

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik (*True experimental – Post test only Control Group Design*) dengan menggunakan metode dilusi agar untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak biji pinang (*Areca catechu*, L) yang dapat mempengaruhi pertumbuhan *Streptococcus mutans* secara *in vitro*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan April 2013 sampai bulan Mei 2013.

4.3 Sampel Penelitian

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak biji pinang (*Areca catechu*, L) dan menggunakan sampel bakteri uji yaitu *Streptococcus mutans* yang telah dikultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Pengulangan

Dalam penelitian ini banyaknya pengulangan ditentukan dengan menggunakan rumus estimasi besar pengulangan (Solimun 2001) sebagai berikut:

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan : n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (konsentrasi ekstrak biji pinang)

Jadi, pada penelitian ini masing-masing perlakuan dilakukan empat kali pengulangan.

4.5 Definisi Operasional

- Biji pinang yang digunakan sebagai ekstrak biji pinang kering yang berwarna coklat kehitaman, yang didapat dari buah pinang muda yang telah dikeringkan dan dibuat menjadi serbuk serta didapat dari Balai Materia Medika di Batu, Malang, Jawa Timur.
- Ekstrak biji pinang menggunakan pelarut etanol 96% yang kemudian dilakukan evaporasi hingga didapat ekstrak biji pinang murni dengan kadar pekarut 0%
- *Streptococcus mutans* yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang sebelumnya sudah diuji sensitivitasnya dan telah dilakukan subkultur
- KHM (Kadar Hambat Minimal) yaitu konsentrasi terendah dari ekstrak biji pinang yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan metode

dilusi agar yang ditandai dengan pertumbuhan koloni kurang dari 2 (Dariel; 1991)

- Konsentrasi ekstrak biji pinang yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5% 0%
- Hasil penelitian dinyatakan dalam bentuk skoring dengan melihat ketebalan bakteri, yaitu +3, +2, +1, 0 , yaitu berarti +3 adalah koloni tumbuh tebal dan tidak terhitung, +2 adalah koloni tumbuh tipis dan tidak terhitung, +1 adalah koloni tumbuh tipis dan terhitung, dan 0 berarti tidak ada pertumbuhan.

4.6 Variabel Penelitian

4.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah larutan ekstrak biji pinang (*Areca catechu*, L) berbagai konsentrasi.

4.6.2 Variabel Tergantung

Tingkat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* untuk menentukan KHM.

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Untuk Pembuatan Ekstrak :

Alat:

- | | |
|--------------------|---|
| 1. Oven | 8. Evaporator |
| 2. Timbangan ukur | 9. Pendingin spiral / rotary evaporator |
| 3. Labu Erlenmeyer | 10. Selang <i>water pump</i> |
| 4. Corong gelas | 11. <i>Water pump</i> |

- | | |
|--------------------|-----------------------|
| 5. Kertas saring | 12. <i>Water bath</i> |
| 6. Labu evaporator | 13. <i>Vacum pump</i> |
| 7. Labu penampung | |

Bahan:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Biji pinang (<i>Areca catechu</i> , L) | 3. Aquades |
| 2. Etanol 96% | 4. Botol hasil ekstrak |

4.7.2 Untuk Identifikasi Bakteri

1. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*
2. BSA (*Bismuth Sulfite Agar*)
3. Bahan pengecatan Gram: Kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin
4. *Object glass*, minyak emersi, ose, mikroskop
5. Pembakar bunsen

4.7.3 Untuk Pembuatan Bahan Cair Bakteri Kepadatan 10^6 Bakteri/ml

- | | |
|------------------|------------------|
| 1. Tabung reaksi | 4. Larutan NaCl |
| 2. BHI broth | 5. <i>Vortex</i> |
| 3. Pipet steril | |

4.7.4 Untuk Dilusi Agar

Alat:

1. Plate
2. Mikropipet
3. Tabung reaksi
4. Lampu spirtus
5. Ose

Bahan:

1. Natrium agar

2. NaCl

3. Suspensi bakteri dari *BHI Broth*

4.8 Rancangan Operasional Penelitian

Alur kerja

1. Pembuatan ekstrak biji pinang

a. Proses pengeringan

- Biji pinang dijemur dengan panas matahari sampai benar-benar kering.

b. Proses ekstraksi

- Setelah kering, haluskan dengan blender sampai halus.
- Timbang sebanyak 50 gram (sampel kering).
- Masukkan 50 gram sampel kering ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 1 liter.
- Kemudian rendam dengan etanol 96% sampai volume 950 ml.
- Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
- Didiamkan 1 malam sampai mengendap.

c. Proses evaporasi

- Ambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif yang sudah terambil.
- Masukkan dalam labu evaporasi pada evaporator.
- Isi *water bath* dengan air sampai penuh.

- Pasang semua rangkaian alat, termasuk rotary evaporator, pemanas *water bath* (atur sampai 90°C), sambungkan dengan aliran listrik.
- Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
- Masukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik.
- Simpan dalam *freezer*.

2. Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

- a) Dibuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan udara.
- b) Sesudah kering difiksasi di atas api bunsen.
- c) Sediaan dituangi kristal violet selama 1 menit.
- d) Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- e) Sediaan dituangi lugol selama 1 menit.
- f) Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- g) Sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik.
- h) Sisa alcohol dibuang dan dibilas dengan air.
- i) Sediaan dituangi safranin selama 0,5menit.
- j) Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- k) Dikeringkan dengan kertas penghisap.
- l) Diamati dengan mikroskop pembesaran 100-400x dengan intensitas sinar rendah.

3. Tes Katalase

Untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus* dilakukan uji katalase, yaitu dengan menambahkan larutan H₂O₂ 3% pada perbenihan cair. *Staphylococcus* akan memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan munculnya gelembung udara. Langkah uji katalase sebagai berikut :

Dibuat suspensi bakteri pada gelas obyek :

1. 1 tetes larutan aquadest steril
2. Ditambahkan 1 koloni bakteri
3. Ditetesi dengan 1 tetes H₂O₂ 3% dan diamati timbulnya

gelembung – gelembung udara pada media perbenihan

4. Pemiakan Bakteri dengan BHI *broth*

Streptococcus mutans yang telah diidentifikasi dibiakkan pada medium cair dengan menggunakan BHI *broth* selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C.

5. Persiapan Suspensi bakteri *Streptococcus mutans*

1. Dipersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* dari media BHI *Broth* yang telah diuji konfirmasi.
2. Ambil 5 koloni ($d \geq 1\text{ mm}$) dengan ose kemudian dimasukkan kedalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{\text{maks}} = 650\text{ nm}$. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung 1×10^8 hingga 5×10^8 CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$ (Murray *et al.*, 1999).

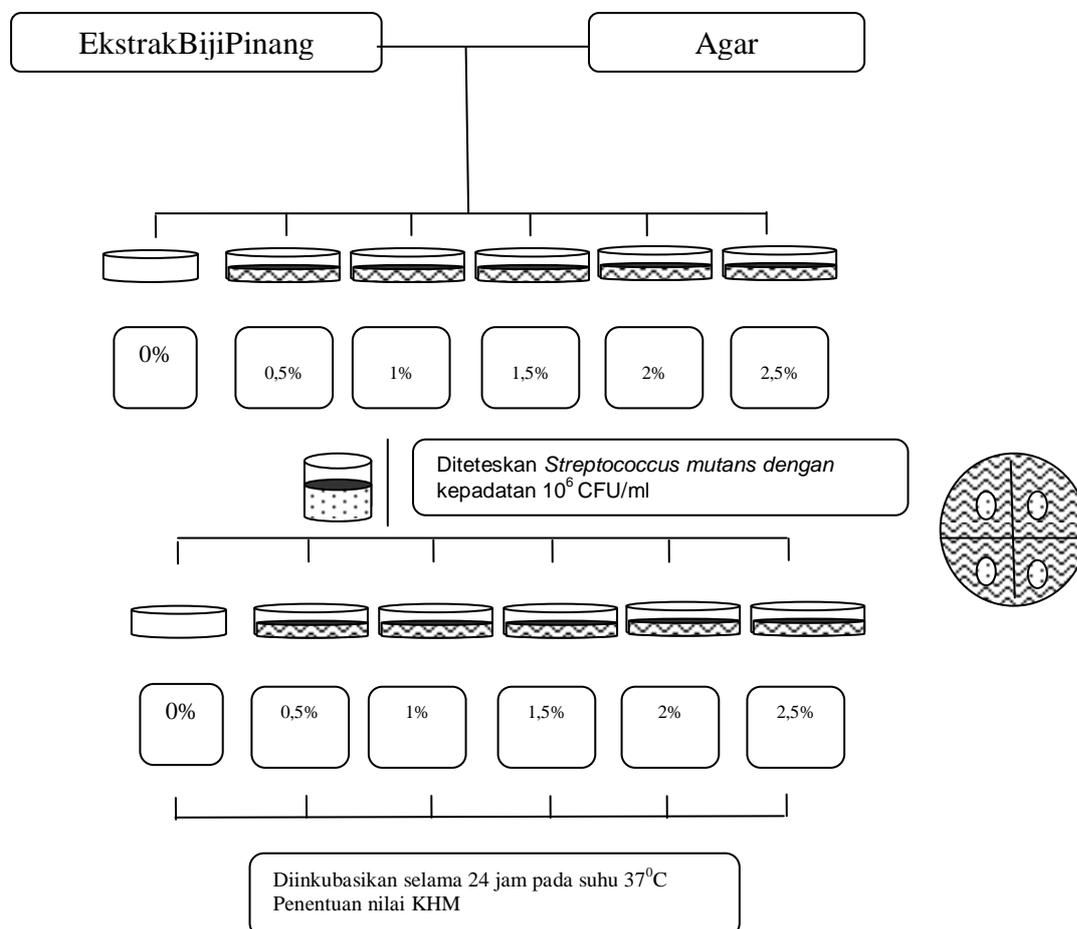
3. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^8 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml. Proses dilanjutkan 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).

6. Tes Dilusi Agar

Tes dilusi agar dilakukan karena untuk menentukan KHM tidak dapat menggunakan metode dilusi tabung. Hal ini disebabkan ekstrak biji pinang berwarna keruh sehingga mengganggu visualisasi untuk menentukan KHM.

Prosedur yang dilakukan untuk tes sensitivitas dengan metode dilusi agar yaitu siapkan media biakan yang telah dicampur dengan ekstrak biji pinang sesuai dengan konsentrasi yang diperlukan untuk koloni *Streptococcus mutans* yang dibiakkan dalam BHIA dan telah disetarakan kekeruhannya dengan spektrofotometer (2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5%). Kemudian tunggu hingga agar menjadi padat. Siapkan pula control positif (KP). Kemudian tambahkan *Streptococcus mutans* pada masing-masing *plate* konsentrasi ekstrak dan *plate* control positif. Inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C . Setelah diinkubasi, lihat lapisan koloni bakteri yang terbentuk. *Plate* dengan konsentrasi terendah yang bersih dari bakteri merupakan KHM.

4.9 Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Uji Antimikroba Ekstrak Biji Pinang Terhadap *Streptococcus mutans*

4.10 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan variable numeric dengan satu faktor lain yang ingin diketahui yaitu perbedaan pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus mutans* yang dihasilkan pada agar plate secara kualitatif berdasarkan perlakuan pemberian ekstrak biji pinang, sehingga uji statistik yang digunakan adalah Kruskall Wallis. Selain itu dilakukan uji Mann Whitney untuk membandingkan perlakuan mana saja yang menyebabkan

pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* cenderung berbeda signifikan atau tidak berbeda, serta uji Korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian ekstrak biji pinang terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.