

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik *in vitro* dengan desain penelitian *true experimental post control design only*. Metode yang digunakan adalah metode dilusi agar untuk membuktikan kemampuan antimikroba ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens* L.) terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM).

4.2 Sampel dan Estimasi Jumlah Pengulangan

Sampel yang digunakan adalah isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Yogyakarta.

Estimasi jumlah pengulangan sampel dihitung berdasarkan rumus (Solimun, 2001):

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan 7 macam perlakuan yaitu ekstrak etanol daun seledri konsentrasi 0%, ekstrak etanol daun seledri konsentrasi 0,25%, ekstrak etanol daun seledri konsentrasi 0,5%, ekstrak etanol daun seledri konsentrasi 0,75%, ekstrak etanol daun seledri konsentrasi 1%, ekstrak etanol daun seledri konsentrasi 1,25% dan ekstrak etanol daun seledri konsentrasi 1,5%, maka:

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \text{ (dibulatkan ke atas menjadi 4)}$$

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens* L.) dengan konsentrasi 0%; 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1%; 1,25% dan 1,5%.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

4.4 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus-November 2015.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Penyediaan Daun Seledri

Bahan yang digunakan adalah daun seledri yang diperoleh dan diidentifikasi dari Balai Material Medika (BMM) Kota Batu.

4.5.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Seledri

- a. Timbangan
- b. Gelas ukur
- c. Oven dan *freezer*
- d. Filter (kertas saring dan corong)
- e. Evaporator
- f. Maserator berpengaduk elektronik
- g. Perangkat destilasi dan pengering beku untuk menguapkan pelarut
- h. Tabung Erlenmeyer
- i. Daun seledri
- j. Larutan etanol 96%
- k. Akuades

4.5.3 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

4.5.3.1 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram

- a. Ose

- b. Kertas penghisap
- c. Mikroskop
- d. Gelas obyek
- e. Tabung reaksi
- f. Pembakar spiritus
- g. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- h. Bahan pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alcohol 96%. safranin)
- i. Minyak emersi

4.5.3.2 Alat dan Bahan untuk Tes Katalase

- a. Gelas obyek
- b. Pipet
- c. Ose
- d. Isolat Bakteri *Aggregatibacter actionmycetemcomitans*
- e. Larutan H₂O₂ 3%
- f. Akuades

4.5.3.3 Alat dan Bahan untuk Tes Oksidase

- a. Kertas filter
- b. Reagen oksidase
- c. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

4.5.3.4 Alat dan Bahan untuk Uji Agar *MacConkey*

- a. Cawan Petri
- b. Ose
- c. Inkubator

- d. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- e. Media *MacConkey* agar

4.5.3.5 Alat dan Bahan untuk Uji Hemolisis

- a. Cawan Petri
- b. Ose
- c. Inkubator
- d. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- e. *Blood Agar Plate* (BAP)

4.5.3.6 Alat dan Bahan dengan Uji Biokimia dengan *Microbact Kit*

- a. *Microbact Kit*
- b. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Agar

- a. Tabung reaksi
- b. Cawan petri
- c. Inkubator
- d. Mikropipet
- e. Ose
- f. Pembakar spirtus
- g. Vortex
- h. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- i. Media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*)
- j. Media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*)
- k. Akuades steril

1. Ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens* L.) dalam beberapa konsentrasi

4.6 Definisi Operasional

1. Daun seledri yang digunakan adalah daun seledri (*Apium graveolens* L.) hijau dan segar yang kemudian dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk yang didapat dari Balai Material Medika Kota Batu.
2. Ekstraksi daun seledri menggunakan metode maserasi dengan bahan pelarut etanol 96%.
3. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang digunakan diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Yogyakarta dan diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Standar kepadatan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1×10^6 CFU/ml.
4. Uji kepekaan antimikroba metode dilusi agar (*agar dilution test*) adalah uji kepekaan yang dilakukan secara *in vitro* dengan mencampur bahan antimikroba yang diuji dengan konsentrasi berbeda ke dalam media agar, yang kemudian ditambahkan dengan perbenihan cair yang telah mengandung bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
5. Kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah kelompok yang diberi ekstrak etanol daun seledri dengan konsentrasi 0,25%, ekstrak etanol daun seledri konsentrasi 0,5%, ekstrak etanol daun seledri konsentrasi 0,75%, ekstrak etanol daun seledri konsentrasi 1%, ekstrak etanol daun seledri konsentrasi 1,25% dan ekstrak etanol daun seledri konsentrasi 1,5%.

6. Kontrol bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelompok yang hanya berisi agar dengan tetesan bakteri.
7. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal bahan coba (ekstrak etanol daun seledri) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi, dimana tidak ditemukan koloni bakteri yang tumbuh pada media agar.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Seledri

- a. Daun seledri yang akan digunakan dipilih terlebih dahulu, dilanjutkan dengan pencucian di bawah air mengalir dan diambil sebanyak 2 kg.
- b. Daun seledri yang telah bersih dikeringkan oven dengan suhu 80°C.
- c. Setelah kering daun seledri diblender sehingga didapatkan serbuk halus, kemudian ditimbang dan ambil sebanyak 200 gram.
- d. Serbuk daun seledri tersebut dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer kemudian ditambahkan larutan etanol 96% sampai volume 1 liter.
- e. Tutup tabung Erlenmeyer dengan rapat lalu dilakukan pengadukan dengan maserator berpengaduk elektrik sampai benar-benar tercampur selama kurang-lebih 30 menit dan disimpan pada suhu kamar selama 24 jam.
- f. Setelah 24 jam, campuran tersebut disaring dengan kertas filter untuk memisahkan filtrat dan ampas.
- g. Dilakukan proses evaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak menggunakan evaporator.

- h. Setelah dilakukan evaporasi, hasilnya dioven dengan suhu 40°C untuk menghilangkan sisa pelarut yang mungkin belum menguap.
- i. Diperoleh hasil akhir ekstrak etanol daun seledri dengan konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam percobaan.

4.7.2 Uji Identifikasi Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui jenis bakteri tersebut termasuk Gram positif atau Gram negatif. Pewarnaan Gram dilakukan dengan mewarnai bakteri menggunakan kristal violet dan safranin, kemudian hasilnya dilihat di bawah mikroskop perbesaran 1000x.

- a. Dibuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan di udara.
- b. Sediaan yang telah kering difiksasi di atas api bunsen.
- c. Sediaan diberi larutan kristal violet selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir.
- d. Sediaan diberi larutan lugol selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir.
- e. Sediaan diberi larutan alkohol 96% selama 5-10 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir.
- f. Sediaan diberi safranin, diamkan selama 30 detik, lalu bilas dengan air.
- g. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x.

- h. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan bakteri Gram negatif yang menunjukkan warna merah.



Gambar 4.1 Pewarnaan Gram Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

4.7.2.2 Tes Katalase

Tes katalase ini bertujuan untuk mendeteksi adanya enzim katalase yang diproduksi oleh bakteri. Uji ini dilakukan dengan cara menambahkan larutan H_2O_2 3% pada perbenihan cair.

- Sediakan perbenihan bakteri pada gelas obyek
- Kemudian sediaan ditetesi larutan H_2O_2 3%
- Mengamati timbulnya gelembung-gelembung udara pada gelas obyek
- Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil tes katalase positif melalui timbulnya gelembung-gelembung udara.

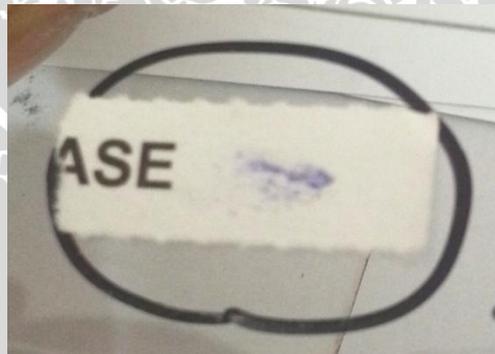


Gambar 4.2 Hasil Tes Katalase Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

4.7.2.3 Tes Oksidase

Tes oksidase bertujuan untuk mengetahui adanya enzim *cytochrome oxidase* pada bakteri yang diuji. Bakteri yang mengandung enzim tersebut dapat mengoksidase reagen sehingga menghasilkan perubahan warna pada kertas reagen.

- Ambil koloni dari media padat, kemudian digoreskan pada kertas filter yang telah diberi reagen oksidase yaitu tetrametil p-fenilendiamin dihidroklorida 1% (*Kovac*) dan amati hasilnya.
- Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil positif yaitu adanya perubahan warna menjadi ungu atau ungu tua pada kertas reagen oksidase dalam waktu kurang dari 10 detik.



Gambar 4.3 Hasil Tes Oksidase Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

4.7.2.4 Uji Agar *MacConkey*

Tes ini bertujuan untuk membedakan bakteri Gram negatif yang memfermentasi laktosa dan yang tidak. Dilakukan inokulasi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan metode *streaking* pada media *MacConkey* agar.

- a. Inkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya.
- b. Bila tampak perubahan warna menjadi merah pada koloni bakteri, artinya bakteri uji memfermentasi laktosa.
- c. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil tidak memfermentasi laktosa.

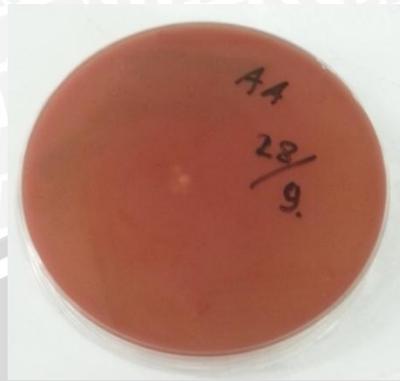


Gambar 4.4 Hasil Uji Agar MacConkey

4.7.2.5 Uji Hemolisis

Uji hemolisis bertujuan untuk mengetahui sifat hemolisis dari bakteri yang diuji dengan metode *streaking* pada media *Blood Agar Plate* (BAP).

- a. Inkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya.
- b. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil non-hemolisis atau γ - hemolisis yaitu tidak tampak perubahan warna pada BAP.



Gambar 4.5 Hasil Uji Hemolisis bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

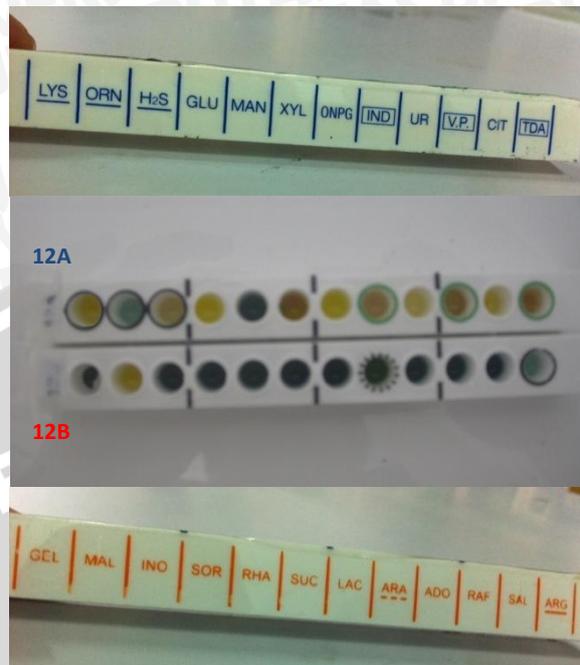
4.7.2.6 Uji Biokimia dengan *Microbact Kit*

- Siapkan kultur murni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam.
- Lakukan tes oksidase untuk mengetahui jenis *microbact kit* yang akan digunakan.
- Ambil isolat bakteri dan encerkan dalam larutan *saline*.
- Siapkan *microplate* dan lepaskan lapisan penutupnya.
- Tambahkan 4 tetes suspensi bakteri pada setiap lubang.
- Tambahkan 2 tetes *mineral oil* (MB1093A) pada lubang yang berlingkar hitam.
- Pasang kembali lapisan penutupnya dan inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- Setelah diinkubasi, beri reagen yang sesuai pada lubang tertentu (indol, reagen nitrat).
- Amati hasilnya dengan tabel yang tersedia. Identifikasi menunjukkan hasil negatif pada uji *lysine*, *ornithine*, H₂S, *mannitol*, ONPG, *indole*, urease, *citrate*, gelatin, inositol, sorbitol, *rhamnose*, *sucrose*, *lactose*, *arabinose*, adonitol, *raffinose*, *salicine*, dan *arginin*. Sedangkan hasil positif ditunjukkan pada uji glukosa, *xylose*, dan *nitrate*. Hasil tersebut

menunjukkan bahwa uji biokimia pada *Microbact* sesuai dengan karakteristik bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabel 4.1 Hasil Uji Biokimia dengan *Microbact Kit*

<i>Microbact 12A</i>		<i>Microbact 12B</i>	
Jenis Uji	Hasil	Jenis Uji	Hasil
<i>Lysine</i>	Kuning (negatif)	Gelatin	Tidak berwarna (negatif)
<i>Ornithine</i>	Hijau (negatif)	Malonate	Hijau (negatif)
H ₂ S	Kekuningan (negatif)	Inositol	Biru (negatif)
<i>Glucose</i>	Kuning (positif)	Sorbitol	Biru (negatif)
<i>Mannitol</i>	Biru (negatif)	<i>Rhamnose</i>	Biru (negatif)
<i>Xylose</i>	Kuning (positif)	<i>Sucrose</i>	Biru (negatif)
ONPG	Tidak berwarna (negatif)	<i>Lactose</i>	Biru (negatif)
<i>Indole</i>	Tidak berwarna (negatif)	<i>Arabinose</i>	Biru (negatif)
Urease	Kekuningan (negatif)	Adonitol	Biru (negatif)
<i>Citrate</i>	Hijau (negatif)	<i>Raffinose</i>	Biru (negatif)
TDA	Kekuningan (negatif)	<i>Salicine</i>	Biru (negatif)
<i>Nitrate</i>	Merah (positif)	<i>Arginine</i>	Hijau (negatif)



Gambar 4.6 Uji Biokimia Menggunakan *Microbact* 12A dan 12B

4.7.3 Persiapan Suspensi Uji *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

- Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang telah diidentifikasi dibiakkan dengan menggunakan media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) selama 24 jam pada suhu 37°C
- Media BHIB berisi bakteri dimasukkan ke dalam spektrofotometer kemudian diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{maks} = 625 \text{ nm}$ setara dengan standar 0,5Mc Farland. Dari hasil yang diperoleh (OD = 0,1) didapat suspensi bakteri yang mengandung $1 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$.
- Dibuat suspensi bakteri uji yang mengandung $1 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ dengan rumus:

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

Keterangan:

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_2 = Optical density ($0,1 = 10^8$ CFU/ml)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji

Pengenceran dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^8 CFU/ml) untuk dicampur dengan NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml. Proses dilakukan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

4.7.4 Prosedur Uji Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

- Disiapkan 7 cawan petri steril, kemudian diberi tanda besarnya konsentrasi larutan ekstrak yang dicampur dalam BHIA, yaitu 0%; 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1%; 1,25%; dan 1,5%.
- Volume yang dipakai dalam setiap plate adalah 15 ml, jadi volume ekstrak dan agar (BHIA) yang dimasukkan ke dalam plate:

Konsentrasi 0% = 15 ml BHIA (tanpa ekstrak)

Konsentrasi 0,25% = 0,0375 ml ekstrak 100% + 14,9625 ml BHIA

Konsentrasi 0,5% = 0,075 ml ekstrak 100% + 14,925 ml BHIA

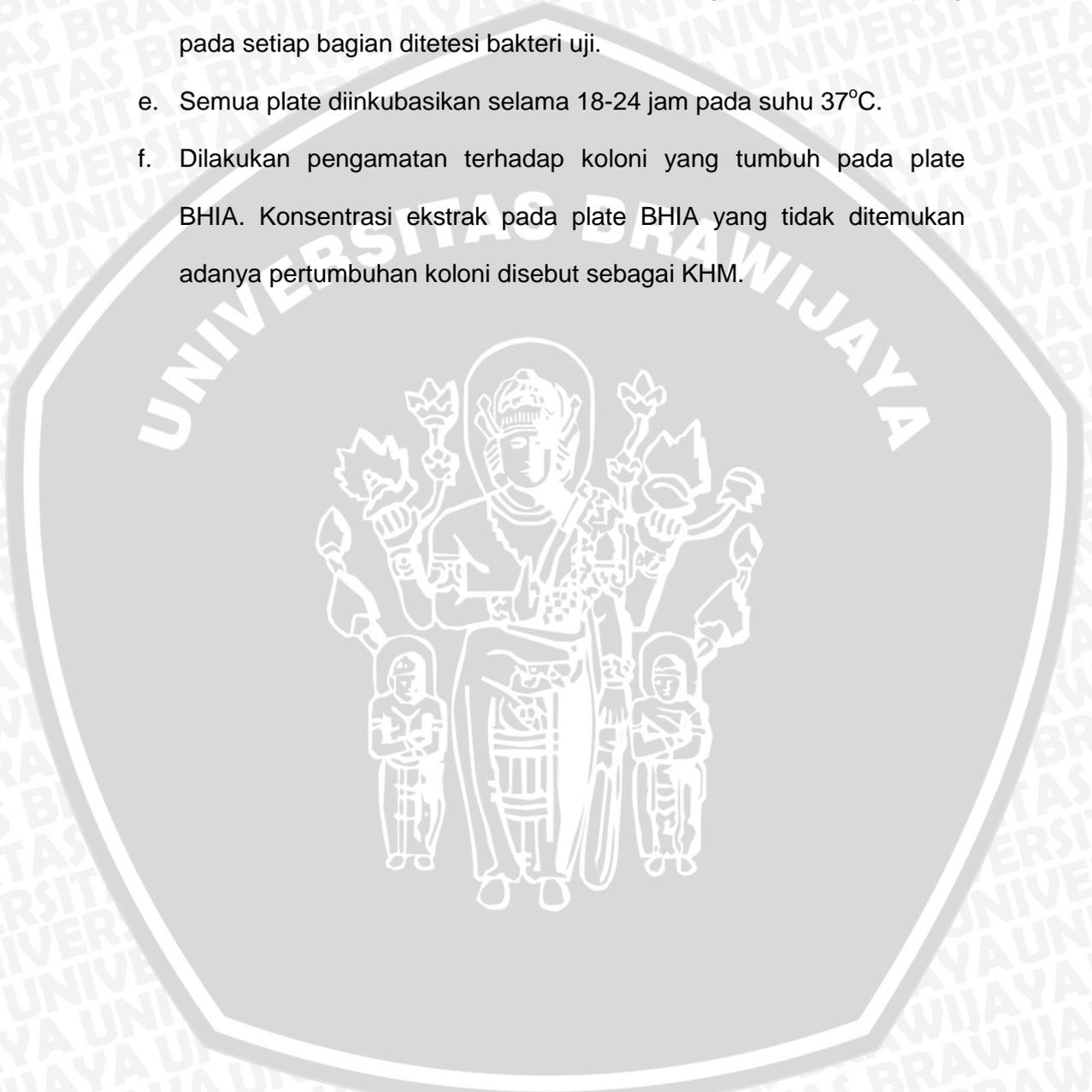
Konsentrasi 0,75% = 0,1125 ml ekstrak 100% + 14,8875 ml BHIA

Konsentrasi 1% = 0,15 ml ekstrak 100% + 14,85 ml BHIA

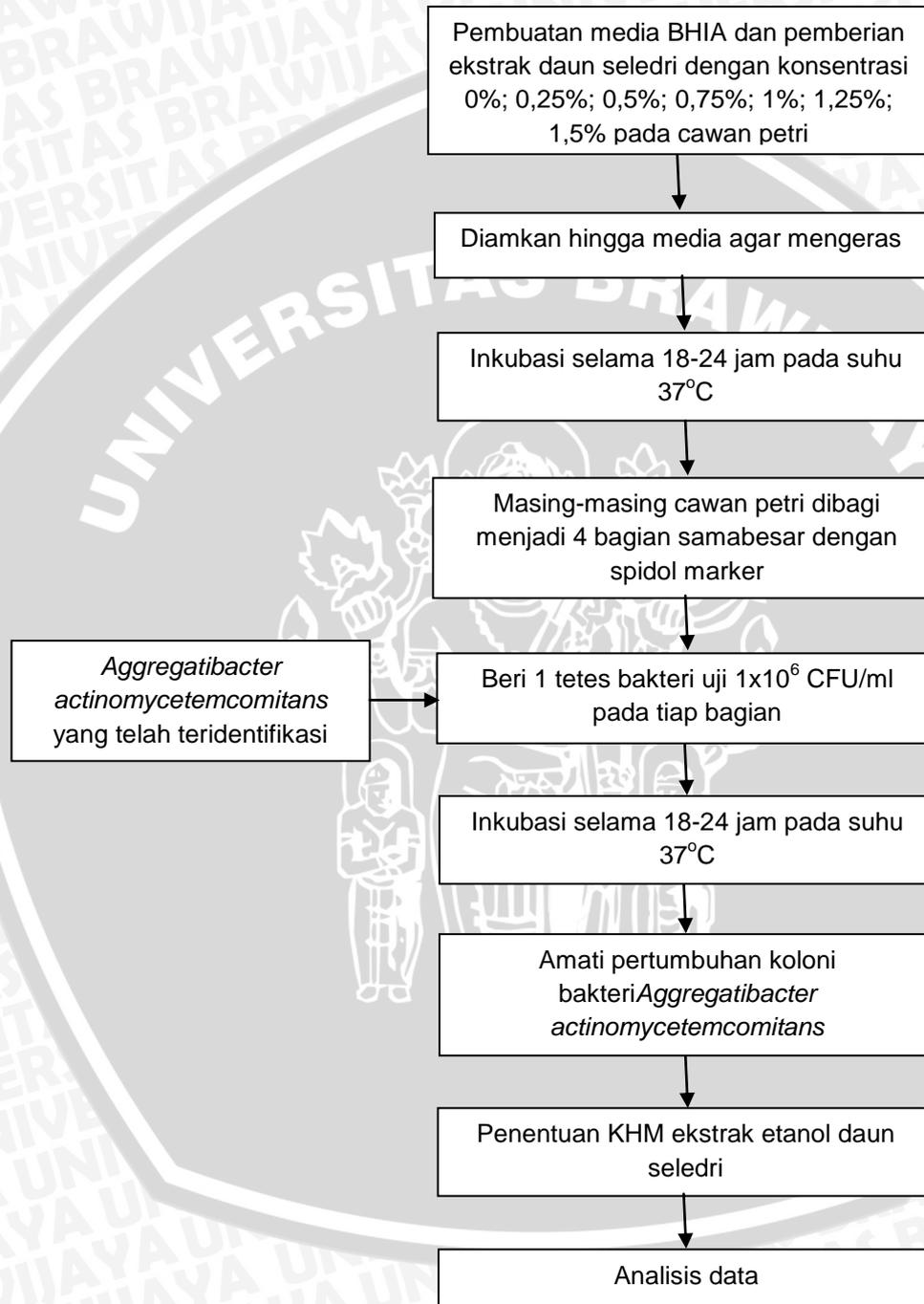
Konsentrasi 1,25% = 0,1875 ml ekstrak 100% + 14,8125 ml BHIA

Konsentrasi 1,5% = 0,225 ml ekstrak 100% + 14,775 ml BHIA

- c. Setelah dicampur lalu ditunggu hingga media agar dingin dan mengeras, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam.
- d. Plate tersebut ditandai menjadi menjadi 4 bagian sama besar yang pada setiap bagian ditetesi bakteri uji.
- e. Semua plate diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- f. Dilakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh pada plate BHIA. Konsentrasi ekstrak pada plate BHIA yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni disebut sebagai KHM.



4.8 Skema Prosedur Penelitian



Aggregatibacter actinomycetemcomitans yang telah teridentifikasi

Analisis data

4.9 Analisis Data

Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan uji Levene. Apabila hasilnya menunjukkan data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen ($p < 0,05$), atau berupa data ordinal maka dilakukan uji statistik non-parametrik. Uji statistik yang dilakukan adalah uji statistik *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh dari pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun seledri dan uji *post-hoc Mann-Whitney* untuk mengetahui besar perbedaan antara setiap kelompok perlakuan. Kemudian dilakukan uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui besarnya hubungan dari pemberian ekstrak etanol daun seledri terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Sedangkan bila data hasil penelitian yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$), maka analisis data dilakukan dengan menggunakan uji statistik parametric *one way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *post-hoc Tukey* dan uji korelasi Pearson.