasil evaporasi, dan cawan penguap. Alat yang digunakan untuk identifikasi bakteri *P. aeruginosa* adalah ose, spidol permanen, cawan petri, mikroskop, gelas objek, kertas penghisap, lampu spiritus, dan tabung reaksi. Alat yang digunakan untuk deteksi biofilm dan anti biofilm adalah *Elisa reader* dan *microtiter plate*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Daun Belimbing Wuluh

4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi

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

4.7.1.1.1 Proses Ekstraksi

- a. Daun belimbing wuluh segar 300 gram dikeringkan dengan sinar matahari secara tidak langsung.

- b. Kemudian masukkan daun belimbing wuluh tersebut kedalam oven dengan suhu 60°C sehingga daun menjadi kering sempurna.
- c. Setelah kering, daun belimbing wuluh diblender kemudian ditimbang sebanyak 100 gram.
- d. Kemudian serbuk daun belimbing wuluh dibungkus kertas saring, dimasukkan ke dalam tabung untuk direndam dengan etanol.
- e. Pelarut etanol dimasukkan ke dalam tabung tersebut sampai serbuk yang ada di dalam kertas saring terendam dalam pelarut etanol selama kurang lebih 1 malam dan proses ini diulangi sampai hasil ekstraksi jernih.
- f. Hasil ekstrak dalam etanol selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan ekstrak daun belimbing wuluh dengan pelarut.

4.7.1.1.2 Proses Evaporasi

- a. Alat evaporasi dirangkai sehingga membentuk sudut 30° - 40° , dari bawah ke atas, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotari evaporator*, dan tabung pendingin.
- b. 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.
- c. Labu penampung hasil evaporasi diisi dengan hasil ekstraksi, kemudian dirangkai kembali, *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin, dan pompa vakum semua dinyalakan.

- d. Pemanas aquades dinyalakan juga sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi ikut mendidih dan pelarut etanol mulai menguap.
- e. Hasil penguapan etanol akan dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap uap lain disedot dengan alat pompa vakum.
- f. Proses ini ditunggu hingga hasil ekstraksi yang dievaporasi volumenya berkurang dan menjadi kental.
- g. Setelah kental, yang ditandai dengan batu-batu pengaduk yang ikut berputar, maka proses evaporasi dapat dihentikan dan hasil evaporasi diambil.
- h. Hasil evaporasi kemudian dipindahkan dalam cawan penguap kemudian di oven pada suhu 50°C – 60°C selama 1-2 jam, untuk menguapkan pelarut yang tersisa.
- i. Didapatkan hasil ekstrak daun belimbing wuluh 100 % yang berupa pasta. Hasil ini lah yang akan digunakan dalam percobaan

4.7.1.2 Pembuatan Larutan

Ekstrak awal dianggap memiliki konsentrasi 100%. Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi 1%.

$$1\% \rightarrow V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$x \cdot 100 = 10 \cdot 1$$

$$x = 0,1 \text{ ml}$$

$$= 0,1 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 9,9 \text{ ml akuades}$$

Dari stok 1% dibuat ekstrak dengan konsentrasi 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, dan 0,05%.

$$0,01\% \rightarrow V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$x \cdot 1 = 10 \cdot 0,01$$

$$x = 0,1$$

$$= 0,1 \text{ ml (ekstrak 1\%)} + 9,9 \text{ ml akuades}$$

$$0,02\% \rightarrow V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$x \cdot 1 = 10 \cdot 0,02$$

$$x = 0,2$$

$$= 0,2 \text{ ml (ekstrak 1\%)} + 9,8 \text{ ml akuades}$$

$$0,03\% \rightarrow V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$x \cdot 1 = 10 \cdot 0,03$$

$$x = 0,3$$

$$= 0,3 \text{ ml (ekstrak 1\%)} + 9,7 \text{ ml akuades}$$

$$0,04\% \rightarrow V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$x \cdot 1 = 10 \cdot 0,04$$

$$x = 0,4$$

$$= 0,4 \text{ ml (ekstrak 1\%)} + 9,6 \text{ ml akuades}$$

$$0,05\% \rightarrow V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$x \cdot 1 = 10 \cdot 0,05$$

$$x = 0,5$$

$$= 0,5 \text{ ml (ekstrak 1\%)} + 9,5 \text{ ml akuades}$$

4.7.2 Persiapan Bakteri *P. aeruginosa* Pembentuk Biofilm

4.7.2.1 Identifikasi *P. aeruginosa*

4.7.2.1.1 Penanaman pada *Mc Conkey* agar

Mc Conkey agar merupakan medium differensial yang bisa digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan merupakan medium differensial untuk bakteri yang meragikan laktosa. Prosedurnya yaitu dilakukan inokulasi bakteri dengan metode streaking pada medium *Mc Conkey* agar. Kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya meliputi apakah bakteri memfentasi laktosa apa tidak, selain itu mengamati bentuk, warna, dan karakteristik koloni.

4.7.2.1.2 Penanaman pada Nutrien Agar Plate

Nutrien Agar merupakan medium yang bisa digunakan untuk menumbuhkan berbagai jenis bakteri. Tujuan dilakukan penanaman *P. aeruginosa* pada medium ini adalah untuk melihat pigmen piosianin yang berwarna biru kehijauan. Komposisi dari medium ini adalah 0.5% Pepton, 0.3% ekstrak beef / ekstrak yeast, 1.5% agar, dan 0.5% NaCl.

4.7.2.1.3 Pemeriksaan Mikroskopis (Forbes et al., 2007)

a. Pembuatan sediaan slide

- Membersihkan gelas obyek dengan kapas
- Kemudian di fiksasi dengan dilewatkan di atas api, lalu biarkan hingga dingin.
- Ditetaskan satu ose aquades steril pada gelas obyek. Ambil 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 lakukan fiksasi dengan cara melewati sediaan di atas api.

b. Pewarnaan Gram

- Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas objek, kemudian diambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan aquadest yang telah diletakkan diatas gelas objek. Kemudian dibiarkan kering di udara.
- Suspensi bakteri yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkannya di atas api beberapa kali da sediaan siap untuk diwarnai.
- Sediaan kemudian ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama satu menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan air perlahan-lahan.
- Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit, lalu lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian alkohol segera dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 100x dengan penambahan minyak emersi.

4.7.2.2 Persiapan Perbenihan Cair Bakteri

- a. Setelah dipastikan bakteri adalah bakteri *P. aeruginosa* bakteri dipindahkan ke dalam tabung yang berisi *trypticase soy broth* (TSB) dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- b. Setelah diinkubasi, suspensi bakteri *P. aeruginosa* pada medium TSB diukur panjang gelombangnya(λ) pada 610nm sehingga diketahui

kepadatan bakterinya (OD = *Optical density*) yang setara dengan kepadatan bakteri 10^8 bakteri/mL. Kemudian dengan rumus pengenceran $N1 \times V1 = N2 \times V2$, kepadatan bakteri tersebut diencerkan dengan NaCl menjadi 10^8 bakteri/mL. Dasar penghitungannya sebagai berikut:

Apabila diperoleh OD bakteri hasil spektrofotometri = 0,5 (N1)

OD bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/mL = 0,1 (N2)

Volume keseluruhan dalam satu tabung = 10 mL (V2)

Rumus : $N1 \times V1 = N2 \times V2$

$$0,5 \times V1 = 0,1 \times 10$$

$$V1 = 1/0,5 = 2 \text{ ml}$$

- c. Suspensi bakteri sebanyak 2 mL diambil dan ditambah dengan 8 mL NaCl menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/ml.
- d. Suspensi bakteri sebanyak 0,5 mL diambil dari kepadatan 10^8 bakteri/ml ditambah dengan 4,5 mL TSBglu menjadi suspensi dengan kepadatan 10^7 CFU/mL.
- e. Setelah itu, dilakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1ml perbenihan cair (10^7 CFU/ml) untuk ditambahkan pada 9ml TSB sehingga akhirnya didapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu sebesar 10^6 CFU/ml.

4.7.2.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

4.7.2.3.1 *Microtiter Plate Test* (Bose et al., 2009)

- a. Bakteri *P. aeruginosa* dikultur semalaman di media TSB di dilusi dari 10^8 menjadi 10^6 pada TSBglu.

- b. Kemudian 200 μ l *P. aeruginosa* konsentrasi 10^6 bakteri/ml diisikan pada baris pertama 96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate
- c. Mikrotiter diinkubasi 24 jam dengan suhu 37° C
- d. Setelah itu, isi setiap sumuran(well) di aspirasi dan dicuci 3 kali menggunakan 200 μ l phosphate-buffered saline (pH 7,2). Well-plates di kocok secara hati-hati untuk menghilangkan seluruh bakteri yang tidak menempel.
- e. Kemudian dilakukan pengecatan dengan kristal violet.
- f. Lalu dilakukan pembilasan dengan menggunakan aquades dan dikeringkan.
- g. Setelah kering biofilm dikatakan positif apabila ditemukan cincin keunguan pada dasar dan dinding sebelah dalam microtiter plate

4.7.3 Uji Hambatan Pembentukan Biofilm (Kala et al., 2012)

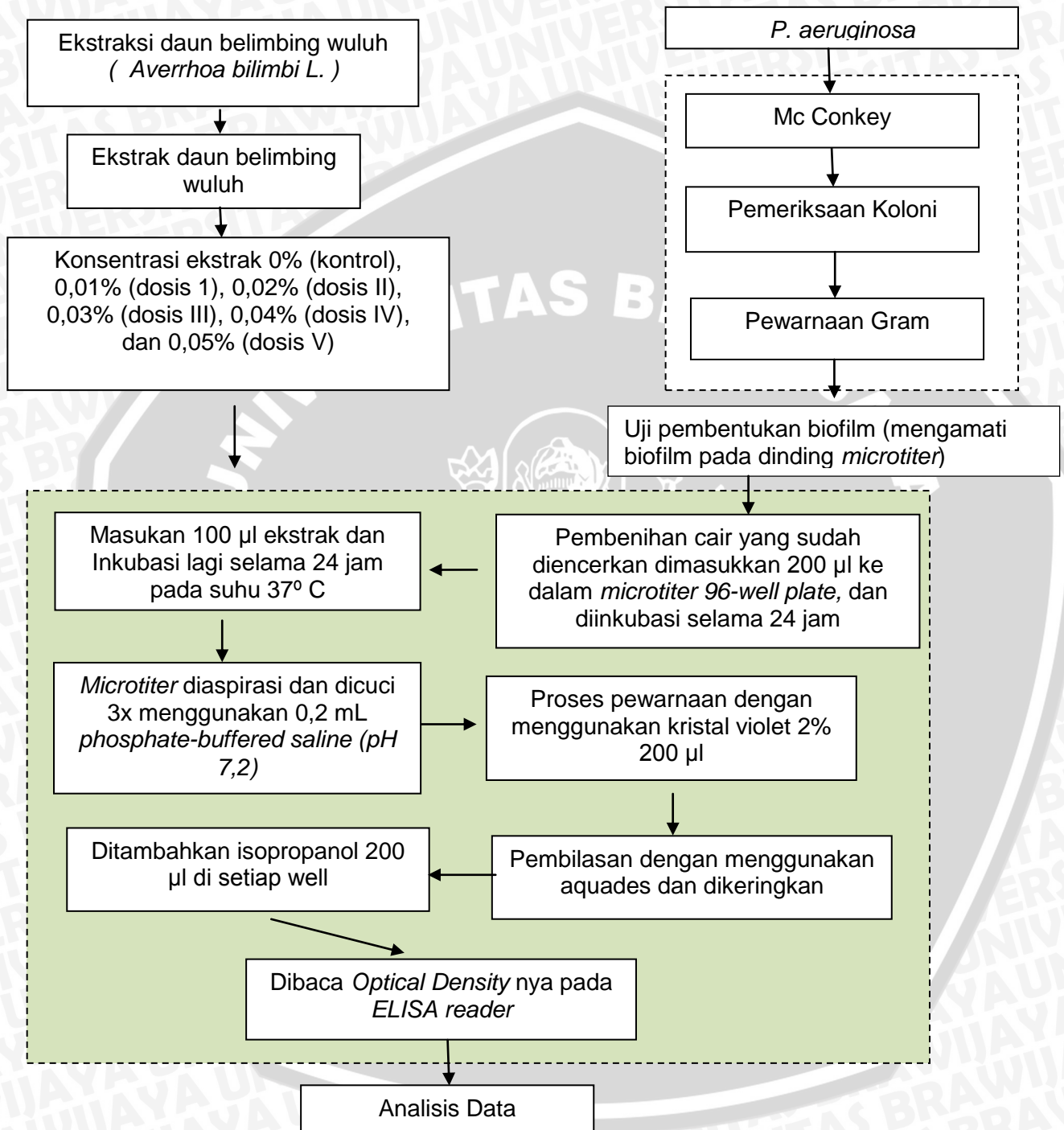
- a. Bakteri *P. aeruginosa* dikultur semalaman di media TSB di dilusi sampai 1:100 pada TSBglu.
- b. Kemudian 200 μ l *P. aeruginosa* konsentrasi 10^6 bakteri/ml diisikan pada baris pertama 96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate lalu inkubasi selama 24 jam.
- c. Tambahkan tiap well dengan 100 μ l ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi yang berbeda-beda yaitu 0,01% (dosis I), 0,02% (dosis II), 0,03% (dosis III), 0,04% (dosis IV), dan 0,05% (dosis V) dan 0 % sebagai kontrol positif.
- d. Mikrotiter diinkubasi 24 jam dengan suhu 37° C.

- e. Setelah itu, isi setiap *well* di aspirasi dan dicuci 3 kali menggunakan 200 μ l *phosphate-buffered saline* (pH 7,2). *Well-plates* di kocok secara hati-hati untuk menghilangkan seluruh bakteri yang tidak menempel.
- f. Kemudian dilakukan pengecatan dengan kristal violet 2% sebanyak 200 μ l.
- g. Dilakukan pembilasan dengan menggunakan aquades dan dikeringkan.
- h. Untuk menganalisis secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 200 μ l isopropanol HCl di setiap *well*.
- i. Kemudian dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) pada 570 nm menggunakan *Elisa reader*.

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari pembacaan di *Elisa reader* yang berupa *Optical Density* (OD) setiap *well-plates* microtiter yang diberi perlakuan berbeda, yaitu pemberian ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 0% (kontrol), 0,01% (dosis 1), 0,02% (dosis II), 0,03% (dosis III), 0,04% (dosis IV), dan 0,05% (dosis V). Analisis data yang digunakan adalah Uji *One Way ANOVA* dan Uji Korelasi *Pearson*. Uji *One Way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh antara berbagai konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh terhadap OD bakteri. Sedangkan Uji Korelasi *Pearson* digunakan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh terhadap OD bakteri. Analisis data menggunakan program SPSS for Windows (*Statistical Product of Service Solution*).

4.9 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian