

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium. Desain penelitian adalah *True Experimental Design* yaitu *Posttest Control Grup Design*. Dalam penelitian ini peneliti ingin mengetahui perbedaan pH saliva buatan yang telah diinduksi *Streptococcus mutans* dan ditambahkan ekstrak etanol kulit tomat (*Solanum lycopersicum*) dengan konsentrasi 60%, 70%, 80% dan 90% secara *in vitro*.

4.2 Sampel Penelitian dan Estimasi Jumlah Pengulangan

4.2.1 Sampel Penelitian

Tabel 4.1 Kelompok Sampel dan Jenis Perlakuan

Kelompok Sampel	Jenis Perlakuan
Kontrol	Saliva buatan ditambah dengan <i>Streptococcus mutans</i>
Perlakuan 1	Saliva buatan ditambah dengan <i>Streptococcus mutans</i> dan ekstrak kulit tomat konsentrasi 60%
Perlakuan 2	Saliva buatan ditambah dengan <i>Streptococcus mutans</i> ekstrak kulit tomat konsentrasi 70%
Perlakuan 3	Saliva buatan ditambah dengan <i>Streptococcus mutans</i> dan ekstrak kulit tomat konsentrasi 80%
Perlakuan 4	Saliva buatan ditambah dengan <i>Streptococcus mutans</i> dan ekstrak kulit tomat konsentrasi 90%

4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan

Dalam penelitian ini, banyaknya pengulangan ditentukan dengan menggunakan rumus Federer (Maryanto dan Fatimah 2004) :

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

keterangan :

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan

Sesuai perhitungan diatas, pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini sebanyak 4 kali.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah larutan ekstrak etanol kulit tomat (*Solanum lycopersicum*) dengan konsentrasi 60%, 70%, 80% dan 90%

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pH dan absorbansi saliva buatan pada masing-masing perlakuan.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang dan Laboratorium Fitokimia Materia Medika Batu.

4.4.2 Waktu Penelitian

Waktu Penelitian dilakukan pada bulan Agustus - Oktober 2017

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

1. Aquades Steril
2. Isolat Bakteri *Streptococcus mutans*
3. Kapas steril
4. 5 kg tomat
5. Saliva buatan *McDougall* dengan pH 6,7
6. Spiritus
7. Syringe
8. Etanol PA
9. Pewarna gram (Kristal violet, lugol, alcohol 96%, safranin)
10. Latutan H₂O₂ 3%

4.5.2 Alat Penelitian

1. Autoclaf
2. Bunsen
3. Filter
4. Inkubator

5. pH meter
6. Pipet steril
7. Rak Tabung Reaksi
8. Spektrofotometer
9. Tabung erlenmyer steril
10. Tabung reaksi steril
11. Timbangan atau neraca analitik
12. Vibrator
13. Ose
14. Stopwatch
15. Oven
16. Pipa plastik
17. Tabung pendingin
18. 1 set alat evaporasi
19. Alat penggerus (*blender*)

4.6 Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol kulit tomat (*Solanum lycopersicum*) adalah tomat yang didapat di Pasar Dinoyo Malang, dikumpulkan, dicuci, diambil kulitnya, diblender dan setelah itu dilakukan ekstraksi dingin (maserasi) dengan menggunakan etanol PA di Laboratorium Fitokimia Materia Medika Batu.
- b. *Streptococcus mutans* adalah bakteri gram positif anaerob yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang sebelumnya diuji identifikasi dan telah dilakukan subkultur. Standar kepadatan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 10^8 CFU/ml. Identifikasi

bakteri dilakukan dengan serangkaian tes, antara lain tes pewarnaan gram, dan tes katalase.

- c. Saliva buatan yang digunakan dalam penelitian ini berupa saliva buatan sesuai formula *McDougall* dengan pH 6,7 yang didapatkan dari Fakultas Teknik Kimia Universitas Airlangga.

4.7 Metode Pengumpulan Data

4.7.1 Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan merupakan data primer dan data sekunder. Yang termasuk data primer dari penelitian ini adalah pH saliva buatan yang telah diinduksi *Streptococcus mutans* sebagai kelompok kontrol dan perlakuan berupa ekstrak etanol kulit tomat (*Solanum Lycopersicum*) dengan konsentrasi 60%, 70%, 80% dan 90% dan jumlah koloni *Streptococcus mutans*. Yang termasuk data sekunder dari penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol kulit tomat (*Solanum Lycopersicum*).

4.7.2 Teknik Pengumpulan data

Untuk pengumpulan data primer dilakukan dengan cara :

- a. Data pH saliva buatan diperoleh dengan cara mengukur menggunakan pH meter.
- b. Data nilai absorbansi saliva buatan diperoleh dengan cara mengukur dengan menggunakan spektrofotometer.

Untuk pengumpulan data sekunder dilakukan dengan cara:

- a. Data konsentrasi ekstrak etanol kulit tomat (*Solanum Lycopersicum*) didapatkan dari literatur.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Prosedur Pembuatan Ekstrak Kulit Tomat (*Solanum Lycopersicum*)

- a. Memisahkan daging dan kulit tomat dengan cara mengupas
- b. Timbang kulit buah tomat
- c. Kulit tomat kemudian diblender atau dihaluskan serta menambahkan pelarut etanol 96%.
- d. Masukkan kulit tomat yang telah dihaluskan ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut etanol 96% sampai terendam. Tutup toples dengan rapat selama 24 jam.
- e. Melakukan shaker diatas shaker digital dengan kecepatan 50 rpm.
- f. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung estrak dalam Erlenmeyer.
- g. Hasil ekstrak cair diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Diperlukan waktu 5 jam untuk evaporasi.
- h. Ekstrak yang dihasilkan dievaporasi/diuapkan diatas *water bath* selama 2 jam.

Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Etanol Kulit Tomat (*Solanum lycopersicum*) (Setyawan, 2012) :

1. Larutan ekstrak etanol konsentrasi 60% dibuat dengan mengambil 6 ml ekstrak konsentrasi 100 % ditambah akuades hingga mencapai 10 ml
2. Larutan ekstrak etanol konsentrasi 70% dibuat dengan mengambil 7 ml ekstrak konsentrasi 100 % ditambah akuades hingga mencapai 10 ml
3. Larutan ekstrak etanol konsentrasi 80% dibuat dengan mengambil 8 ml ekstrak konsentrasi 100 % ditambah akuades hingga mencapai 10 ml

4. Larutan ekstrak etanol konsentrasi 90% dibuat dengan mengambil 9 ml ekstrak konsentrasi 100 % ditambah akuades hingga mencapai 10 ml

4.8.2 Identifikasi Bakteri *Streptococcus mutans*

4.8.2.1 Prosedur Pewarnaan Gram

- a. Dibuat sediaan (*slide*) pada gelas objek, dikeringkan diudara kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan diatas api Bunsen
- b. Sediaan dituangi kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit
- c. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air
- d. Sediaan dituangi larutan lugol dan dibiarkan selama 1 menit
- e. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air
- f. Sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik
- g. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air
- h. Sediaan dituangi safranin selama 30 detik
- i. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air
- j. Dikeringkan dengan kertas penghisap
- k. Diamati dengan mikroskop perbesaran 100-400x dengan intensitas sinar rendah (Arrachman, 2016)

4.8.2.2 Uji Katalase

- a. Buat suspensi bakteri pada gelas objek
- b. Tambahkan 1 tetes larutan salin/akuades steril pada gelas objek
- c. Tambahkan 1 ose koloni bakteri
- d. Kemudian sediaan tersebut ditetesi larutan H₂O₂ 3 %

- e. Amati gelembung-gelembung udara pada pembenihan. Bila gelembung tidak timbul, maka koloni bakteri dalam tabung reaksi bersifat katalase negatif. Tes katalase (-) menunjukkan *Streptococcus mutans* (Yurdakul, 2013)

4.8.2.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus mutans*

- a. Dipersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diidentifikasi
- b. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^8$ hingga $2,5 \times 10^8$ CFU/ml 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 dengan konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^8$ hingga $2,5 \times 10^8$ CFU/ml (Setyawan, 2012).

4.8.3 Persiapan Saliva Buatan

Prosedur pembuatan saliva buatan ini mengacu pada metode McDougall 1948. Cara pembuatan saliva buatan untuk larutan 3 liter, sebanyak 3 liter akuades dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer yang bervolume 3 liter kemudian dimasukkan bahan-bahan sebagai berikut NaHCO₃ (29,4 gram), Na₂HPO₄.7H₂O (21 gram), NaCl (1,41 gram), KCl (1,71 gram), CaCl₂ (0,12 gram), MgSO₄.7H₂O (0,36 gram). Semua bahan tersebut dilarutkan kecuali CaCl₂, kemudian aduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* sampai semua bahan larut (homogen). Setelah semua bahan larut kemudian ditambahkan CaCl₂. Kemudian leher labu dicuci dengan air destilasi hingga permukaan air mencapai tanda tera. Campurkan lalu

hembuskan gas CO₂ ke dalam larutan secara perlahan-lahan (Sugianitri, 2011).

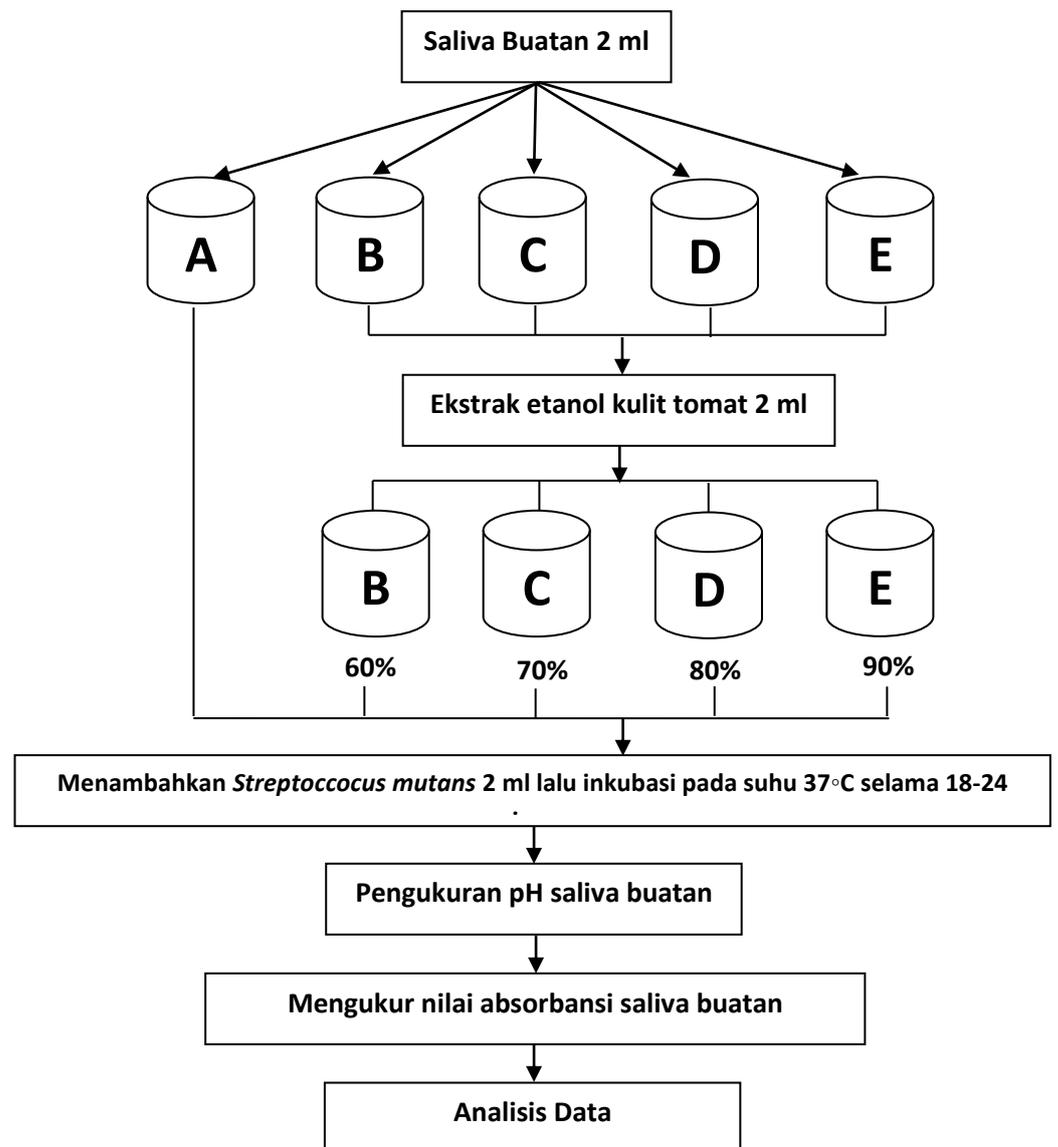
4.8.4 Uji Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Etanol Kulit Tomat Terhadap pH Saliva Buatan dan *Streptococcus mutans*

Rangkaian uji pengaruh konsentrasi ekstrak etanol kulit tomat terhadap pH saliva buatan dan *Streptococcus mutans* adalah sebagai berikut:

- a. Disediakan 5 tabung rekasi steril, kemudian pada masing-masing tabung dimasukkan 2 ml saliva buatan.
- b. Ditambahkan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* sebanyak 2 ml pada semua tabung reaksi (A, B, C, D, dan E)
- c. Pada tabung kontrol (A) ditambahkan saliva buatan dan *Streptococcus mutans* sebanyak masing-masing 3 ml.
- d. Pada tabung perlakuan 1 (B) ditambahkan ekstrak etanol kulit tomat 60% sebanyak 2 ml.
- e. Pada tabung perlakuan 2 (C) ditambahkan ekstrak etanol kulit tomat 70% sebanyak 2 ml.
- f. Pada tabung perlakuan 3 (D) ditambahkan ekstrak etanol kulit tomat 80% sebanyak 2 ml.
- g. Pada tabung perlakuan 4 (D) ditambahkan ekstrak etanol kulit tomat 90% sebanyak 2 ml.
- h. Dilakukan pengukuran pH saliva buatan serta pengukuran absorbansi saliva.
- i. Kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam.

- j. Dilakukan pengukuran pH saliva buatan serta pengukuran absorbansi untuk mengetahui banyaknya koloni bakteri *Streptococcus mutans* pada masing-masing tabung. Kemudian lakukan pengulangan sebanyak 4 kali.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.10 Analisis Data

Pengolahan data dilakukan dengan bantuan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) 15.0 for Windows. Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi normalitas dan homogenitas varian menggunakan *kolmogorov smirnov* dan *Levene homogeneity test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one-way ANOVA* dan *Post Hoc*.