

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratoris secara *in vitro* untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun asam pada berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan koloni *Streptococcus mutans*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *dilusi* agar untuk menentukan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan *dilusi* tabung yang ditujukan untuk mendapatkan nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM).

4.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang didapat dari biakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Dalam penelitian ini, banyaknya *replikasi* ditentukan dengan menggunakan rumus estimasi besar sampel sebagai berikut :

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

Keterangan :

n = jumlah sampel

p = jumlah perlakuan/jumlah konsentrasi

(7 perlakuan, yaitu 5 konsentrasi ekstrak etanol daun asam, 1 kontrol kuman, dan 1 kontrol bahan)

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

$$7(n - 1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,1 \approx 4$$

Jadi jumlah *replikasi* yang harus dilakukan untuk mendapatkan jumlah sampel yang dapat dipercaya adalah sebanyak empat kali.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun asam dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu 10%, 8%, 6%, 4%, dan 2%. Konsentrasi tersebut diperoleh melalui penelitian pendahuluan.

4.3.2 Variabel Tergantung

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

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus-Desember 2013.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan dan Alat Pewarnaan Gram

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk identifikasi bakteri adalah isolat bakteri *Streptococcus mutans*, pewarna Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%,

safranin), minyak emersi, ose, kertas penghisap, mikroskop, tabung reaksi, *bunsen brander*, dan *object glass*.

4.5.2 Bahan dan Alat Tes *Katalase*

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk melakukan tes *katalase* adalah hasil pembiakan cair *Streptococcus mutans*, H₂O₂, pipet, dan tabung reaksi.

4.5.3 Bahan dan Alat Tes *Optochin*

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk melakukan tes *optochin* adalah *Chocolate Agar Plate* (CAP), *optochin disk*, ose, dan inkubator.

4.5.4 Bahan dan Alat Pembuatan Ekstrak Daun Asam

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk ekstraksi daun asam adalah 100 gram daun asam kering berbentuk serbuk, timbangan, etanol 96%, gelas ukur, tabung *erlenmeyer*, kertas saring, *rotary evaporator*, labu penampung etanol, dan botol hasil ekstrak.

4.5.5 Bahan dan Alat Pembiakan cair

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk pembuatan biakan cair bakteri adalah *isolat Streptococcus mutans*, ose, tabung reaksi, *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), dan inkubator.

4.5.6 Bahan dan Alat Tes *Dilusi Agar*

Bahan dan alat yang digunakan dalam metode *dilusi* agar adalah hasil pembiakan cair bakteri, BHIA, ekstrak pada berbagai konsentrasi, *plate*, pipet, *bunsen brander*, spidol, kertas label dan inkubator.

4.5.7 Bahan dan Alat Tes *Dilusi Tabung*

Bahan dan alat yang digunakan dalam metode *dilusi* tabung adalah hasil ekstraksi daun asam, *isolat Streptococcus mutans*, *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA), akuades, tabung reaksi, rak

tabung reaksi, pipet, ose, inkubator, *bunsen brander*, spidol, kertas label, dan *vortex*.

4.6 Definisi Istilah/Operasional

- Daun asamyang digunakan adalah daun asamsegar yang didapat dari Balai Materia Medica, UPT Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, Kota Batu.
- Ekstrak daun asam merupakan daun asam kering yang telah dihaluskan kemudian diekstrak dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi.
- *Isolat Streptococcus mutans* adalah *isolat* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak daun asamyang dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*. KHM diperoleh dengan cara membandingkan secara visual kualitas tingkat kekeruhan larutan ekstrak daun asam yang telah diberi bakteri uji dalam media BHIB. Kekeruhan dapat diamati dengan bantuan kertas bergaris-garis hitam yang diletakkan di belakang tabung-tabung uji. KHM ditandai oleh tabung dengan larutan yang paling jernih atau tabung dengan garis hitam yang terlihat paling jelas. Bila tidak dapat diamati, KHM didapat dengan menggunakan metode *dilusi* agar yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri secara kasat mata.
- Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak daun asam yang mampu membunuh *Streptococcus mutans*. Jumlah koloni pada setiap konsentrasi dihitung secara kuantitatif menggunakan *colony*

counter.KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri atau kurang dari 0,1% *Original Inoculum* (OI).

- *Original Inoculum* adalah inokulasi bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media BHIA dan digunakan untuk mencari kategori KBM.

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Identifikasi Bakteri

4.7.2.1 Pewarnan Gram

1. Dibuat suspensi akuades dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan udara.
2. Sesudah kering difiksasi di atas *apibunsen*.
3. Sediaan dituangi kristal violet selama 1 menit.
4. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
5. Sediaan dituangi *lugol* selama 1 menit.
6. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik.
8. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
9. Sediaan dituangi *safranin* selama 0,5 menit.
10. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
11. Dikeringkan dengan kertas penghisap.
12. Diamati dengan mikroskop pembesaran 1000x dengan intensitas sinar rendah.

4.7.2.2 Tes *Katalase*

Tes ini bermaksud untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, yaitu dengan menambahkan larutan H₂O₂ 3% pada pembiakan cair. *Streptococcus* akan memberikan hasil negatif yang ditunjukkan dengan tidak munculnya gelembung udara. Langkah-langkah tes *katalase* sebagai berikut:

1. Sediakan biakan cair *Streptococcus mutans* pada tabung reaksi.
2. Tetesi dengan 1 tetes H₂O₂ 3%.
3. Amati timbulnya gelembung-gelembung udara pada media pembiakan.

4.7.2.3 Tes *Optochin*

1. Menyiapkan *Chocolate Agar Plate (CAP)*
2. Melakukan *streaking Streptococcus mutans* pada CAP.
3. Letakkan *optochin disk* di tengah *inoculum* dengan penjepit steril.
4. Mengatur posisi *disk* dengan menekan *disk* pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan *disk* dalam agar.
5. Inkubasi selama 1 malam pada suhu 37°C dalam inkubator.
6. 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 *Streptococcus pneumoniae*. *Streptococcus mutans* menunjukkan hasil reaksi negatif (resisten terhadap *optochin*).

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Daun Asam

1. Daun asam sebanyak 1000 gram dicuci dengan air, diangin-anginkan, kemudian dijemur dengan panas matahari sampai kering. Daun yang telah kering dihaluskan menggunakan *blender* sampai menjadi serbuk.

Sebanyak 100 gram serbuk dimasukkan ke dalam tabung *erlenmeyer*, kemudian ditambahkan 300 ml etanol 96%.

2. Tutup tabung *erlenmeyer*, kocok perlahan (40 kali/menit) sampai homogen. Simpan pada suhu kamar sampai mengendap (\pm 1-7 hari).
3. Lapisan atas larutan ekstrak etanol daun asam disaring dengan kertas filter. Filtrat yang diperoleh ditampung.
4. Hasil selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan zat aktif ekstrak daun asam yang sudah terekstrak menggunakan bantuan alat *rotary evaporator*. Setelah itu, hasilnya dioven (40° C) untuk menghilangkan sisa pelarut yang mungkin belum menguap. Ekstrak disimpan di dalam botol, kemudian disimpan dalam lemari es.

4.7.3 Pembiakan Bakteri

Streptococcus mutans yang telah diidentifikasi dibiakan pada media cair dengan menggunakan *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) selama 1 x 24 jam pada suhu 37° C.

4.7.4 Pembuatan Suspensi Uji *Streptococcus mutans*

1. Ambil 5 koloni ($d \geq 1$ mm) dengan ose.
2. Koloni tersebut dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril.
3. Dilakukan penyetaraan dengan mengukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optis dengan *spectrophotometer* pada $\lambda = 625$ nm.
4. Apabila belum setara, dilakukan pengeceran menggunakan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$. ($n = OD$, $v =$ volum NaCl).
5. Dari hasil yang diperoleh dibuat pembiakan cair bakteri yang mengandung 1×10^6 hingga 5×10^6 CFU/ml.

4.7.5 Prosedur Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Asam Menggunakan Metode *Dilusi Tabung*

1. Siapkan 7 tabung reaksi steril dan 8 *plate* steril. Lima tabung untuk konsentrasi uji dan 1 tabung sebagai kontrol kuman (kontrol positif, disingkat KK), serta 1 tabung sebagai kontrol bahan (kontrol ekstrak, disingkat KB). Tujuh *plate* untuk perlakuan yang tersebut di atas, 1 *plate* sebagai OI.
2. Dilakukan penelitian pendahuluan digunakan untuk pencarian konsentrasi. Diawali dengan konsentrasi ekstrak 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; dan 0%. Setelah itu dilakukan perapatan konsentrasi berdasarkan hasil dari penelitian tersebut hingga dicapai ekstrak daun pandan wangi dengan konsentrasi 10%, 8%, 6%, 4%, 2%.
3. Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol daun asam didapatkan dari metode pengenceran seri dengan cara mencampurkan komposisi sebagai berikut:
 - Kontrol Bahan = 1 ml ekstrak etanol daun asam konsentrasi 100% + 1 ml BHIB
 - Konsentrasi 10% = 0,10 ml ekstrak etanol daun asam konsentrasi 100% + 0,90 ml akuades + 1 ml suspensi bakteri *Streptococcus mutans*
 - Konsentrasi 8% = 0,08 ml ekstrak etanol daun asam konsentrasi 100% + 0,92 ml akuades + 1 ml suspensi bakteri *Streptococcus mutans*
 - Konsentrasi 6% = 0,06 ml ekstrak etanol daun asam konsentrasi 100% + 0,94 ml akuades + 1 ml suspensi bakteri *Streptococcus mutans*
 - Konsentrasi 4% = 0,04 ml ekstrak etanol daun asam konsentrasi 100% + 0,96 ml akuades + 1 ml suspensi bakteri *Streptococcus mutans*
 - Konsentrasi 2% = 0,02 ml ekstrak etanol daun asam konsentrasi 100% + 0,98 ml akuades + 1 ml suspensi bakteri *Streptococcus mutans*

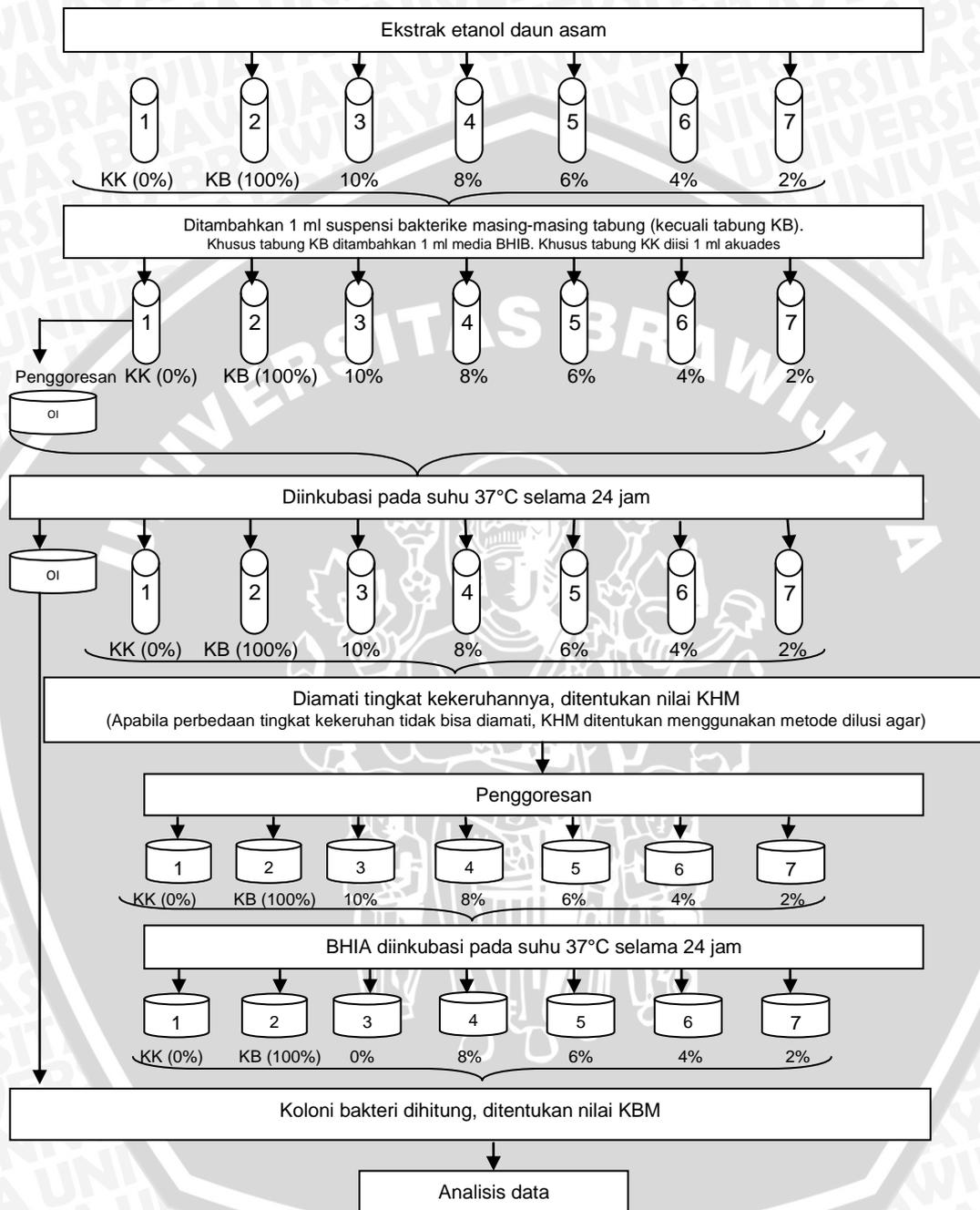
- Kontrol Kuman = 1 ml akuades + 1 ml suspensi bakteri *Streptococcus mutans*
4. Masing-masing tabung divortex
 5. Kontrol Kuman (0%) diambil sebanyak satu ose, digoreskan pada BHIA sebagai *Original Inoculum*.
 6. *Plate* OI dan semua tabung diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
 7. Pada hari ke-2 semua tabung dikeluarkan dari inkubator.
 8. Tingkat kekeruhan tabung diamati secara visual dibantu dengan kertas bergaris-garis hitam yang diletakkan di belakang tabung. Pada penelitian ini, semua tabung terlihat keruh, tidak ada tabung yang jernih, ditandai dengan garis-garis hitam tidak terbaca. Oleh karena itu KHM didapatkan dengan metode *dilusi* agar
 9. Dilakukan penggoresan pada BHIA dari masing-masing tabung *dilusi*. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
 10. Pada hari ke-3, hitung *Colony Forming Unit* yang terbentuk menggunakan *colony counter*. Dari hasil tersebut, ditentukan nilai KBM. KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri atau kurang dari 0,1% *Original Inoculum* (OI).

4.7.6 Prosedur Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Asam Menggunakan Metode *Dilusi* Agar

1. Disediakan 6 *plate* steril berdiameter 9 cm, kemudian diberi tanda besaryakonsentrasi larutan ekstrak yang dicampur dalam BHIA, yaitu 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%.
2. Volume yang dipakai dalam setiap *plate* adalah 15 ml, jadi volume ekstrak dan agar (BHIA) yang dimasukkan ke dalam *plate*:

- Konsentrasi 0% = 0 ml ekstrak 100% + 15 ml BHIA
 - Konsentrasi 2% = 0,30 ml ekstrak 100% + 14,70 ml BHIA
 - Konsentrasi 4% = 0,60 ml ekstrak 100% + 14,40 ml BHIA
 - Konsentrasi 6% = 0,90 ml ekstrak 100% + 14,10 ml BHIA
 - Konsentrasi 8% = 1,20 ml ekstrak 100% + 13,80 ml BHIA
 - Konsentrasi 10% = 1,50 ml ekstrak 100% + 13,50 ml BHIA
3. Setelah dicampur larutan ekstrak agar kemudian dipanaskan, tuang ke plate, lalu ditunggu hingga agarnya dingin, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
 4. *Plate* tersebut ditandai menjadi menjadi 4 bagian yang pada setiap bagian ditetesi bakteri uji.
 5. Semua *plate* diinkubasikan selama 18-24 jam.
 6. Dilakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh pada *plate* BHIA. Konsentrasi ekstrak pada *plate* BHIA yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni disebut sebagai KHM.

4.7.7 Kerangka Operasional Penelitian Metode *Dilusi Tabung*

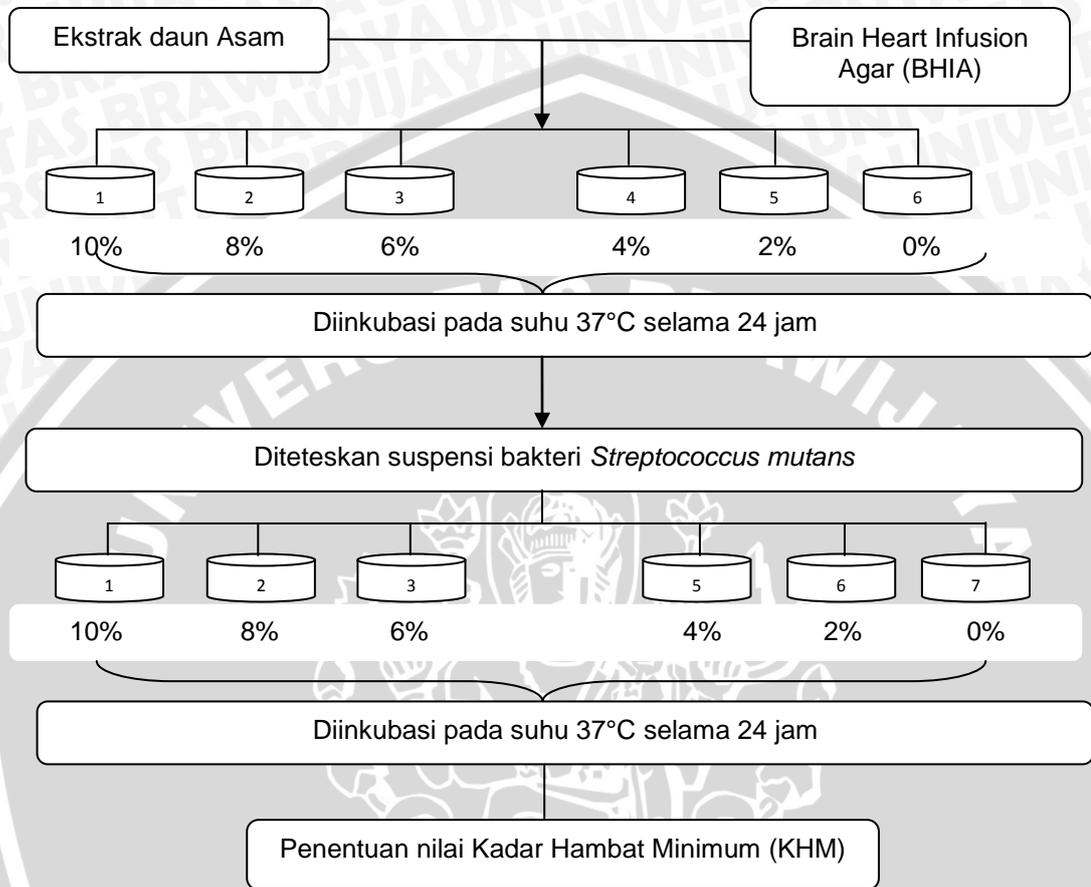


Gambar 4.1 Kerangka Operasional penelitian Metode *Dilusi Tabung*

Keterangan:

- KB = KontrolBahan (1 ml ekstrak 100% + 1 ml media BHIB)
- KK = Kontrol Kuman (1 ml suspensi *Streptococcus mutans* + 1 ml akuades)
- OI = *Original Inoculum*
- KHM = Kadar Hambat Minimum
- KBM = Kadar Bunuh Minimum

4.7.8 Kerangka Operasional Penelitian Metode *Dilusi Agar*



Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian Metode *Dilusi Agar*

4.8 Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dari empat replikasi percobaan, data-data jumlah koloni yang tumbuh dianalisis dengan menggunakan uji statistik. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 12.0. Data tersebut diuji distribusinya menggunakan uji normalitas Kolmogorof-smirnov. Distribusi data normal jika nilai signifikansi $> 0,05$.

Apabila data berdistribusi normal, maka digunakan uji statistik parametrik, yaitu uji *One Way Anova*. Uji *oneway ANOVA* bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun asam terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans*. Selanjutnya dilakukan uji korelasi Pearson kemudian uji regresi. Uji korelasi untuk menunjukkan apakah ada hubungan konsentrasi ekstrak daun asam dengan jumlah pertumbuhan koloni *Streptococcus mutans*. Uji ini mengetahui bagaimana arah hubungan tersebut, apakah dengan peningkatan konsentrasi akan menjadi penurunan jumlah koloni, dan sebaliknya, atau tidak berhubungan. Uji regresi berfungsi untuk mengetahui seberapa besar hubungan tersebut.