

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *post test only control group design*.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Rumah Sakit Penyakit Tropik Infeksi (RSPTI), Balai Penelitian dan Konsultasi Industri, Ketintang, Surabaya, Jawa Timur pada bulan Juni sampai November tahun 2014.

4.3 Sampel Penelitian dan Besar Sampel

4.3.1 Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini yaitu biofilm bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang dibiakkan dengan menggunakan *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dalam tabung reaksi.

4.3.2 Besar Sampel

Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus Federer (Meritt, 2011):

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(8-1)(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15/7$$

$$r \geq 2,143 + 1$$

$$r \geq 3,143$$

Berdasarkan perhitungan besar sampel didapatkan hasil replikasi = 3. Jadi besar sampel penelitian minimal pada masing-masing perlakuan adalah 3 kali replikasi.

Keterangan :

t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Flavonoid ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%)

4.4.2 Variabel Terikat

Jumlah koloni biofilm bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang tumbuh pada media *blood agar* dan dinyatakan dalam *Colony Forming Unit* (CFU).

4.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah:

- a. Jenis dan asal buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn, Balai Materia Medica, kota Batu, Malang)
- b. Media pembiakan biofilm TSB.
- c. Suhu inkubasi uji antibakteri (37°C) dan waktu inkubasi
- d. Metode pengukuran dan cara kerja
- e. Konsentrasi flavonoid ekstrak kulit manggis
- f. Sterilisasi alat dengan menggunakan autoclave

4.5 Definisi Operasional Variabel

- a. Flavonoid adalah suatu senyawa aktif yang terkandung dalam kulit manggis yang telah dipisahkan dari kandungan lainnya dengan pelarut aseton benzene dengan konsentrasi flavonoid yang digunakan adalah 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%.
- b. Biofilm *Lactobacillus acidophilus* ATCC 33277 adalah agregat seluler yang membentuk lapisan substrat/media. Pada penelitian ini, biofilm dibentuk oleh *Lactobacillus acidophilus* pada media *microtitter plate*.
- c. Daya hambat adalah kemampuan atau potensi bahan uji flavonoid dalam proses menghambat pertumbuhan biofilm dari bakteri *Lactobacillus acidophilus*.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Alat

- a. *Microtitter plate flat-bottom 96 wells* dengan *seal*, Eppendorf, Jerman
- b. Tabung reaksi
- c. *Plate*
- d. Mikropipet, Eppendorf, Jerman
- e. Inkubator, INB 500 Memmert, Jerman
- f. iMark, Microplate Reader S/N 12096
- g. Mikroskop *inverted*, IX 51 Olympus, Jepang
- h. Mikroskop *teaching*, BX 53 Olympus, Jepang
- i. *Autoclave*, SX 700
- j. *Vortex mixer*, SA 8 Stuart, UK
- k. Nephelometri/turbidimetri, Densicheck Plus, Biomerieux, USA

- l. Timbangan, Sartorius, Indonesia
- m. Label nama
- n. *Rotary evaporator*

4.6.2 Bahan

- a. *Trypticase Soy Broth* (TSB)
- b. Biakan bakteri *Lactobacillus acidophilus* ATCC 33277 pembentuk biofilm yang didapatkan dari RSPTI, Surabaya
- c. Flavonoid ekstrak kulit manggis
- d. Aquadest
- e. *Simple staining* (*Crystal Violet*)
- f. DMSO 100%
- g. Larutan etanol 96%
- h. *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
- i. *Kit McFarland*

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Sterilisasi Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 30 menit.

4.7.2 Pembuatan Flavonoid Ekstrak Kulit Manggis

Pembuatan ekstrak kulit manggis yang dilakukan di Balai Penelitian dan Konsultasi Industri, Ketintang, Surabaya, Jawa Timur adalah:

1. Kulit manggis segar yang telah didapat dari Balai Materia Medica, Batu, Malang, dikeringkan di bawah sinar matahari selama kurang lebih 3 hari.

2. Kulit luar dan dalam dari manggis yang telah kering ditumbuk sehingga didapatkan granul berukuran 20-40 mesh.
3. Granul kemudian dimasukkan kedalam alat *extractor*, dengan penambahan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 bagian granul dan 2 bagian etanol.
4. Kemudian dilakukan pengadukan menggunakan *stirrer* atau *di-shacker* selama 2x24 jam.
5. Dilakukan penyaringan sehingga diperoleh filtrat berwarna merah jernih transparan.
6. Filtrat diuapkan pada suhu 60°C menggunakan *vacuum evaporator*.
7. Setelah semua alkohol terpisah maka akan didapatkan *crude* ekstrak kulit manggis yang berwarna coklat kental dengan berat sekitar 5% dari berat kulit manggis.
8. Masukkan *crude* kedalam corong pemisah, kemudian ditambahkan larutan aseton benzene dengan perbandingan 1:1.
9. Dikocok selama 2 jam, kemudian didiamkan sehingga cairan yang berada di bagian atas berwarna jernih.
10. Kran bawah alat separator dibuka pelan-pelan sehingga kotoran yang berupa setengah padat dan padatan keluar.
11. Cairan yang jernih dipindahkan ke alat *vacuum evaporator* sehingga semua pelarut terpisah dan diperoleh flavonoid ekstrak kulit manggis yang berupa cairan kental setengah padat berwarna merah tua.

4.7.3 Teknik Uji Hambat Biofilm

Menurut Diva Rahma Fitria, 2013, uji teknik uji hambat biofilm yang didapat dari Rumah Sakit Penyakit Topik Infeksi (RSPTI), Surabaya, Jawa Timur adalah:

1. Membuat suspensi bahan uji

Flavonoid ekstrak kulit manggis ditimbang dan dilarutkan dengan media *Trypticase Soy Broth*. Pada pembuatan flavonoid ekstrak kulit manggis diencerkan dengan media tersebut dalam keadaan hangat (tidak lebih dari 50°C).

2. Membuat suspensi kuman

Untuk menguji biofilm dipilih metode: *Microtiter Plate Biofilm Assay*. Suspensi uji awal dibuat setara dengan kekeruhan 0,5 *Mc Farland* (kekeruhan dari campuran BaSO₄ dan HCl) diencerkan sampai mencapai konsentrasi bakteri 10⁶. Suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang dikultur ke dalam *microplate* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Perkiraan pembentukan biofilm antara 7-10 hari.

3. Pada hari ke-7, ditambahkan 0,1 ml suspensi dari bahan uji (flavonoid kulit manggis) dengan konsentrasi 0,78%, 1,56%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100% ke dalam masing-masing sumuran *microplate* dengan 4 sumuran tidak diberi suspensi bahan uji sebagai kontrol.

4. Inkubasi kembali dengan suhu 37°C dalam inkubator.

5. Setelah inkubasi, dilakukan pencucian *microplate* dengan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak 4 kali untuk menghilangkan bakteri *planctonic* dan dikeringkan untuk selanjutnya dilakukan pembacaan.

6. Pewarnaan dengan larutan *crystal violet* 0,1% sebanyak 0,2 ml dan diinkubasi dalam temperatur ruangan selama 15 menit.
7. Cairan sisa pewarnaan dicuci dengan aquadest beberapa kali sampai tidak ada warna pada air bilasan, kemudian dikeringkan dan ditambahkan pelarut warna yaitu DMSO 100% sebanyak 0,1 ml.
8. Kemudian *plate* digoyang selama 1 menit untuk selanjutnya diletakkan *microplate reader* untuk diamati bentukan jaring-jaring lapisan pada sampel. Setiap isolat dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

4.7.4 Pengamatan dan Pengukuran Penghambatan Biofilm

Parameter yang digunakan untuk mengetahui daya hambat dari masing-masing bahan uji adalah dengan menghitung nilai OD (*Optical Density*). Rumus perhitungan OD (*Optical Density*) = $2 - \log (\%T)$. Lalu perhitungan dengan rumus OD (*Optical Density*) biofilm bakteri *Lactobacillus acidophilus* ATCC (*American Type Culture Collection*) 33277 yang telah diberi bahan ekstrak flavonoid kulit manggis yang diukur menggunakan *elisa reader*.

4.8 Analisis Data

Untuk mengetahui uji efektivitas flavonoid ekstrak kulit manggis terhadap biofilm bakteri *Lactobacillus acidophilus*, digunakan bahan uji analisis statistik:

- a. Uji normalitas menggunakan tes *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat apakah data yang didapat berdistribusi normal.
- b. Uji homogenitas menggunakan tes *Levenne*.
- c. Uji non parametrik menggunakan *Kruskal Wallis Test* dan *Mann Whitney Test* untuk melihat signifikansi perbedaan jumlah koloni bakteri antar

kelompok penelitian (karena terdapat kelompok yang tidak dapat dilakukan uji normalitas).

4.9 Alur Penelitian



