

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan rancangan eksperimental murni (*True Experimental Design*) dengan *Post Test Only Control Group Design*. Desain ini terdapat dua kelompok yang masing-masing dipilih secara acak. Kelompok pertama diberi perlakuan yang disebut kelompok eksperimen dan kelompok lain yang tidak diberi perlakuan disebut kelompok kontrol. Kemudian kedua kelompok ini dibandingkan setelah diberi tindakan (Emzir, 2009).

#### 4.2 Populasi dan Sampel

Bakteri *Streptococcus mutans* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Sampel penelitian diambil dengan teknik *random sampling*. Sampel penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dari banyaknya pengulangan pada penelitian ini yang dapat ditentukan dengan rumus (Solimun, 2001) sebagai berikut :

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

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Dalam penelitian ini akan menggunakan 7 perlakuan yaitu 5 konsentrasi ekstrak etanol biji mangga gadung, kontrol positif, dan kontrol negatif maka jumlah pengulangan:

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,143 \approx 4$$

Jadi, jumlah pengulangan yang dilakukan pada setiap perlakuan adalah masing-masing minimal 4 kali.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Tabel 4.1 Variabel Penelitian

Variabel	Definisi Operasional Variabel	Cara Mengukur	Skala
<b>Variabel Tergantung</b>	Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri <i>Streptococcus mutans</i> di sekitar disk.	Menggunakan kaliper	Rasio (dalam mm)
<b>Variabel Bebas</b>	Ekstrak etanol biji buah mangga gadung ( <i>Mangifera indica</i> L.) dengan konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Konsentrasi ini ditentukan dari penelitian pendahuluan yang dapat dilihat pada lampiran 2.	Menggunakan mikropipet	Rasio (dalam ml)

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2013 sampai Februari 2014 dan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.5.1 Bahan Penelitian

###### 4.5.1.1 Bahan Pewarnaan Gram

- Isolat *Streptococcus mutans*
- Aquades steril
- Pewarna gram (kristal violet, lugol, ethanol 96%, dan safranin)
- Minyak emersi

###### 4.5.1.2 Bahan Tes Katalase

- Perbenihan cair
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%

###### 4.5.1.3 Bahan Tes Optochin

- Chocolate Agar Plate (CAP)
- Optochin disk 5 µg

###### 4.5.1.4 Bahan Pembuatan Ekstrak Biji Buah Mangga Gadung

- Biji buah mangga gadung
- Etanol 96% sebagai pelarut
- Aquades steril

###### 4.5.1.5 Bahan Tes Difusi Disk

- Hasil ekstraksi biji buah mangga gadung
- Isolat *Streptococcus mutans*



- c. *Blank disc*
- d. *Antibiotic disc (Penicillin G, 10 units)*
- e. *BHI (Brain Heart Infusion) agar*
- f. Aquades

#### 4.5.2 Alat Penelitian

##### 4.5.2.1 Alat untuk Pewarnaan Gram

- a. Ose lurus, ose lengkung
- b. *Object glass*
- c. *Bunsen burner*
- d. Tabung reaksi
- e. Kertas penghisap
- f. Minyak emersi
- g. Mikroskop

##### 4.5.2.2 Alat untuk Tes Katalase

- a. Pipet
- b. Tabung reaksi

##### 4.5.2.3 Alat untuk Tes Optochin

- a. Ose
- b. Inkubator

##### 4.5.2.4 Alat untuk Ekstraksi dan Evaporasi Biji Buah Mangga Gadung

- a. Blender
- b. Timbangan
- c. Tabung erlenmeyer
- d. Corong gelas



- e. Kertas filter
- f. Evaporator
- g. Botol hasil ekstrak

#### 4.5.2.5 Alat untuk Tes Difusi Disk

- a. Cawan petri
- b. Mikropipet
- c. Ose lengkung
- d. Inkubator
- e. *Bunsen burner*
- f. Label
- g. Pinset
- h. Kaliper
- i. Pipet pengencer (*eppendorf*)

#### 4.6 Definisi Operasional

- 4.6.1 Biji mangga diperoleh dari biji buah mangga gadung (*Mangifera indica* L.) yang dibeli dari supermarket Carrefour di kota Malang dan divalidasi di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
- 4.6.2 Ekstrak biji mangga gadung (*Mangifera indica* L.) berupa biji yang dikeringkan lalu diambil inti bijinya kemudian dihaluskan dengan blender dan diekstrak dengan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi selama 24 jam.
- 4.6.3 Bakteri *Streptococcus mutans* adalah bakteri yang berbentuk kokus, terlihat berwarna ungu pada pewarnaan gram, tidak menunjukkan adanya gelembung pada uji katalase, dan tidak

menunjukkan adanya zona hambatan di sekitar disk pada tes optochin. Bakteri diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

- 4.6.4 Zona hambat adalah daerah pada metode difusi disk yang ditandai dengan adanya daerah jernih di sekitar disk pada media BHI (*brain heart infusion*) agar yang berisi bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diberi ekstrak etanol biji mangga gadung (*Mangifera indica* L.) dan diukur diameternya menggunakan kaliper. Interpretasi daerah hambatan pertumbuhan bakteri mengacu pada standar umum obat asal tanaman yakni diameter zona hambat di sekitar disk ekstrak berukuran 12-24 mm (Hermawan, 2007).

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Identifikasi Bakteri

Untuk membuktikan bahwa koloni yang tumbuh adalah bakteri *Streptococcus mutans* maka perlu dilakukan serangkaian tes yaitu tes pewarnaan gram, tes katalase, dan tes optochin (William *et al*, 2012).

#### 4.7.1.1 Pewarnaan Gram (Sulistiyaningsih, 2008)

Tes pewarnaan gram untuk menentukan bakteri tersebut, jika berwarna pink termasuk dalam bakteri gram negatif, tetapi jika berwarna ungu termasuk dalam bakteri gram positif.

Prosedur pewarnaan gram:



- a. Buat sediaan dengan mengambil sedikit bakteri dengan menggunakan ose steril. Kemudian letakkan di *object glass* lalu dikeringkan di udara.
- b. Sediaan yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkannya di atas api bunsen beberapa kali.
- c. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit.
- d. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan dituangi lugol dan dibiarkan selama 1 menit.
- f. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- g. Sediaan dituangi etanol 96% selama 5-10 detik.
- h. Sisa etanol dibuang dan dibilas dengan air.
- i. Sediaan dituangi safranin selama 30 detik.
- j. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- k. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi, dan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 1000x.
- l. Hasil positif : *Streptococcus mutans* berwarna ungu (gram positif).

#### 4.7.1.2 Tes Katalase (Ardiani, 2011)

Tes katalase bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya enzim katalase pada bakteri. Jika mengeluarkan gelembung berarti positif, tetapi jika tidak bergelembung hasilnya negatif.

Prosedur tes katalase:

- a. Buat sediaan perbenihan cair *Streptococcus mutans* di tabung reaksi.
- b. Kemudian sediaan ditetesi dengan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%.
- c. Perhatikan ada tidaknya gelembung udara yang terjadi.

- d. Hasil untuk *Streptococcus mutans* adalah tidak ada gelembung udara (hasil negatif).

#### 4.7.1.3 Tes Optochin (Richter *et al*, 2008)

Tes optochin untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Streptococcus pneumoniae* dengan hasil negatif yaitu terbentuknya zona hambat < 14 mm di sekitar disk.

Prosedur tes optochin:

- Melakukan penggoresan bakteri pada CAP (*Chocolate Agar Plate*).
- Letakkan optochin disk 5 µg di tengah inokulum dengan penjepit steril.
- Mengatur posisi disk dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan disk dalam agar.
- Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator.
- Mengamati zona hambatan di sekeliling disk. Jika terdapat zona < 14 mm yang mengelilingi disk dengan diameter 6 mm, maka hasil tes adalah negatif dan diidentifikasi sebagai *Streptococcus mutans*.

#### 4.7.2 Pembuatan Suspensi Uji *Streptococcus mutans*

- 4.7.2.1 Dipersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* dari media BHI yang telah diuji konfirmasi.
- 4.7.2.2 *Streptococcus mutans* yang telah diidentifikasi dibiakkan pada medium cair dengan menggunakan *BHI broth* dan disimpan dalam *anaerobic jar* selama 24 jam pada suhu 37°C. Kekeruhan kultur tersebut dicocokkan dengan standar 0.5 *Mc Farland* atau setara dengan konsentrasi  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml.



### 4.7.3 Pembuatan Sediaan Ekstrak

#### 4.7.3.1 Proses Pembuatan Ekstrak Biji Buah Mangga Gadung (*Mangifera indica* L.) (Maisuthisakul, 2009)

- a. Biji buah mangga gadung dicuci dengan air sampai bersih.
- b. Setelah dicuci, biji buah mangga gadung dikeringkan di panas matahari selama 3 hari.
- c. Kemudian biji buah mangga gadung (inti) dikeluarkan dari kulit biji.
- d. Biji buah mangga gadung (inti) dipotong kecil-kecil kemudian ditimbang dan diambil sebanyak 200 gram.
- e. Biji buah mangga gadung tersebut dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer.
- f. Kemudian ditambahkan 600 ml etanol 96%.
- g. Tabung erlenmeyer ditutup rapat dan dikocok perlahan-lahan.
- h. Tabung erlenmeyer disimpan pada suhu kamar selama 24 jam.
- i. Setelah 24 jam, campuran disaring dengan kertas filter.
- j. Hasil filtrat selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak biji buah mangga gadung dengan menggunakan alat evaporator.
- k. Filtrat dievaporasi dengan pengurangan tekanan pada suhu yang diatur sesuai dengan titik didih etanol hingga semua pelarut terpisah.
- l. Kemudian akan didapatkan hasil akhir yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak biji buah mangga gadung dengan konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol.

#### 4.7.3.2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Biji Buah Mangga Gadung (Ranuwibawa, 2013)

- a. 100% = 1 ml ekstrak biji mangga gadung 100%
- b. 50% = 0,5 ml ekstrak biji mangga gadung 100% ditambah 0,5 ml aquades.
- c. 25% = 0,25 ml ekstrak biji mangga gadung 100% ditambah 0,75 ml aquades
- d. 12,5% = 0,125 ml ekstrak biji mangga gadung 100% ditambah 0,875 ml aquades
- e. 6,25% = 0,0625 ml ekstrak biji mangga gadung 100% ditambah 0,9375 ml aquades

#### 4.7.4 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Buah Mangga Gadung (*Mangifera indica* L.) terhadap *Streptococcus mutans* dengan Metode Dilusi Tabung (Penelitian Pendahuluan)

- 4.7.4.1 Sediakan 6 tabung steril, 4 tabung sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol ekstrak, dan 1 tabung sebagai kontrol bakteri.
- 4.7.4.2 Lima tabung tersebut diisi larutan ekstrak biji buah mangga gadung dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%.
- 4.7.4.3 Masukkan larutan *BHI broth* yang mengandung bakteri uji dengan kekeruhan  $10^6$  CFU/ml masing-masing sebanyak 1 ml ke dalam lima tabung tersebut.
- 4.7.4.4 Kemudian masukkan 1 ml ekstrak biji mangga gadung 100% dan 1 ml aquades ke dalam tabung kontrol ekstrak serta 1 ml

biakan *Streptococcus mutans* dan 1 ml aquades ke dalam kontrol bakteri.

4.7.4.5 Dengan demikian semua tabung masing-masing berisi total larutan sebanyak 2 ml.

4.7.4.6 Masing-masing tabung divortex dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

4.7.4.7 Setelah diinkubasi, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. Amati dan bandingkan kejernihan tabung kemudian tentukan konsentrasi yang menghambat pertumbuhan bakteri. Menentukan konsentrasi yang menghambat pertumbuhan bakteri dapat menggunakan kertas dengan 5 garis hitam yang berbeda ketebalannya, dilewatkan di belakang tabung kemudian amati garis yang terlihat.

#### **4.7.5 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Buah Mangga Gadung (*Mangifera indica* L.) terhadap *Streptococcus mutans* dengan Metode Agar Difusi Disk**

4.7.5.1 Biakan bakteri *Streptococcus mutans* digoreskan (*streaking*) pada media BHI agar

4.7.5.2 *Blank disc* direndam dalam pipet pengencer (*ependorf*) yang berisi larutan ekstrak etanol biji mangga gadung dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25% serta pada aquades sebagai kontrol negatif selama 30 menit

4.7.5.3 Letakkan *blank disc* tiap konsentrasi, *blank disc* (aquades) sebagai kontrol negatif dan *antibiotic disc* (*Penicillin G*, 10 units)



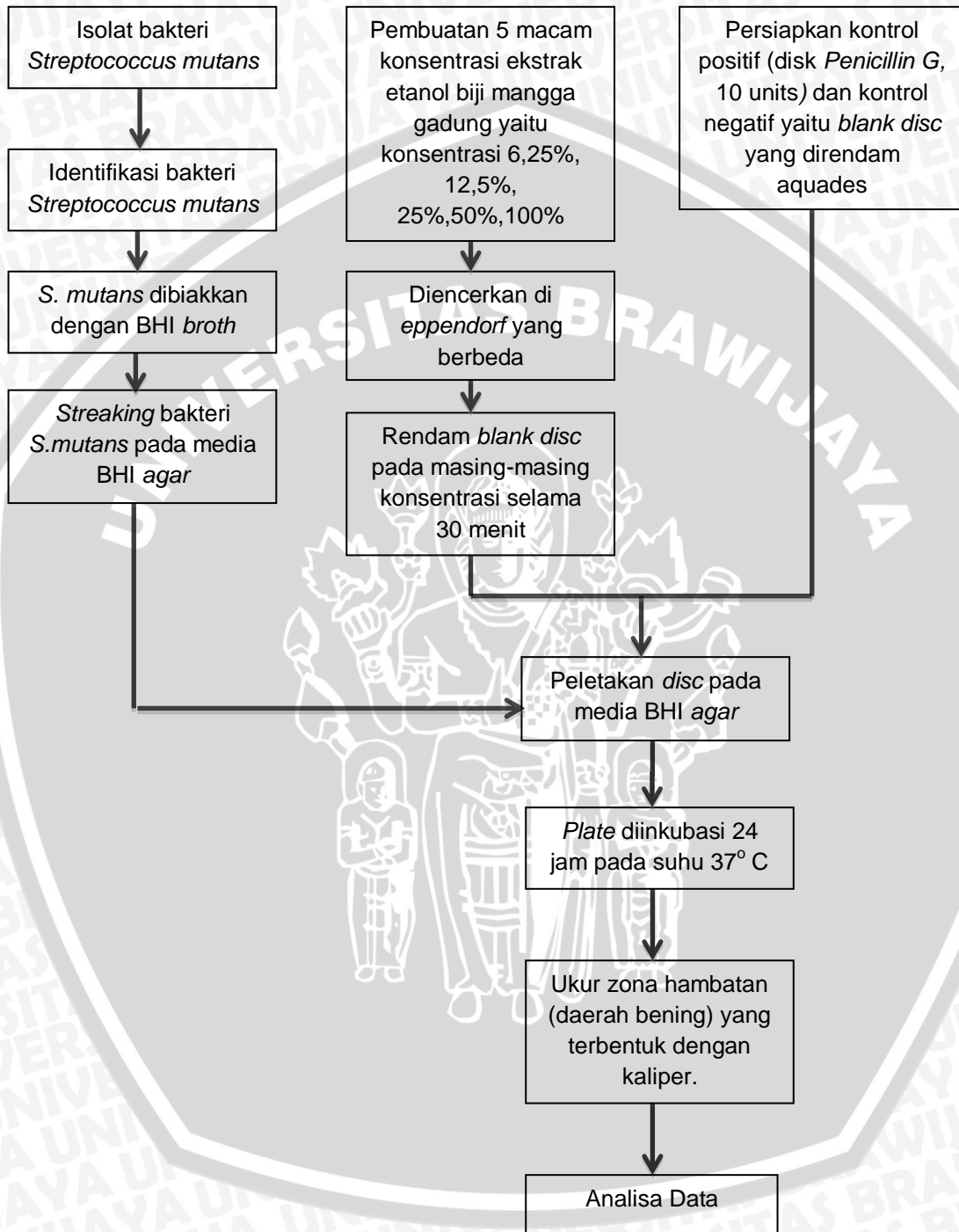
sebagai kontrol positif pada media BHI agar dengan jarak tertentu

4.7.5.4 Masukkan media BHI agar tersebut ke dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C

4.7.5.5 Setelah diinkubasi, akan nampak area di sekitar disk yang jernih/ tanpa koloni bakteri, yang disebut zona hambat

4.7.5.6 Ukur diameter zona hambat dengan menggunakan kaliper. Pengukuran tersebut dilakukan dari batas jernih terakhir yang berdekatan dengan koloni di sebelah kiri hingga batas jernih terakhir yang berdekatan dengan koloni di sebelah kanan yang diukur pada jarak daerah jernih terpanjang. Besarnya diameter zona hambat yang timbul menunjukkan daya antibakteri ekstraksi. Interpretasi daerah hambatan pertumbuhan bakteri mengacu pada standar umum obat asal tanaman yakni diameter zona hambat di sekitar disk ekstrak berukuran 12-24 mm (Hermawan, 2007).

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

Keterangan : Alur penelitian ini menunjukkan tahap-tahap yang dikerjakan dalam penelitian dengan metode agar difusi disk

#### 4.9 Analisis Data

Hasil penelitian dari 4 kali pengulangan percobaan data-data diameter zona hambat bakteri dianalisa dengan menggunakan uji statistik One Way ANOVA dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *One Way ANOVA* digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak biji buah mangga gadung terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Uji statistik ini mempunyai derajat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) apabila  $<0,05$  hipotesis diterima dan apabila  $>0,05$  hipotesis ditolak. Syarat dilakukan uji *One Way ANOVA* yaitu bila data terdistribusi normal dan homogen. Uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui apakah terdapat hubungan konsentrasi ekstrak biji buah mangga gadung terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan mengetahui seberapa besar hubungan tersebut, apakah peningkatan berbagai konsentrasi ekstrak akan mengakibatkan peningkatan zona hambat pertumbuhan bakteri, dan sebaliknya, atau tidak berhubungan.