

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik yaitu dengan memberikan perlakuan, adanya kelompok kontrol, dan sampel yang dirandomisasi. Bentuk desain penelitian ini menggunakan *Post Test Only Control Group*. Dalam penelitian ini dilakukan uji laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan efek antibakteri dari ekstrak kulit anggur Bali terhadap pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus*. Adapun uji kepekaan antibakteri yang dipakai adalah dengan metode dilusi agar untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dikarenakan ekstrak kulit anggur Bali yang digunakan dalam penelitian ini berwarna ungu yang terlalu pekat sehingga dapat mengganggu visualisasi untuk menentukan KHM dengan metode dilusi tabung.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini dimulai dari bulan Agustus – November tahun 2013.

4.3 Estimasi Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang didapatkan dari swab tenggorok.

Banyaknya sampel dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$p(n-1) \geq 15 \quad (\text{Solimun, 2001})$$

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n = 4$$

Keterangan :

n = Jumlah Sampel

p = Jumlah Perlakuan (konsentrasi)

Karena penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi (1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3% $\%$) dari ekstrak kulit anggur Bali dan 1 kontrol bakteri *Staphylococcus aureus* tanpa diberi ekstrak kulit anggur Bali ($p=5+1=6$). Setelah dilakukan perhitungan dengan rumus diatas, maka didapatkan $n=4$. Dengan demikian, untuk memenuhi persyaratan uji statistik diperlukan sedikitnya 4 sampel isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi sel masing-masing bakteri uji adalah 10^6 CFU/ml

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kulit anggur Bali yaitu 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3% $\%$. Konsentrasi tersebut didapatkan melalui eksplorasi (penelitian pendahuluan).

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada media agar padat untuk menentukan KHM.

4.5 Definisi Operasional

- a) Kulit buah anggur yang digunakan adalah kulit buah anggur jenis anggur Bali yang sudah matang yang dipisahkan dari daging dan biji anggur. Anggur Bali ini dibeli di kelompok tani anggur Amertha Nadi dari perkebunan masyarakat desa Banjar, Kecamatan Banjar, Kabupaten Buleleng- Bali.
- b) Sediaan ekstrak kulit buah anggur Bali adalah meliputi pengumpulan kulit buah anggur Bali, pencucian, dan pengolahan menjadi serbuk kering yang siap untuk diekstraksi dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dan kemudian dievaporasi.
- c) Isolat bakteri adalah 4 isolat bakteri *Staphylococcus aureus* yang berasal dari penderita infeksi tenggorokan dan disimpan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- d) Hasil penelitian untuk KHM dinyatakan dalam bentuk *scoring* +4, +3, +2, +1, dan 0 yang berarti +4 koloni tumbuh sangat tebal dan tidak terhitung, +3 koloni tumbuh tebal dan tidak terhitung, +2 koloni tumbuh tipis dan tidak terhitung, +1 koloni tumbuh tipis dan terhitung, dan 0 berarti tidak ada pertumbuhan bakteri.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak kulit anggur Bali adalah blender, penimbang, kertas saring, *vacuum oven* atau *drying oven*, *rotary evaporator*, tabung pendingin, pemanas aquadest, labu penampung hasil evaporasi, tabung pendingin, evaporator dengan vakum, dan cawan penguap.

Alat yang digunakan untuk identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* adalah spidol permanen, *plate* kosong dan steril, gelas objek, ose, mikroskop, kertas penghisap dan lampu spiritus. Alat yang digunakan untuk pembuatan suspensi bakteri uji adalah spektrofotometer, tabung reaksi steril, *vortex*, inkubator, dan kapas. Alat yang digunakan dalam uji antibakteri ekstrak kulit buah anggur Bali adalah *agar plate* kosong yang steril untuk media agar, spidol permanen, penggaris, mikropipet 1000 μ l, mikropipet 200 μ l, *falcon* 15 ml, inkubator, lampu spiritus, korek api.

4.6.2 Bahan

Bahan untuk pembuatan ekstrak kulit anggur Bali adalah kulit anggur Bali yang telah dikeringkan dan dihaluskan hingga menjadi serbuk 250 gram, aquadest steril, pelarut etanol 96%. Bahan yang digunakan untuk identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* antara lain pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin), minyak emersi, *Staphaurex*, H₂O₂ 3%, air, MSA (*Mannitol Salt Agar*). Bahan yang digunakan untuk pembuatan suspensi bakteri uji adalah 4 isolat *Staphylococcus aureus*, NaCl 0,9%, *Nutrient Broth*. Bahan yang digunakan dalam uji antibakteri ekstrak kulit buah anggur Bali adalah ekstrak kulit anggur Bali, bakteri uji *Staphylococcus aureus* dengan kepadatan 10⁶ CFU/ml, dan *Mueller Hinton Agar* (MHA).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Bahan Uji (Ekstrak Kulit Buah Anggur Bali)

4.7.1.1 Proses Ekstraksi

Kulit buah anggur Bali yang sudah dipisahkan dengan daging dan bijinya, dikeringkan menggunakan vakum oven dengan suhu 45°C. Setelah itu kulit buah anggur Bali tersebut dihaluskan dengan menggunakan blender. Jika

telah halus, ditimbang seberat 250 gram lalu dibungkus menggunakan kertas saring dan direndam dalam etanol 96% selama semalam (± 12 jam). Etanol 96% yang digunakan untuk merendam, diganti beberapa kali sampai larutan ekstrak jernih. Kemudian hasil ekstraksi siap untuk dievaporasi.

4.7.1.2 Proses Evaporasi

Evaporator set dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan $30-40^{\circ}$ terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin. Kemudian tabung pendingin dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui pipa 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 dinyalakan. Pemanas aquades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih dengan suhu 80°C dan etanol mulai menguap.

Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.

Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven selama 2 jam pada suhu 80°C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstrak 100%.

4.7.2 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Dibuat sediaan apusan bakteri pada gelas objek, dikeringkan diudara kemudian dilakukan fiksasi. Tuangkan kristal violet ke atas sediaan dan dibiarkan selama 1 menit, sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air. Kemudian tuangkan lugol ke atas sediaan dan dibiarkan selama 1 menit, sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air. Tuangkan alkohol 96% ke atas sediaan sebagai peluntur selama 5-10 detik, sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air. Tuangkan safranin ke atas sediaan dan dibiarkan selama 30 detik, sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.

Kemudian sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, lalu tetesi minyak emersi dan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 100 kali. Hasil positif bakteri *Staphylococcus aureus* tercatat ungu (Gram positif).

4.7.2.2 Tes Katalase

Untuk membedakan *Staphylococcus* dengan *Streptococcus* dilakukan tes katalase, yaitu menambahkan larutan H_2O_2 3% sebanyak 1-2 tetes atau secukupnya pada perbenihan cair. Selain itu dapat dilakukan juga dengan mengambil 1 koloni bakteri dan ditambahkan H_2O_2 3% secukupnya pada gelas objek kemudian diamati. *Staphylococcus* menunjukkan hasil yang positif yaitu dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara.

4.7.2.3 Tes Koagulase

Tes koagulase bertujuan untuk membedakan *S.aureus* dengan jenis *Staphylococcus* yang lainnya dan untuk menentukan patogenitasnya. *S.aureus* bersifat koagulase positif. Pada gelas objek ditetesi dengan 1 tetes larutan salin atau aquadest steril dan ditambahkan 1 koloni bakteri kemudian ditambahkan

dengan 1 tetes *Staphaurex* dan campur dengan cara menggoyang gelas objek arah melingkar selama $\pm 5-10$ detik. Apabila hasilnya positif tampak gumpalan-gumpalan putih (*clumping*).

4.7.2.4 Penanaman pada Medium MSA (*Mannitol Salt Agar*)

Bakteri yang akan diuji distreaking pada medium *Mannitol Salt Agar* sehingga dihasilkan koloni yang terpisah dan diinkubasi selama 24-48 jam. Dari koloni tersebut diamati sifat fermentasi manitol berupa adanya daerah terang (halo) berwarna kuning disekitar koloni *Staphylococcus aureus*.

4.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji (10^6 CFU/ml)

Koloni diambil dari NAP ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth*. Tabung reaksi tersebut lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah itu dilakukan pemeriksaan spektrofotometri pada hasil kultur medium cair *Nutrient Broth*, dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui kepadatan bakteri / *Optical Density (OD)* dari suspensi. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml yang setara dengan *OD (Optical Density) = 0,1* maka dilakukan perhitungan sebagai berikut :

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan :

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V_2 = Volume Suspensi bakteri uji (10ml)

N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^8 CFU/ml)

Dari perhitungan tersebut diperoleh volume (dalam ml) bakteri (V_1) yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8

CFU/ml sebanyak 10 ml. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10ml, selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali sehingga diperoleh suspensi bakteri sebanyak 10 ml dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml. Kini suspensi bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

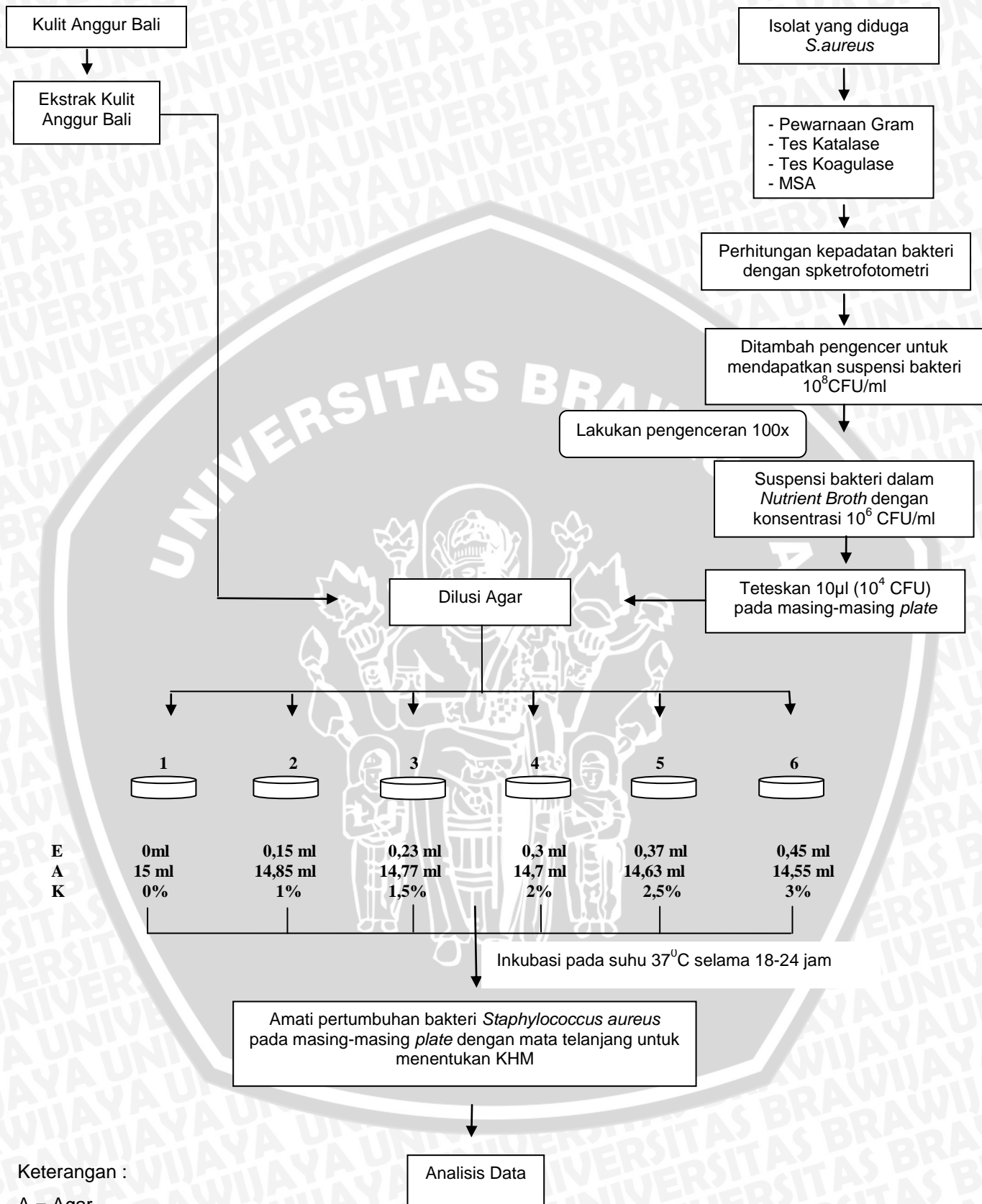
4.7.3 Uji Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Anggur Bali

Disediakan *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah disterilisasi dengan menggunakan autoklaf terlebih dahulu, larutan ekstrak kulit anggur Bali, dan 4 suspensi bakteri uji. Selanjutnya siapkan 6 *agar plate* steril berdiameter 9 cm, beri tanda 0%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3% $\frac{1}{v}$. Volume total dari *agar plate* diasumsikan sebesar 15ml. Untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak kulit anggur Bali sebesar 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, dan 0% $\frac{1}{v}$, maka campurkan 14,85 ml MHA dan 0,15 ml ekstrak kulit anggur Bali dalam *agar plate* yang bertanda 1%. Campurkan 14,77 ml MHA dan 0,23 ml ekstrak kulit anggur Bali ke dalam *agar plate* yang bertanda 1,5%. Campurkan 14,7 ml MHA dan 0,3 ml ekstrak kulit anggur Bali ke dalam *agar plate* yang bertanda 2%. Campurkan 14,63 ml MHA dan 0,37 ml ekstrak kulit anggur Bali ke dalam *agar plate* yang bertanda 2,5%. Campurkan 14,55 ml MHA dan 0,45 ml ekstrak kulit anggur Bali ke dalam *agar plate* yang bertanda 3%. Tuangkan 15 ml MHA kedalam *agar plate* yang bertanda 0% (Kontrol Bakteri).

Ditunggu hingga agar memadat dan permukaannya menjadi kering. Setelah agar memadat, setiap *plate* tersebut dibagi menjadi 4 bagian untuk masing – masing isolat karena dalam penelitian ini menggunakan 4 isolat bakteri *S.aureus*. Kemudian diambil ke empat suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* hasil standarisasi spektrofotometer yang telah diencerkan sehingga memiliki konsentrasi akhir 10^6 CFU/ml. Teteskan diatas agar 1 tetes bakteri dengan

menggunakan mikropipet. Volume 1 tetes mikropipet setara dengan 10 μ l suspensi bakteri yang mengandung 10⁴ CFU/10 μ l kedalam setiap media agar. Sekarang, konsentrasi bahan uji dalam masing-masing dalam *agar plate* adalah sebagai berikut: *Agar plate* 1-5 menjadi 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3% $\frac{v}{v}$, dan 0% (Kontrol Bakteri) dengan volume dalam masing-masing *agar plate* sekarang menjadi 15 ml. Setelah itu, inkubasi semua *plate* pada suhu 37^oC selama 18-24 jam. Setelah 18-24 jam dilihat pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada masing-masing *plate*. Konsentrasi terendah ekstrak yang tidak ditemukan pertumbuhan koloni disebut sebagai KHM (CLSI, 2006).





Keterangan :

A = Agar

E = Ekstrak kulit anggur Bali

K = Konsentrasi

Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

4.8 Pengumpulan Data

Data didapatkan dengan cara kualitatif. Cara kualitatif pada pengamatan dengan melihat dengan mata telanjang apakah ada pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada *agar plate* yang sebelumnya telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Konsentrasi ekstrak kulit anggur Bali terendah yang tidak ditemukan pertumbuhan koloni menunjukkan KHM.

4.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah uji statistik nonparametrik dikarenakan data hasil penelitian berupa data ordinal, sehingga uji statistik parametrik tidak dapat digunakan. Uji statistik nonparametrik yang digunakan diantaranya ialah uji statistik Kruskal Wallis untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak kulit anggur Bali (*Vitis vinifera L. var. Alphonso lavalle*) terhadap pertumbuhan bakteri *S.aureus* sehingga dapat disimpulkan apakah ekstrak kulit anggur Bali mempunyai pengaruh antibakteri yang signifikan terhadap bakteri *S.aureus*. Selain itu dilakukan uji Mann Whitney untuk membandingkan perlakuan mana saja yang menyebabkan pertumbuhan bakteri *S.aureus* cenderung berbeda secara signifikan atau tidak berbeda, serta uji korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian ekstrak kulit anggur Bali terhadap pertumbuhan koloni bakteri *S.aureus*. Dalam penelitian ini, analisis statistik dilakukan pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).