

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan desain penelitian eksperimental laboratorik dengan metode *agar well diffusion* untuk mengetahui efek ekstrak etanol buah pinang (*Areca catechu Linn*) sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* secara *in vitro*

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang dipergunakan di dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya yang berasal dari intra oral.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak etanol buah pinang (*Areca catechu Linn*) yang terdiri dari 5 konsentrasi, yaitu konsentrasi 3.125%, 6.25%, 12.5%, 25% dan 50% yang ditentukan sebagai konsentrasi eksplorasi pada penelitian pendahuluan.

4.3.2 Variabel tergantung

Zona hambat terhadap *Streptococcus mutans*

4.3.3 Variabel terkontrol

1. sterilisasi alat dengan autoklaf

2. cara pembuatan sampel
3. cara penyimpanan (inkubasi)

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Uji bakteri dilakukan di bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Oktober 2013 sampai Desember 2013

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat

4.5.1.1 Alat untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. Gelas Objek
2. Ose
3. Pembakar spirtus

4.5.1.2 Alat untuk Tes Katalase

1. Gelas Objek
2. Pipet

4.5.1.3 Alat untuk Tes Optochin

1. Ose
2. Inkubator

4.5.1.4 Alat untuk Ekstraksi Buah Pinang

1. Blender
2. Oven
3. Timbangan analitik
4. Saringan
5. *Rotary evaporator*

6. Tabung erlenmayer

4.5.1.5 Alat untuk Uji Antibakteri Ekstrak Buah Pinang terhadap

Streptococcus mutans

1. Tabung reaksi
2. Cawan petri
3. Ose
4. Mikropipet
5. Pelubang
6. Inkubator
7. Jangka sorong

4.5.2 Bahan

4.5.2.1 Bahan untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. Isolat *Streptococcus mutans*
2. Pewarnaan gram (kristal, violet, lugol, alkohol 96%, safranin)

4.5.2.2 Bahan untuk Tes Katalase

1. Perbenihan cair
2. H₂O₂ 3%

4.5.2.3 Bahan untuk Tes Optochin

1. Chocolate Agar Plate (CAP)
2. Suspensi bakteri
3. *Optochin disk*

4.5.2.4 Bahan untuk Ekstraksi Buah Pinang

1. Buah pinang
2. Aquades steril

4.5.2.5 Bahan untuk Uji Antibakteri Ekstrak Buah Pinang terhadap *Streptococcus mutans*

1. BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*)
2. BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*)
3. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*
4. Ekstrak buah pinang
5. Aquades

4.6 Definisi Operasional

1. *Streptococcus mutans* adalah bakteri kokus gram positif fakultatif anaerob, bakteri *Streptococcus mutans* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan dibiakkan di Laboratorium Universitas Brawijaya Malang.
2. Bakteri *Streptococcus mutans* adalah bakteri yang terlihat dengan warna ungu pada pewarnaan gram, tidak menunjukkan adanya gelembung pada uji katalase dan tidak menunjukkan adanya zona hambatan di sekitar disk tes optochin
3. Ekstrak etanol buah pinang berupa buah pinang yang berwarna kuning kemerahan dan diambil secara langsung di Kota Probolinggo yang

kemudian dikeringan dan diblender sehingga didapat gerusan biji pinang kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol

4. Ekstrak maserasi adalah cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya.
5. Larutan kontrol merupakan larutan kontrol negatif yang berisi air (aquades) dan kontrol positif berupa *chlorhexidine guconate* 0,2%
6. Zona hambat *Streptococcus mutans* adalah daerah jernih pada media agar (BHIA) di sekitar lubang sumuran dengan cara pengukuran diameter daerah bening. Diameter zona hambat tersebut diukur dengan menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm
7. Inokulum adalah inokulasi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar sebelum diinkubasi

4.7 Estimasi Jumlah Pengulangan

Dalam penelitian ini, banyaknya pengulangan ditentukan dengan menggunakan rumus estimasi besar pengulangan (Rochiman, 2010) sebagai berikut :

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

Keterangan :

p = perlakuan

n = jumlah sampel

15 = nilai konstanta

Dalam penelitian ini digunakan tujuh macam perlakuan yaitu lima macam perlakuan dengan konsentrasi yang berbeda (3,125%,6,25%,12,5%, 25% dan 50%), kontrol negatif (aquades), dan kontrol positif (*chlorhexidine gluconate* 0,2%) maka :

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \approx 4$$

Jadi, untuk tujuh jenis perlakuan, diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit empat kali untuk masing-masing perlakuan.

4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari prosedur identifikasi *Streptococcus mutans* yaitu pewarnaan Gram, tes katalase dan tes optochin, pembuatan ekstrak biji pinang, pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*, uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah pinang (*Areca catechu* Linn)

4.8.1 Identifikasi Bakteri *Streptococcus mutans*

Untuk membuktikan bahwa koloni yang tumbuh adalah bakteri *Streptococcus mutans* maka dilakukan serangkaian tes antara lain, tes pewarnaan gram untuk menentukan bakteri tersebut termasuk bakteri gram positif kokus dengan hasil positif berwarna ungu, tes katalase untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Staphylococcus aureus* dengan hasil negatif tidak terdapat gelembung dan tes optochin untuk membedakan

Streptococcus mutans dengan *Streptococcus pneumonia* dengan hasil negatif dengan tidak adanya zona hambat di sekitar disk

4.8.1.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pewarnaan gram yang pertama adalah gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin. Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas objek ditambah sedikit biakkan bakteri yang diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquades pada gelas objek dan diratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api. Kemudian sediaan dituangi kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit. Setelah 1 menit sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dituangi larutan lugol, dibiarkan selama 1 menit. Sisa lugol kemudian dibuang dan dibilas dengan air. Setelah itu, sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dituangi safranin selama 30 detik, kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 1000x. hasil positif : *Streptococcus mutans* tercat ungu (gram positif).

4.8.1.2 Tes Katalase

Tes katalase dilakukan dengan menyediakan pembenihan cair bakteri *Streptococcus mutans* pada gelas obyek. Kemudian sediaan tersebut ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3%. Perhatikan ada tidaknya gelembung udara yang terjadi.

Hasil untuk *Streptococcus mutans* adalah tidak ada gelembung (tes katalase negatif)

4.8.1.3 Tes Optochin

Tes optochin dilakukan dengan meletakkan optochin disk di tengah inokulum di Chocolate Agar Plate (CAP) yang telah di streaking dengan penjepit steril. Kemudian posisi disk diatur dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan disk dalam agar. Inkubasi selama 1 malam pada suhu 37°C dalam inkubator. Setelah itu amati apakah terbentuk zona hambatan di sekeliling disk.. Hasil tes adalah negatif, tidak terbentuk zona hambat dan diidentifikasi sebagai *Streptococcus mutans*.

4.8.2 Pembuatan Suspensi Uji *Streptococcus mutans*

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan untuk perbanyak stok dengan cara:

1. Bakteri *Streptococcus mutans* diambil menggunakan ose dan ditanam pada media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*).
2. Setelah itu bakteri di inkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37 °C

4.8.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Pinang (*Areca catechu Linn*)

1. Buah pinang dipilih yang berwarna kuning kemerahan kemudian dicuci bersih, dipotong setebal 1-2 cm dan dikering anginkan dalam ruangan selama 24 jam, selanjutnya keringkan dalam oven dengan suhu 45°C selama 2x24 jam.
2. Buah pinang yang telah kering dihaluskan (diblender) untuk mendapatkan serbuk (simplisia).

3. Sebanyak 100 gram serbuk buah pinang dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer
4. Kemudian ditambahkan dengan 900 ml etanol 96%. Lalu tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu kocok perlahan-lahan. Pengocokan dilakukan setengah jam dan disimpan pada suhu kamar selama 24 jam pada temperatur kamar.
5. Setelah 24 jam, campuran disaring dengan kertas filter hingga diperoleh cairan yang bebas dari partikel kasar
6. Hasil selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak biji buah pinang dengan alat Rotary evaporator pada temperatur 65°C hingga semua pelarut terpisah dan didapatkan cairan ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%. Kemudian diuapkan pada cawan penguap dan disimpan dalam freezer
7. Konsentrasi ekstrak buah pinang yang dibuat adalah mulai dari 0% (kontrol), 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25% dan 50%

4.8.4 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Etanol Buah Pinang (*Areca catechu Linn*)

Ekstrak etanol buah pinang (*Areca catechu Linn*) yang awal ditetapkan sebagai konsentrasi 100%

Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi 50% sebanyak 1 ml

$$50\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 = 1 \times 50$$

$$V_1 = 0.5 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 0.5 \text{ ml aquades}$$

Dari ekstrak dengan konsentrasi 50% dibuat ekstrak dengan konsentrasi 25%, 12.5%, 6.25%, dan 3.125% masing-masing 1 ml

$$25\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 50 = 1 \times 25$$

$$V_1 = 0.5 \text{ ml (ekstrak 50\%)} + 0.5 \text{ ml aquades}$$

$$12.5\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 25 = 1 \times 12.5$$

$$V_1 = 0.5 \text{ ml (ekstrak 25\%)} + 0.5 \text{ ml aquades}$$

$$6.25\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 12.5 = 1 \times 6.25$$

$$V_1 = 0.5 \text{ ml (ekstrak 12.5\%)} + 0.5 \text{ ml aquades}$$

$$3.125\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 6.25 = 1 \times 3.125$$

$$V_1 = 0.5 \text{ ml (ekstrak 6,25\%)} + 0.5 \text{ ml aquades}$$

4.8.5 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Pinang (*Areca catechu* Linn)

Pengujian penghambatan pertumbuhan bakteri menggunakan metode difusi lubang :

- Bakteri *Streptococcus mutans* dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi BHIB kemudian tabung reaksi diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C
- Selanjutnya ambil 0,05 ml bakteri dari media BHIB dengan konsentrasi 10⁸ CFU/ml ditetaskan pada media BHIA dalam cawan petri lalu diratakan

dengan spreader sehingga media tersebut terdapat *Streptococcus mutans*

- c. Kemudian buatlah lubang sumuran dengan perforator yang berdiameter 6 mm sebanyak 7 buah pada tempat yang telah ditentukan pada masing-masing plate BHIA
- d. Masukkan ekstrak etanol buah pinang 3.125%, 6.25%, 12.5%, 25% dan 50% dan aquades sebagai kontrol negatif serta *chlorhexidine gluconate* 0,2% sebagai kontrol positif ke dalam masing-masing lubang dengan dipipet sebanyak 40 µl
- e. Setelah itu media tersebut diinkubasi selama 24 – 48 jam pada suhu 37°C
- f. Pengamatan dilakukan dengan melihat zona hambat/zona bening disekeliling lubang sumuran tersebut yang menunjukkan daerah hambatan pertumbuhan bakteri.
- g. Zona bening yang terbentuk diukur dari batas terluar zona bening. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan jangka sorong 0,05 mm

4.9 Alur Penelitian

4.9.1 Pengenceran Ekstrak Etanol Buah Pinang

Tabung 1→Ekstrak biji buah pinang 50%→0.5 ml ekstrak buah pinang 100% + 0.5 ml aquades

Tabung 2→Ekstrak biji buah pinang 25%→0.5 ml ekstrak buah pinang 50% + 0.5 ml aquades

Tabung 3→Ekstrak biji buah pinang 12.5%→0,5 ml ekstrak buah pinang 25% + 0,5 ml aquades

Tabung 4→Ekstrak biji buah pinang 6.25%→ 0,5 ml ekstrak buah pinang 12.5% + 0,5 ml aquades

Tabung 5→Ekstrak biji buah pinang 3.125%→0,5 ml ekstrak buah pinang 6.25% + 0,5 ml aquades

Tabung 6→Ekstrak biji buah pinang 0%→ 0 ml ekstrak buah pinang+ 1 ml *chlorhexidine gluconate* 0.2% (kontrol positif)

Tabung 7→Ekstrak biji buah pinang 0%→0 ml ekstrak buah pinang + 1 ml aquades (kontrol negatif)

4.9.2 Persiapan Bakteri

Streptococcus mutans dengan inokulum 10^8 CFU/ml

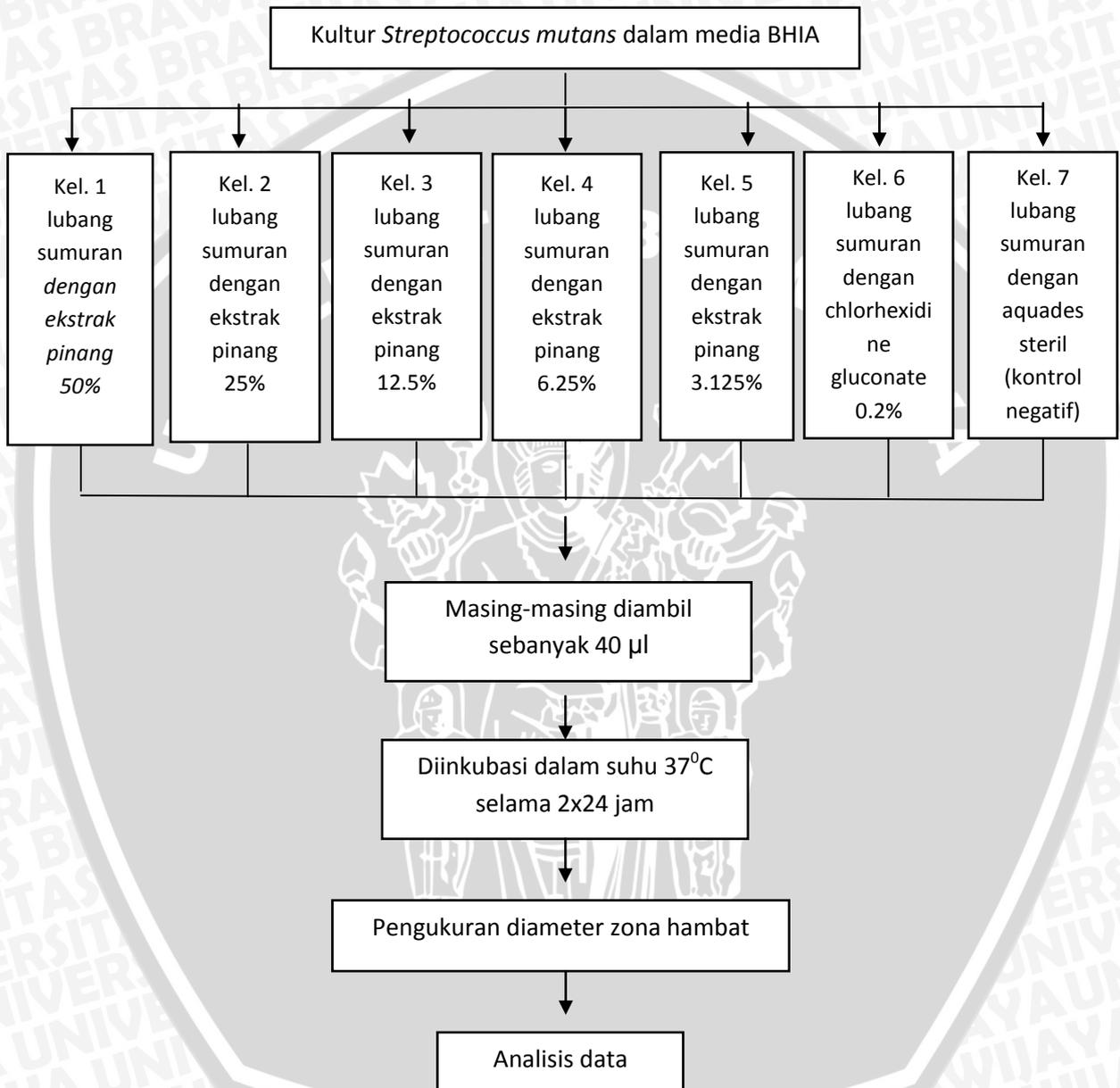
Media BHIB

Inkubasi 24 jam 37°C

Diteteskan dalam media agar BHIA

Diratakan dengan spreader (metode sebar)

4.9.3 Penanaman Sampel dan Pengukuran Zona Hambat



4.10 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian menggunakan tes Kolmogorov Smirnov. Apabila data terdistribusi normal,

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 biji pinang terhadap zona hambat *Streptococcus mutans*. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak etano buah pinang (*Areca catechu Linn*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 16.0.

