

BAB 4

METODE PENELITIAN

1.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah desain penelitian *true experimental post control design only* dengan metode *tube dilution test* untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol kismis (*Vitis vinifera L.*) terhadap kolonisasi *S. mutans* secara *in vitro*. Penelitian ini meliputi tahap pengujian bahan di media BHI (*Brain Heart Infusion*) broth untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan dilanjutkan dengan penggoresan (*streaking*) pada media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*) Plate untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

1.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Maret 2012 sampai Mei 2012.

1.3 Bahan Uji dan Sampel Penelitian

Bahan uji yang digunakan adalah kismis jenis *Thompson Seedles Raisin* yang didapatkan dari supermarket Avia kota Malang provinsi Jawa Timur, yang kemudian dibuat ekstrak. Sedangkan sampel penelitian adalah bakteri *S. mutans* Strain 2302-unr yang diperoleh dari stok Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

1.4 Estimasi Jumlah Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan 7 konsentrasi ekstrak etanol kismis yang berbeda-beda dan 1 jenis isolat bakteri *S. mutans* sebagai kontrol bakteri, maka berdasarkan perhitungan rumus (Loekito, 1998) didapatkan pengulangan :

$$\begin{aligned} p(n-1) &= 16 \\ 7(n-1) &= 16 \\ 7n-7 &= 16 \\ 7n &= 23 \rightarrow n = 3,2 \rightarrow 4 \end{aligned}$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan
 n = jumlah pengulangan

Jadi pada penelitian ini masing-masing perlakuan diulang 4 kali

1.5 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini ada dua, yaitu variabel tergantung dan variabel bebas.

1.5.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan jumlah koloni bakteri *S. mutans*.

1.5.2 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah ekstrak etanol kismis (*Vitis vinifera L.*) dengan konsentrasi 47,5%, 50%, 52,5%, 55%, 57,5%, 60% (v/v).

1.6 Definisi Operasional

- Ekstrak etanol kismis (*Vitis vinifera L.*) berasal dari kismis yang dibeli di Supermarket Avia kota Malang yang kemudian diekstraksi menggunakan metode sokhlet dengan pelarut etanol 96%.

- b. Bakteri *Streptococcus mutans* yang digunakan berasal dari stok Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, isolat strain 2302-unr. Bakteri ini dibiakkan dari stok bakteri milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang berasal dari plak pada gigi pasien.
- c. Koloni bakteri *S. mutans* adalah sekumpulan bakteri yang ditunjukkan dengan bentukan bulat berwarna kuning yang tumbuh pada media tanam.
- d. Bakteri dalam penelitian ini menggunakan bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/ml (Lalitha, 2009).
- e. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol kismis (*Vitis vinifera L.*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji (*S. mutans*), ditandai dengan tidak terdapatnya kekeruhan pada larutan ekstrak etanol kismis (*Vitis vinifera L.*) yang telah diberi bakteri uji pada tabung.
- f. Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol kismis (*Vitis vinifera L.*) yang mampu membunuh bakteri uji (*S. mutans*), tidak ditandai dengan terdapatnya pertumbuhan koloni bakteri pada media *Brain Heart Infusion Agar Plate* (BHIAP) atau jumlah koloni bakteri uji (*S. mutans*) tidak lebih besar dari 0,1% (0,1%) dari jumlah *Original inoculum* setelah diinokulasi dengan satu ose (1/100 ml) larutan ekstrak etanol kismis (*Vitis vinifera L.*).

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi Ekstrak etanol kismis (*Vitis vinifera* L.)

Ekstraktor sokhlet, *waterbath*, labu erlenmeyer, *beaker glass*, timbangan analitik, pisau, nampan, oven, *rotary evaporator*, etanol, es batu/cairan pendingin.

4.7.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri *S. mutans*

Isolat bakteri *S. mutans*, bahan pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), minyak emersi, aquadest, ose (1/1000 ml), mikroskop, api spiritus, *object glass*, kertas penghisap, kapas.

4.7.3 Alat dan Bahan untuk Tes Katalase

Gelas obyek, pipet, isolat bakteri *S. mutans*, larutan H₂O₂ 3% (v/v)

4.7.4 Alat dan Bahan untuk Tes Hemolisa Optochin

Blood Agar Plate (BAP), isolat bakteri *S. mutans*, penjepit steril, optochin disk, inkubator

4.7.5 Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Tabung

Tabung reaksi, mikropipet steril, inkubator, ose (1/100 ml), ekstrak kismis (*Vitis vinifera* L.), isolat bakteri *S. mutans*, aquadest steril, NaCl, rak tabung reaksi, spidol, kertas label, vortex, *colony counter*, *Brain Heart Infusion* (BHI) *Broth*, BHIAP (*Brain Heart Infusion Agar Plate*), spektrofotometer.

4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri prosedur proses pembuatan ekstrak etanol kismis (*Vitis vinifera L.*), pemeriksaan mikroskopik, tes katalase, tes hemolisa optochin persiapan suspensi uji *S. mutans*, dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol kismis (*Vitis vinifera*) terhadap *S. mutans*.

1.6.1 Pembuatan Ekstrak Kismis (*Vitis vinifera L.*)

- a. 100 gram kismis diblender sampai halus dan ditempatkan dalam kertas saring
- b. Memasukkan kertas saring yang berisi sampel kedalam mesin ekstraktor sokhlet
- c. Memasukkan etanol ke dalam labu alas bulat
- d. Memasukkan beberapa batu didih dalam labu alas bulat
- e. Kondensor dipasang
- f. Mengalirkan pendingin melalui kondensor ke alat ekstraktor sokhlet
- g. Lalu alas bulat dipanaskan menggunakan *heating mantel*
- h. Melakukan ekstraksi
- i. Cairan hasil ekstraksi setelah di evaporasi dibiarkan dingin lalu dimasukan ke dalam *rotary evaporator*
- j. Cairan hasil ekstraksi diambil dan diukur volume serta berat jenisnya

1.6.2 Identifikasi Bakteri *S. mutans*

1.6.2.1 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 aquadest steril diteteskan pada gelas objek ditambah sedikit biakan bakteri yang diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquadest pada gelas objek dan diratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquadest.
- 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 1000x.
- j. Hasil positif : *S. mutans* tercat ungu (Gram positif) berbentuk bulat dan berantai.

1.6.2.2 Tes Katalase

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

4.8.2.3 Tes Optochin

- a. Membagi *Blood Agar Plate* (BAP) menjadi empat kuadran
- b. Melakukan *streaking* 1 atau 1½ kuadran pada BAP
- 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. Pastikan permukaan disk menempel secara adequate pada agar
- e. Inkubasi selama 18 sampai 24 jam pada suhu 35°C dalam 5% CO₂ dalam inkubator
- f. Amati 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 *S. pneumoniae*. Jika tidak terdapat zona Inhibisi maka hasilnya adalah negatif dan bakteri diidentifikasi sebagai *S. mutans*
- g. Hasil pada Tes ini adalah Negatif (Forbes et al., 2002)

4.8.2.4 Persiapan Suspensi Uji *S. mutans*

- a. Dipersiapkan bakteri *S. mutans* dari media BHI *broth* yang telah diuji konfirmasi.

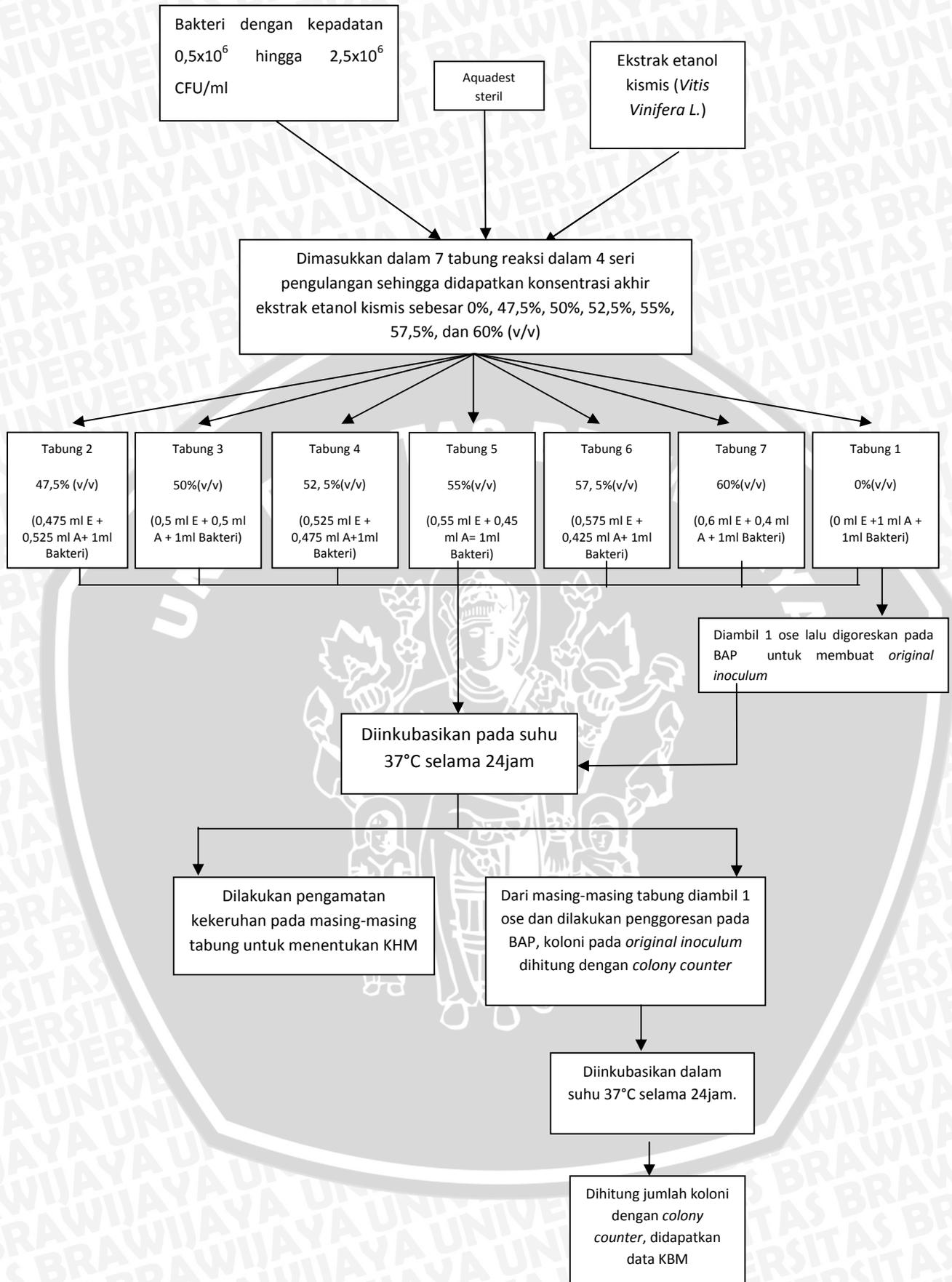
- b. Ambil 5 koloni (d = 1mm) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{\text{maks}} = 530 \text{ nm}$. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung 1×10^6 hingga 5×10^6 CFU/ml dengan rumus $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$.
- 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 dua kali hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml.

4.8.3 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kismis (*Vitis vinifera L.*) Terhadap *S. mutans*

Rangkaian uji aktivitas antibakteri ekstrak kismis (*Vitis vinifera L.*) adalah sebagai berikut:

- a. Disediakan tabung reaksi steril yang telah ditandai 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.
- b. Tabung 1 diisi dengan ekstrak kismis (*Vitis vinifera L.*) dengan menggunakan mikropipet sebanyak 2 ml (100%). Tabung ini digunakan sebagai kontrol (-).
- c. Untuk konsentrasi 60% masukan 0,6 ml ekstrak kismis 100% dan dicampur dengan aquades 0,4 ml.
- d. Untuk konsentrasi 57,5% masukan 0,575 ml ekstrak kismis 100% dan dicampur dengan aquades 0,325 ml.
- e. Untuk konsentrasi 55% masukan 0,55 ml ekstrak kismis 100% dan dicampur dengan aquades 0,45 ml.

- f. Untuk konsentrasi 52,5% masukan 0,525 ml ekstrak kismis 100% dan dicampur dengan aquades 0,475 ml.
- g. Untuk konsentrasi 50% masukan 0,5 ml ekstrak kismis 100% dan dicampur dengan aquades 0,5 ml.
- h. Untuk konsentrasi 47,5% masukan 0,475 ml ekstrak kismis 100% dan dicampur dengan aquades 0,525 ml.
- i. Dimasukkan suspensi bakteri *S. mutans* dengan kepadatan $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml pada tabung 2, 3, 4, 5, 6, 7 masing-masing sebanyak 1ml.
- j. Tabung 8 diisi dengan suspensi larutan bakteri *S. mutans* dengan kepadatan $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml sebanyak 1 ml, kemudian ditambah dengan 1ml aquadest (ekstrak kismis 0%). Tabung ini digunakan sebagai kontrol (+).
- k. Kontrol bakteri (0%) digoreskan pada BHIAP sebagai *original inoculum* (OI) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .
- l. Kedelapan tabung divortex kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
- m. Setelah diinkubasikan, tabung 2-7 diamati dan dinilai tingkat kekeruhannya dengan membandingkan larutan tersebut dengan kontrol (-) dan (+). Tentukan KHM larutan tersebut.
- n. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose, kemudian diinokulasikan pada BAP.
- o. Kemudian BAP diinkubasikan dengan suhu 37°C selama 24 jam.
- p. Setelah diinkubasikan, hitung koloni yang tumbuh pada BAP dengan *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada BAP atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di OI.



Gambar 4.2. Skema Prosedur Penelitian

Keterangan: A=Aquadest, E=Ekstrak

4.9 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian menggunakan uji dan *levene test of variance*. Apabila data terdistribusi normal, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one way ANOVA* dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one way ANOVA* digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak kismis (*Vitis vinifera L.*) terhadap jumlah koloni bakteri *S. mutans*. Sedangkan uji Korelasi-Regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak kismis (*Vitis vinifera L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *S. mutans*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 17.0 dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$)

