

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik secara in vitro untuk mengetahui potensi antimikroba ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap *Streptococcus mutans* dengan cara mengukur Kadar Bunuh Minimum atau KBM.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus*. Secara spesifiknya yaitu bakteri *Streptococcus mutans* yang sebelumnya diambil dari Laboratorium Mikrobiologi FKG Universitas Airlangga Surabaya, yang kemudian telah dibiakkan dan dilakukan identifikasi ulang di Laboratorium Mikrobiologi FKUB untuk meyakinkan bahwa bakteri ini positif *Streptococcus mutans*.

Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Lukito yaitu:

$$p(n - 1) \geq 16 \text{ (Lukito, 1998)}$$

$$7(n - 1) \geq 16$$

$$7n - 7 \geq 16$$

$$7n \geq 23 \rightarrow n \geq 3,28571 \approx 4$$

Keterangan: p = jumlah perlakuan (7, yaitu 6 konsentrasi ekstrak etanol daun alpukat, 1 kontrol negatif)

n = jumlah pengulangan (4 kali pengulangan).

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung

Jumlah pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus mutans*.

4.3.2 Variabel Bebas

Ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana Mill.*) dengan konsentrasi berbeda-beda 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan januari 2013 sampai februari 2013

4.5 Alat dan bahan penelitian

a) Alat

Alat yang digunakan untuk identifikasi bakteri adalah gelas obyek, ose, pembakar spiritus, tabung reaksi kosong steril, rak tabung reaksi, korek api, mikroskop, label dan spidol.

Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol daun alpukat adalah timbangan analitik, tabung erlenmeyer, pisau, nampan, oven dan rotary evaporator.

Alat yang digunakan untuk uji efektivitas ekstrak etanol daun alpukat terhadap *Streptococcus mutans* adalah tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, ose, cawan petri, mikropipet 1 ml, inkubator, pembakar spiritus, label, vortex, blue tip, colony counter dan spektrofotometer

b) **Bahan**

Bahan untuk identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* adalah Isolat bakteri *Streptococcus mutans*, Alkohol 96%, *Brain Heart Infusion Broth*, kristal violet, lugol, safranin, aquades, minyak imersi, kertas penghisap, kapas, H₂O₂ 3%, *Chocolate Agar Plate* (CAP) dan *Optochin disk*.

Bahan untuk pembuatan ekstrak etanol daun alpukat adalah 100 gram daun alpukat (*Persea americana Mill.*), etanol 96% dan air pendingin.

Bahan uji kepekaan ekstrak etanol daun alpukat terhadap bakteri *Streptococcus mutans* adalah isolat *Streptococcus mutans*, ekstrak daun alpukat, *Brain Heart Infusion Broth*, *Brain Heart Infusion Agar*, NaCl dan aquades steril.

4.6 Definisi Operasional

- a) Tanaman alpukat yang merupakan jenis meksiko ini termasuk pada spesies *Persea Americana*. Daunnya tumbuh tunggal dan berbentuk jorong oval dengan tepi rata atau berombak. Bagian daun inilah yang digunakan dalam penelitian ini. Daun alpukat yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan disekitar lingkungan Kota Malang.
- b) Ekstraksi etanol maserasi daun alpukat adalah cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia daun alpukat dalam cairan penyari menggunakan etanol 96% selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya. Ekstraksi etanol maserasi daun alpukat dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.
- c) Bakteri *Streptococcus mutans* merupakan bakteri gram positif, bersifat non-motil (tidak bergerak) dan termasuk bakteri anaerob fakultatif. Memiliki bentuk

kokus atau bulat telur yang tersusun seperti rantai.. *Streptococcus mutans* biasanya ditemukan didalam rongga mulut manusia yang luka dan menjadi bakteri yang paling kondusif sebagai penyebab karies email gigi. Bakteri ini diperoleh dari pembenihan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

- d) Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak daun alpukat (*Persea americana Mill.*) yang mampu membunuh bakteri uji (*Streptococcus mutans*), ditandai dengan tidak terdapatnya pertumbuhan koloni *Streptococcus mutans* atau kurang dari 0,1% *Original Inoculum* pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA).
- e) *Original Inoculum* (OI) adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum inkubasi. Digunakan untuk mencari KBM setelah diinokulasikan 18-24 jam yang dibandingkan dengan bahan kontrol negatif.

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari prosedur penelitian pendahuluan dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% dan 1,576%. Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk menentukan *range* konsentrasi yang lebih kecil agar didapatkan konsentrasi yang lebih tepat. Setelah itu baru dilakukan prosedur penelitian sesungguhnya dengan konsentrasi yang lebih dirinci yang berupa prosedur proses pembuatan ekstrak etanol daun alpukat, pemeriksaan mikroskopik, tes katalase, tes optochin, persiapan suspensi uji *Streptococcus mutans* dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana Mill.*) terhadap *Streptococcus mutans*.

4.7.1 Proses Pembuatan Ekstrak etanol Daun alpukat (*Persea Americana* Mill.)

- a) Daun alpukat diiris tipis-tipis.
- b) Daun alpukat yang telah diiris diletakkan di atas nampan.
- c) Daun alpukat dikeringkan pada suhu 40°C – 60°C kemudian dihaluskan dengan blender.
- d) Daun alpukat kering ditimbang dan diambil sebanyak 100 g halus.
- e) Daun alpukat kering dimasukkan dalam tabung erlenmeyer.
- f) Kemudian ditambahkan ± 900 ml etanol 96%
- g) Tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu kocok perlahan-lahan. Pengocokan dilakukan 1-2 kali sehari.
- h) Tabung erlenmeyer disimpan pada suhu kamar selama 24 jam.
- i) Setelah 24 jam, campuran disaring dengan kertas filter hingga diperoleh cairan yang bebas dari partikel kasar.
- j) Diperoleh larutan ekstrak etanol daun alpukat dengan konsentrasi 100%.
- k) Hasil selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak daun alpukat menggunakan alat *rotavapor*.
- l) *Evaporator* dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja percobaan.
- m) Hasil rendaman etanol dipindahkan ke labu pemindah ekstraksi.
- n) Proses ekstraksi daun alpukat telah selesai, selanjutnya dilakukan proses evaporasi.
- o) Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah *evaporator*, pendingin spiral dihubungkan pada bagian atas *evaporator*, lalu penampung etanol dihubungkan pada bagian atas *evaporator*, pendingin spiral

dihubungkan dengan vakum dengan selang plastik; pendingin spiral dihubungkan dengan *waterpump* dengan selang plastik.

- p) *Waterpump* ditempatkan dalam bak yang berisi *aquabidest*, *waterpump* dihubungkan dengan sumber listrik sehingga *aquabidest* akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan merata).
- q) Satu set alat evaporasi diletakkan sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam *aquabidest* pada *waterbath*.
- r) Vakum dan *waterbath* dihubungkan dengan sumber listrik dan suhu pada *waterbath* diatur sekitar 70-80° C (sesuai dengan titik didih etanol)
- s) Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama ± 2-3 jam.
- t) Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 50-60° selama 5 jam.
- u) Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam percobaan. Untuk melarutkan ekstrak tersebut, tambahkan *aquabidest* dan aseton ± 1% atau sampai ekstrak dapat tercampur merata.

4.7.2 Persiapan bakteri

Stock culture bakteri *Streptococcus mutans* dari laboratorium Mikrobiologi Analis Medis Universitas Airlangga Surabaya di BAP kemudian dilakukan identifikasi ulang bakteri *Streptococcus mutans* lalu setelah itu dilakukan penanaman bakteri *Streptococcus mutans* pada medium *BHI broth*

4.7.3 Tes Identifikasi Bakteri

Tes yang dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri *Streptococcus mutans* antara lain adalah tes pewarnaan gram untuk menentukan bakteri tersebut termasuk bakteri gram positif ataupun gram negatif, tes katalase untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Staphylococcus aureus* dan tes optochin untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Streptococcus pneumoniae*.

4.7.3.1 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

- a) Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
- b) Satu ose aquades steril ditetaskan pada gelas objek ditambah sedikit biakan bakteri yang diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquades pada gelas objek dan diratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
- c) Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
- d) Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- e) Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- f) Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- g) Sediaan ditetesi safranin selama $\frac{1}{2}$ menit. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.

- h) Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
- i) Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 400x.
- j) Hasil positif : *Streptococcus mutans* tercat ungu (Gram positif).

4.7.3.2 Tes Katalase

- a) Sediakan pembenihan cair bakteri pada gelas obyek
- b) Kemudian sediaan tersebut ditetesi larutan H₂O₂ 3%
- c) Diamati ada tidaknya gelembung udara yang terjadi
- d) Hasil untuk *Streptococcus mutans* adalah tes katalase negatif.

4.7.3.3 Tes Optochin

- a) Membagi *Chocolate Agar Plate* menjadi empat kuadran
- b) Melakukan *streaking* 1 atau 1½ kuadran pada CAP
- c) Letakkan optochin disk di tengah inokulum dengan penjepit steril
- d) Mengatur posisi disk dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan disk dalam agar
- e) Inkubasi selama 1 malam pada suhu 37°C dalam inkubator
- f) Mengamati zona hambatan di sekeliling disk. Jika terdapat zona ≥ 14 mm yang mengelilingi disk dengan diameter 6 mm dan zona ≥ 16 mm yang mengelilingi disk dengan diameter 10 mm, hasil tes adalah positif dan diidentifikasi sebagai *Streptococcus pneumoniae*.

4.7.4 Persiapan Suspensi Uji *Streptococcus mutans*

- a) Dipersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* dari media BHI yang telah diuji konfirmasi.

- b) Diambil 5 koloni *Streptococcus mutans* ($d \geq 1\text{mm}$) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml BHIA steril. Kemudian diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{\text{maks}} = 625\text{ nm}$. 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).
- c) 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).

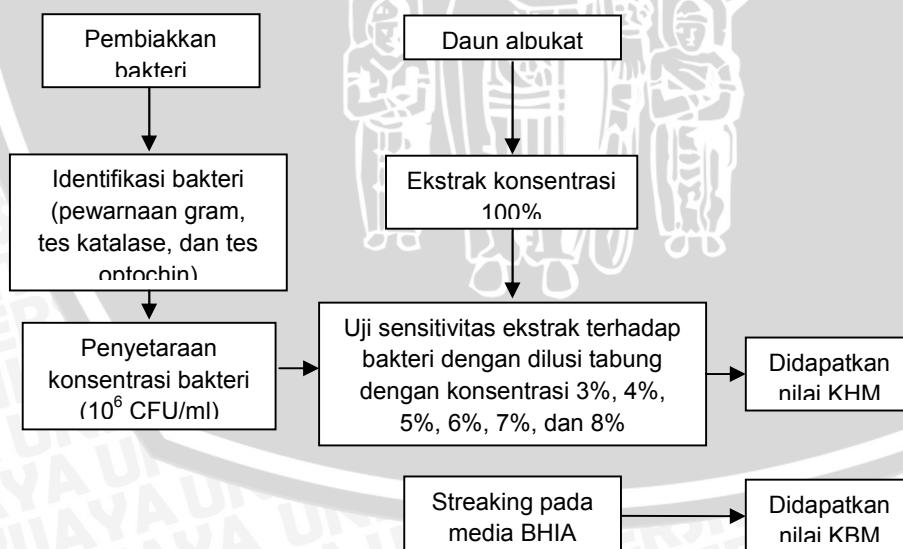
4.7.5 Uji Aktivitas Antibakteri ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap *Streptococcus mutans*

- a) Disediakan masing-masing 7 tabung reaksi steril untuk uji masing-masing ekstrak dan telah diberi tanda 1,2,3,4,5, 6 dan 7. Masing-masing tabung diisi aquades, masing-masing 1 ml; 0,94 ml; 0,92 ml; 0,9 ml; 0,88 ml; 0,86 ml; dan 0,84 ml
- b) Tabung 2,3,4,5,6 dan 7 diisi ekstrak daun alpukat menggunakan pipet hisap, masing-masing sebanyak 0,06ml; 0,08ml; 0,1ml; 0,12ml; 0,14ml dan 0,16ml Tabung 1 tidak diberi ekstrak daun alpukat (kontrol positif).
- c) Masukkan larutan *broth* yang mengandung bakteri uji dengan kekeruhan 10^6 bakteri/ml, sebanyak masing-masing 1 ml ke dalam tabung 1 sampai 7.

- Konsentrasi bahan uji dalam tabung 1 sampai 7 menjadi 0%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7% dan 8% dengan volume yang sama untuk semua tabung yaitu 2 ml.
- Inkubasi keenam tabung ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.
 - Ambil 1 ose larutan dari masing-masing tabung dan lakukan *streaking* pada *Blood Agar Plate* (BAP).
 - Inkubasikan semua BAP di atas dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.
 - Setelah diinkubasi, hitung koloni *Streptococcus mutans* yang tumbuh pada BAP dengan *colony counter*. Tentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) larutan ekstrak etanol daun alpukat tersebut.

4.8 Rancangan Operasional Penelitian

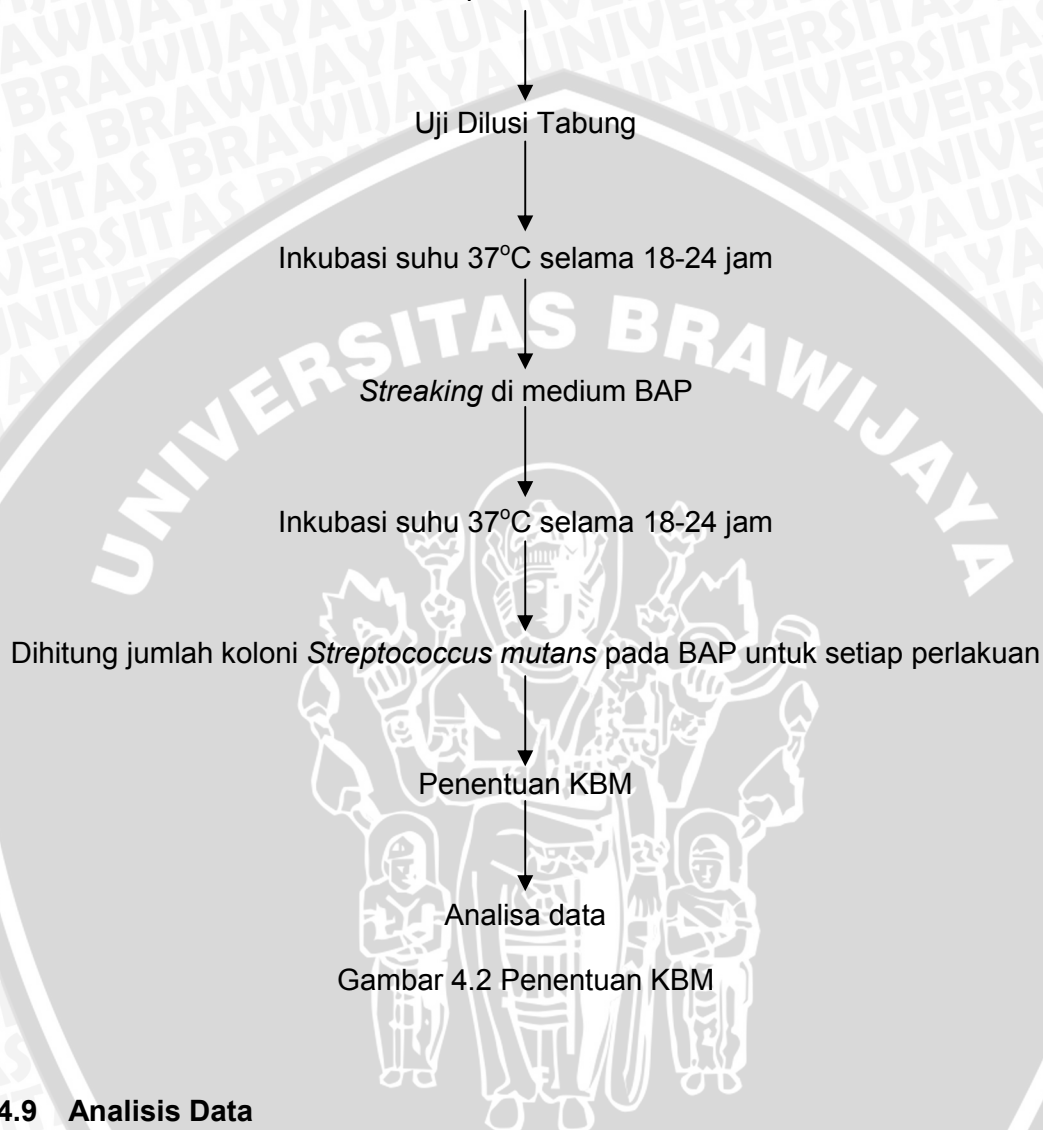
4.8.1. Alur Penelitian keseluruhan



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.8.2. Penentuan KBM

Pembuatan ekstrak etanol daun alpukat konsentrasi 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, dan 8%



Gambar 4.2 Penentuan KBM

4.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one way* ANOVA dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one way* ANOVA dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun alpukat terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans*. Data yang telah diperoleh tersebut terlebih dahulu dilakukan uji distribusi normalitas dan homogenitas varian menggunakan kolmogorov smirnov dan *levane homogeneity test*, kemudian dilanjutkan dengan

Post-Hoc Tukey Multiple Comparison Test untuk menentukan kelompok data mana yang memiliki perbedaan bermakna. Sedangkan uji korelasi *Pearson* dan regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak daun alpukat terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 16.0.

