

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah *True Experimental – Post test only Control Group Design* dengan menggunakan ekstrak etanol bunga kecombrang terhadap pertumbuhan *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* secara *in vitro* melalui metode difusi sumuran untuk menentukan zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

4.2 Populasi dan Sampel

Pada penelitian ini digunakan bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bunga kecombrang (*Etlingera elatior*) didapatkan dari perkebunan desa Banyumudal, Kebumen.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu penelitian dilakukan pada bulan September - Nopember 2014.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas (Independen)

Konsentrasi larutan ekstrak etanol bunga kecombrang (25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, dan 100%).

4.4.2 Variabel tergantung (dependen)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona inhibisi yang tampak di sekitar lubang sumuran.

4.5 Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan 6 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus estimasi pengulangan sebagai berikut (Loekito 1998) :

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 21/6$$

$$n \geq 3,5 \rightarrow 4$$

Jadi pada penelitian ini masing – masing perlakuan dilakukan 4 kali pengulangan.

Keterangan :

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (konsentrasi ekstrak bunga kecombrang)

4.6 Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol bunga kecombrang (*Etlingera elatior*) adalah hasil ekstrak bunga kecombrang dengan pelarut etanol 96%.
- b. Antimikroba adalah suatu zat yang dapat menghambat atau membunuh mikroba.
- c. Bakteri yang digunakan adalah isolat *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- d. Metode difusi sumuran yaitu dengan cara membuat lubang pada campuran agar *Mueller Hinton* dan suspensi bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/ml yang telah mengeras di dalam cawan petri. Ekstrak bunga kecombrang ditetaskan sebanyak 100 mikroliter pada lubang sumuran tersebut.
- e. Zona inhibisi adalah zona bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dan menunjukkan bahwa bahan antimikroba dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin lebar zona inhibisi, semakin rentan bakteri tersebut terhadap ekstrak kecombrang.
- f. Diameter zona inhibisi diukur dalam satuan milimeter (mm).

4.7 Bahan dan Alat Penelitian

4.7.1 Untuk Pembuatan Ekstrak

1. Alat
 - Vacuum oven
 - Gelas kimia 250 ml
 - Kertas saring whatman no 40

- Timbangan analitik
- Botol timbang (cawan petri)
- Spatula
- Desikator
- Penjepit cawan petri
- Timble
- Blender

2. Bahan

- Bunga kecombrang
- Botol hasil ekstraksi
- Etanol 96%
- Akuades

4.7.2 Untuk identifikasi bakteri

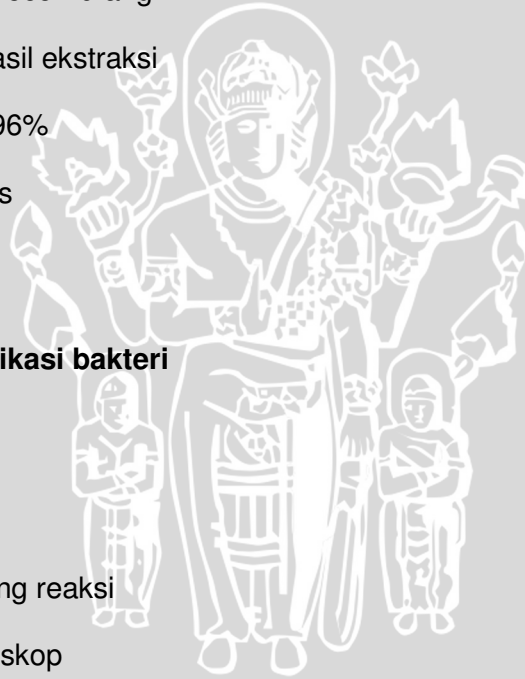
1. Alat

- a. Ose
- b. Tabung reaksi
- c. Mikroskop
- d. Kertas penghisap
- e. Minyak emersi
- f. Lampu spirtus

2. Bahan

- a. Isolat *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
- b. Nutrient Broth

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



- c. *Mueller Hinton Agar*
- d. *Cefoxitin disk*
- e. *CHROMagar*
- f. *Phenyl red mannitol salt agar*
- g. *Glass object*
- h. *Kristal Violet*
- i. *Akuades*
- j. *Larutan lugol*
- k. *Alkohol 96%*
- l. *Safranin*

4.7.3 Untuk Uji Kepekaan Ekstrak Bunga Kecombrang

1. Alat
 - a. Plate kosong dan steril
 - b. Mikropipet 1 ml
 - c. Inkubator
 - d. Lampu Spirtus
 - e. Vorteks
 - f. Pelubang sumuran
 - g. Jangka sorong
2. Bahan
 - a. Perbenihan cair bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
 - b. Ekstrak bunga kecombrang

- c. Agar *Mueller Hinton*
- d. Akuades

4.8 Metode Pengumpulan Data

4.8.1 Pembuatan ekstrak bunga kecombrang.

1. Proses pengeringan

- Cuci bersih 3 kilogram bunga kecombrang yang akan dikeringkan.
- Potong kecil-kecil.
- Kemudian dikeringkan dengan cara di oven.

2. Proses ekstraksi

- Setelah kering, bunga kecombrang dihaluskan dengan blender hingga berbentuk bubuk.
- Timbang sebanyak 300 gram bubuk bunga kecombrang.
- Masukkan 300 gram sampel kering ke dalam labu erlenmeyer ukuran 1 liter.
- Tuangkan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 3 (300 gram bubuk bunga kecombrang dalam 900 ml etanol 96%).
- Rendam bahan dengan etanol 96% volume 900 ml, dan diamkan pada suhu kamar selama minimal 2 x 24 jam dengan sesekali diaduk.
- Setelah 2 x 24 jam, saring bahan dengan menggunakan kertas saring whatman no 40 dan pelarut yang diperoleh (yang mengandung bahan aktif) di evaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut.

3. Proses evaporasi

- Oven sisa pelarut yang masih tersisa dengan vacuum oven pada suhu 40 – 50 C hingga bahan benar-benar tidak mengandung pelarut.

- Adanya hasil evaporasi berupa cairan berwarna coklat kemerahan sebanyak 80 ml.

4.8.2 Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

a. Inokulasi pada Media CHROMagar

- Siapkan biakan bakteri pada medium cair *phenol red*.
- Lakukan *streaking* bakteri pada CHROMagar inkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- Amati hasil koloni yang muncul, jika koloni yang muncul berwarna merah muda maka bakteri tersebut positif *Staphylococcus aureus*

b. Inokulasi pada *Nutrient Agar Plate* (NAP)

- Siapkan biakan bakteri pada *nutrient broth*
- Lakukan *streaking* bakteri pada NAP
- Inkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- Amati koloni bakteri pada NAP. koloni *Staphylococcus aureus* pada NAP akan membentuk pigmen berwarna kuning emas. Koloni yang tumbuh berbentuk bulat, berdiameter 1-2 mm, konveks dengan tepi rata, permukaan mengkilat dan konsistensinya lunak.

c. Pewarnaan Gram

1. Dibuat sediaan (slide), dikeringkan di udara kemudian di lakukan fiksasi.
2. Sediaan dituangi kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit.
3. Sisa bahan pewarna dibuang dan dibilas dengan air.

4. Sediaan dituangi larutan lugol sebagai *mordant*, dibiarkan selama 1 menit.
5. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
6. Sediaan dituangi alkohol 96% sebagai peluntur selama 5-10 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 dikeringkna dengan kertas penghisap, ditetesi minyak imersi.
11. Lihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 97-100x. Hasil gram positif ditunjukkan dengan warna ungu. Bakteri *Staphylococcus aureus* berbentuk kokus atau bulat menggerombol.

d. Uji katalase

- Siapkan biakan bakteri pada NAP
- Teteskan larutan hidrogen peroksida ke atas koloni bakteri NAP.
- Uji katalase positif jika terbentuk gelembung-gelembung gas O₂ akibat adanya reaksi enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen.
- Uji katalase untuk membedakan *Staphylococcus* dengan *Streptococcus*.
Staphylococcus jika uji katalasenya positif.

e. Uji koagulase

- Ambil satu ose akuades lalu letakkan pada object glass
- Ambil satu koloni bakteri dengan menggunakan ose, lalu campur dengan akuades pada object glass.

- Tambahkan satu tetes *Staphylococcus aureus*
- Uji koagulase positif jika terbentuk gumpalan pada object glass.
- Uji koagulase dilakukan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus saprophyticus* yang bersifat koagulase negatif.
- *Staphylococcus aureus* jika uji koagulasenya positif.

f. Uji kepekaan terhadap *Cefoxitin Disk*

- Dengan lidi kapas steril, ambil biakan cair bakteri dari tabung yang disediakan
- Lidi kapas kemudian ditekan pada tepi tabung (supaya tidak terlalu basah), dan dioleskan pada *Mueller Hinton Agar* sampai permukaannya rata mengandung kuman.
- Setelah sedikit mengering (dibiarkan kira-kira 2 menit) dipasang cefoxitin disk. Jarak cakram dari tepi plate tidak kurang dari 15 mm, jarak cakram dengan cakram tidak kurang dari 24 mm, dan sekali cakram sudah ditempelkan pada agar, tidak boleh dipindahkan.
- Setelah disk terpasang, sediaan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Tentukan diameter daerah hambatan pertumbuhan kuman di sekitar cakram *cefoxitin* tersebut dengan cara diukur dengan penggaris dan dicocokkan dengan tabel CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Bakteri dikatakan resisten terhadap cefoxitin jika diameter zona inhibisi ≤ 21 mm dan dikatakan sensitif bila diameter inhibisi ≥ 21 mm. Bila hasilnya resisten maka bakteri tersebut adalah MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*).

4.8.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

- a) Setelah dipastikan bakteri adalah *Staphylococcus aureus*, selanjutnya bakteri dipindahkan ke dalam tabung yang berisi *nutrient broth* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- b) Kemudian perbenihan cair bakteri dinilai kepadatannya (OD = Optical Density) dengan spektrofotometer pada gelombang cahaya 625 nm. Dari nilai *optical density*-nya dapat diperkirakan jumlah kuman pada perbenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui yaitu OD = 0,1 ekuivalen dengan jumlah kuman sebesar 10^8 CFU/ml, dengan penghitungan sebagai berikut :

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

V_1 = Volume bakteri yang ditambah pengencer

N_1 = OD bakteri hasil spektrofotometri

N_2 = OD bakteri dengan kepadatan 1×10^8 bakteri/ml

V_2 = volume suspensi kuman

4.8.4 Penelitian Pendahuluan

Sebelum memulai penelitian dilakukan penelitian pendahuluan. Penelitian pendahuluan bertujuan untuk menentukan dosis yang akan digunakan pada penelitian utama.

- a. Siapkan alat dan bahan.
- b. Cawan petri sebanyak 5 buah diberikan tanda untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol bunga kecombrang yang akan dimasukkan.
- c. Suspensi bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/ml dicampurkan dengan agar *Mueller Hinton* sebanyak 15 ml dalam cawan petri.
- d. Cawan petri digoyang-goyangkan sehingga suspensi bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* dan agar *Mueller Hinton* tercampur dengan baik. Kemudian dibiarkan beberapa saat hingga mengeras.
- e. Campuran agar *Mueller Hinton* dan suspensi bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/ml dibagi empat dengan menggunakan penggaris.
- f. Lubang sumuran dibuat pada keempat sisi campuran agar *Mueller Hinton* dan suspensi bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/ml yang telah dibagi sebelumnya, dengan menggunakan pelubang sumuran.
- g. Konsentrasi ekstrak etanol bunga kecombrang dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 50%, dan 100% sebanyak 100 mikroliter dimasukkan pada tiap-tiap cawan petri yang telah ditandai.
- h. Cawan petri dimasukkan kedalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu 37°C .
- i. Mengukur diameter zona inhibisi yang terbentuk disekitar lubang sumuran dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm).

Dari penelitian pendahuluan dapat diketahui konsentrasi yang tidak didapatkan pertumbuhan bakteri MRSA (tidak terbentuk zona inhibisi) adalah konsentrasi 12,5%. Dari angka ini dapat ditentukan konsentrasi yang tepat untuk dilakukan pada penelitian utama, yaitu antara konsentrasi 25% - 50%.

4.8.5 Uji Kepekaan Ekstrak Bunga Kecombrang terhadap *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

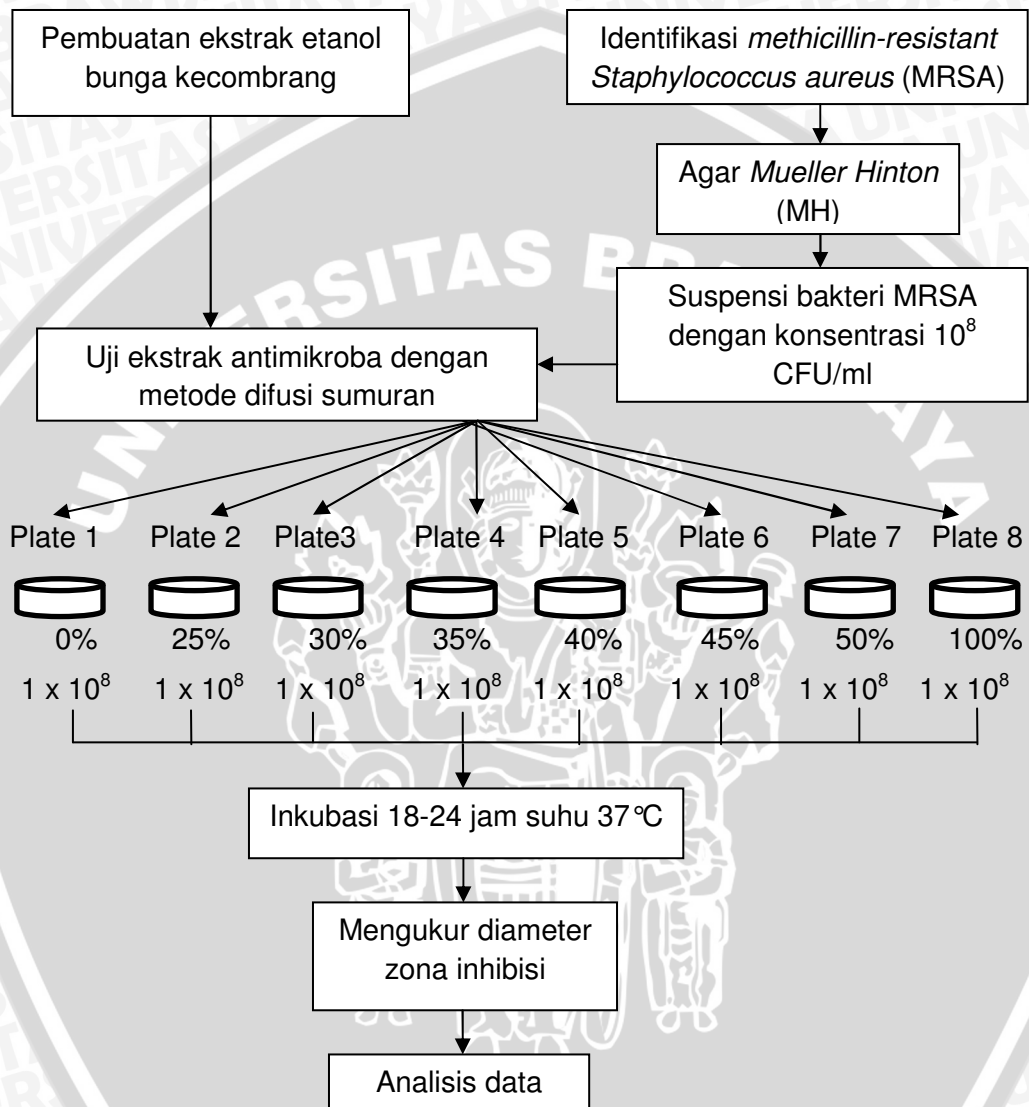
Rangkaian uji kepekaan antimikroba ekstrak etanol bunga kecombrang menggunakan metode sumuran adalah sebagai berikut :

- a. Siapkan alat dan bahan.
- b. Cawan petri sebanyak 8 buah diberikan tanda untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol bunga kecombrang yang akan dimasukkan.
- c. Suspensi bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/ml dicampurkan dengan agar *Mueller Hinton* sebanyak 15 ml dalam cawan petri.
- d. Cawan petri digoyang-goyangkan sehingga suspensi bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* dan agar *Mueller Hinton* tercampur dengan baik. Kemudian didiamkan beberapa saat hingga mengeras.
- e. Campuran agar *Mueller Hinton* dan suspensi bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/ml dibagi empat dengan menggunakan penggaris.
- f. Lubang sumuran dibuat pada keempat sisi campuran agar *Mueller Hinton* dan suspensi bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/ml yang telah dibagi sebelumnya, dengan menggunakan pelubang sumuran.
- g. Konsentrasi ekstrak etanol bunga kecombrang dengan konsentrasi 0%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, dan 100% sebanyak 100 mikroliter dimasukkan pada tiap-tiap cawan petri yang telah ditandai. Konsentrasi 0% sebagai kontrol kuman, sedangkan konsentrasi 100% sebagai kontrol bahan.

- h. Cawan petri dimasukkan kedalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu 37°C .
- i. Mengukur diameter zona inhibisi yang terbentuk disekitar lubang sumuran dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm).



4.8.6 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

Keterangan :

CFU = Colony-Forming Unit

MH = Mueller Hinton

4.9 Pengumpulan dan Analisis Data

Analisis yang digunakan adalah dengan menggunakan uji normalitas data. Uji normalitas digunakan untuk melihat data tersebut parametric atau nonparametric. Uji komparasi dilakukan menggunakan Uji ANOVA dengan menggunakan program SPSS 16.0 untuk Windows, dengan batas kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) (bermakna bila $p < 0,05$). Uji One Way ANOVA digunakan untuk mengetahui untuk mengetahui perbedaan nyata antar konsentrasi ekstrak etanol bunga kecombrang terhadap pertumbuhan koloni *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

Dalam penelitian ini, uji One Way ANOVA dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat beda signifikan dari konsentrasi ekstrak etanol bunga kecombrang terhadap pertumbuhan *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Uji *Post Hoc-Tukey* untuk mengetahui pasangan kelompok sampel yang memberikan perbedaan yang signifikan. Uji korelasi untuk mengetahui hubungan antara variabel dependen dan variabel independen. Dalam penelitian ini, tujuan uji korelasi adalah untuk mengetahui apakah terdapat hubungan yang bermakna antara pemberian ekstrak etanol bunga kecombrang dengan zona inhibisi. Uji regresi dilakukan untuk mengetahui keeratan hubungan antara variabel dependen dan variabel independen. Tujuan dari uji regresi adalah untuk mengetahui sejauh mana keeratan hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan kemampuan difusi. Dengan uji regresi ini akan terlihat bentuk hubungannya, apakah hubungan lurus atau hubungan berbanding terbalik.