

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan rancang bangun penelitian *true experimental post control design only* secara *in vitro* untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* melalui pembentukan plak.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Anatomi-Mikro FK UB, dan Polinema, selama kurang lebih 2,5 bulan.

4.3 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang dimiliki salah satu mahasiswa Pendidikan Dokter Gigi Universitas Brawijaya dan dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang.

Tabel 2. Pembagian Kelompok Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Negatif	Pemberian <i>S.mutans</i> tanpa susu dan tanpa ekstrak daun kersen
Kontrol Positif	Pemberian susu dan diinkubasi dengan <i>S.mutans</i>
Kelompok A	Pemberian <i>S.mutans</i> +ekstrak daun kersen 0,625 ml
Kelompok B	Pemberian <i>S.mutans</i> +ekstrak daun kersen 1,250 ml
Kelompok C	Pemberian <i>S.mutans</i> +ekstrak daun kersen 1,875 ml

4.4 Estimasi Jumlah Pengulangan

Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Lukito adalah sebagai berikut (Lukito, 1998) :

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

Keterangan:

$$5(n-1) \geq 16$$

p = jumlah perlakuan n = jumlah pengulangan

$$5n - 5 \geq 16$$

$$5n \geq 21 \rightarrow n \geq 4,2$$

Dibulatkan ke atas menjadi 5 kali pengulangan.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel Bebas : Ekstrak daun kersen 0,625 ml, 1,25 ml, dan 1,875 ml (Zakaria *et al*, 2009).

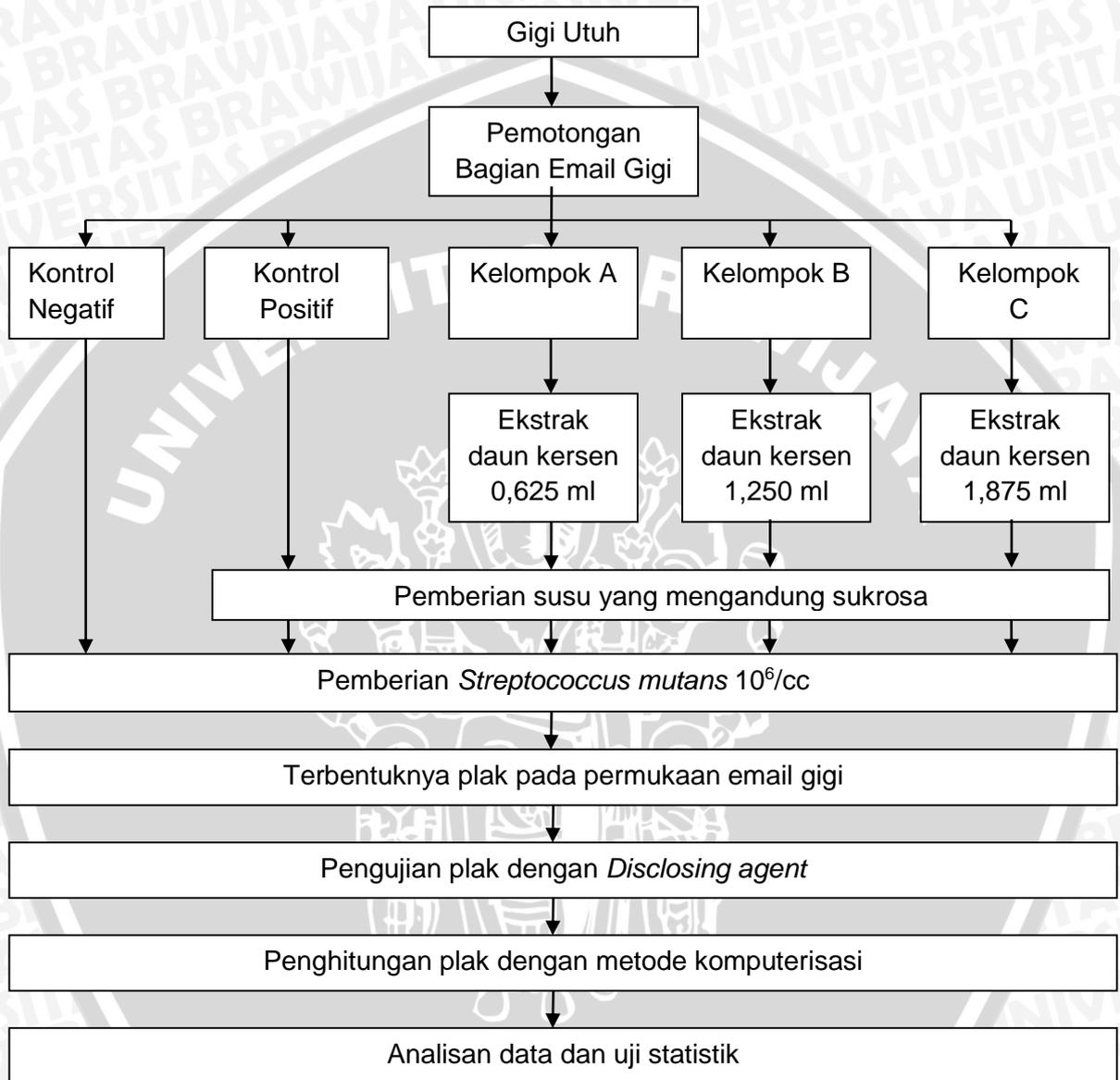
Variabel Terikat : Rasio antara luas plak (area berwarna) dibanding luas permukaan email gigi (Silva *et al*, 2006).

4.6 Definisi Operasional

- 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 pada tes optochin.
- Adhesi bakteri adalah perlekatan bakteri pada email gigi, dilihat dengan ada tidaknya plak.
- *Disclosing agent* adalah bahan yang digunakan sebagai pendeteksi plak pada email gigi.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Alur Kerja Penelitian dan Alat dan Bahan yang Digunakan



Gambar 3. Alur Penelitian

4.7.2 Penyediaan Daun Kersen

Bahan yang digunakan adalah daun kersen yang diperoleh dari daerah Singosari, Malang. Pemilihannya didasarkan pada daun yang masih hijau, segar, dan tidak terserang hama.

4.7.3 Penyediaan Spesimen Gigi

Spesimen gigi Insisivus rahang atas diperoleh dari praktek dokter gigi swasta di wilayah Malang, dengan kondisi anatomi gigi yang masih bagus.

4.7.4 Pembuatan Potongan Email Gigi

Melakukan pemotongan gigi utuh untuk mendapatkan ukuran email gigi yang sama pada semua perlakuan. Jaringan email gigi dimasukkan pada blok parafin hasil embedding pada penjepit (*block holder*) mikrotom. Jaringan diatur sejajar dengan mata pisau mikrotom.

4.7.5 Pengembangbiakan *Streptococcus mutans*

Persiapan Suspensi Uji *Streptococcus mutans* sebagai berikut :

- Dipersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* dari media BHI yang telah diuji konfirmasi.
- Diambil 5 koloni ($d \geq 1\text{mm}$) 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).

4.7.6 Identifikasi Bakteri *Streptococcus mutans*

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*.

Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

- 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 biakan 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.
- Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi safranin selama ½ menit. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
- Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 400x.
- Hasil positif : *Streptococcus mutans* tercatat ungu (Gram positif).

Tes Katalase

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



Tes Optochin

- Membagi *Chocolate Agar Plate* menjadi empat kuadran
- Melakukan *streaking* 1 atau 1½ kuadran pada *CAP*
- Meletakkan optochin disk 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 1 malam pada suhu 37°C dalam inkubator
- 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*.

4.7.7 Pembuatan Ekstrak Daun Kersen

Ekstrak ini dilakukan di Polinema. Dilakukan dengan cara: ditimbang *Muntingia calabura* sebanyak 1 kg, kemudian dimasukkan ke dalam maserator berpengaduk elektrik. Lima liter metanol 95% ditambahkan sebagai pelarut. Maserasi dilakukan dengan pengadukan sebanyak 12 kali selama 15 menit dengan tenggang waktu 5 menit antar pengadukan, dilanjutkan dengan perendaman selama 120 jam, selanjutnya dilakukan penyaringan dengan corong dan kertas saring untuk memisahkan filtrat dari ampas ke dalam labu *Erlenmeyer* sehingga diperoleh filtrat $\pm 2,5$ liter. Filtrat diuapkan di atas cawan porselin sehingga kandungan etanolnya menguap dan diperoleh ekstrak yang konsistensinya kental (± 100 g). Ekstrak kental tersebut kemudian dituang ke dalam labu *Erlenmeyer* dan ditambahkan 500 ml larutan toluena, lalu diaduk sehingga semua ekstrak larut. Larutan air : metanol = 2 : 1 (v/v) sebanyak 1,5 liter ditambahkan ke labu *Erlenmeyer* yang berisi larutan ekstrak dalam toluena,

kemudian diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, larutan dipindahkan ke dalam corong pemisah dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Melalui corong pemisah, larutan bagian bawah ($\pm 1,5$ liter) dipisahkan dan diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kental yang merupakan fraksi flavonoid polar (± 17 g) (Sabir, 2005).

50 gram daun kersen kering dilarutkan dalam metanol dengan metode maserasi dapat menghasilkan 10 ml ekstrak polifenol kersen. Penelitian ini membagi perlakuan menjadi lima kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok dosis 0,625 ml, kelompok 1,25 ml, dan kelompok 1,875 ml. Dosis tersebut diperoleh dari:

- a. 625 mg ekstrak daun kersen murni diencerkan dengan 100 ml air, sehingga menghasilkan dosis 0,625 ml.
- b. 1.250 mg ekstrak daun kersen murni diencerkan dengan 100 ml air, sehingga menghasilkan dosis 1,25 ml.
- c. 1.8750 mg ekstrak daun kersen murni diencerkan dengan 100 ml air, sehingga menghasilkan dosis 1,875 ml.

4.7.8 Pengaplikasian Ekstrak Daun *Muntingia calabura* pada Email Gigi

Alat yang digunakan adalah spuete 5 cc. Sedangkan bahan yang digunakan adalah ekstrak dari daun kersen. Setelah didapatkan ekstrak dari daun kersen, dilakukan pengaplikasiannya dengan cara merendam seluruh permukaan email gigi dengan ekstrak tersebut. Perlakuan kelompok A, B, dan C diberi ekstrak daun kersen masing-masing sebanyak 3 tetes. Perlakuan kelompok A, B, dan C menggunakan konsentrasi ekstrak daun kersen sebesar 0,625 ml, 1,25 ml, dan 1,875 ml (Irmgard, 2007). Untuk perlakuan kontrol positif hanya diberi susu saja

tanpa ekstrak daun kersen. Sedangkan untuk kontrol negatif diberi *S.mutans* tanpa ekstrak daun kersen dan susu.

4.7.9 Pemberian Substrat Berupa Susu (sukrosa) pada Email Gigi

Alat yang digunakan adalah spuit 5cc untuk meneteskan susu di permukaan email gigi. Sedangkan bahan yang digunakan adalah susu yang mengandung sukrosa. Setelah email gigi dilapisi dengan ekstrak daun kersen, kemudian dikeringkan. Setelah itu diberikan susu yang mengandung sukrosa sebagai substrat dari *Streptococcus mutans* pada seluruh permukaan email dengan cara diteteskan.

4.7.10 Inkubasi Email Gigi dengan *Streptococcus mutans*

Alat yang digunakan adalah Inkubator anaerob, *deppen glass*, dan aluminium foil sebagai penutup setiap *deppen glass*. Email gigi yang telah diberi susu tersebut diinkubasi bersama bakteri *Streptococcus mutans* 10^8 /cc ke dalam inkubator selama 2x24 jam pada kondisi anaerob.

4.7.11 Pewarnaan *Disclosing Agent* dan Pengamatan Plak pada Email Gigi

Alat yang digunakan adalah pinset, disk, dan *deppen glass*. Bahan yang digunakan adalah *disclosing agent*, NaCl, dan aquades. Selanjutnya adalah pemberian NaCl untuk menghilangkan bakteri yang tidak mengalami adhesi. Lalu diaplikasikan *disclosing agent* untuk mendeteksi plak pada permukaan email gigi tersebut. Mencuci permukaan email gigi tersebut dengan aquades. Bagian yang terdapat plak akan menjadi area berwarna, sedangkan bagian yang tidak terdapat plak tidak terdapat area berwarna.

4.8 Pengambilan Data

Pengambilan data berdasarkan metode komputerisasi dengan menghitung rasio antara luas plak (area berwarna) dibanding luas permukaan email gigi (Silva

et al, 2006). Dengan cara semua spesimen enamel gigi difoto menggunakan kamera digital secara bersamaan dengan pencahayaan lampu yang sama. Selanjutnya dilakukan pengukuran menggunakan software *Adobe Photoshop CS6* di komputer dengan cara menyeleksi area yang berwarna magenta pada masing-masing gigi secara otomatis dengan fitur *select color range* yang terdapat pada *software*. Kemudian area yang sudah terseleksi dapat diukur luasnya dengan fitur *histogram* maka akan didapatkan luas area dalam satuan *pixel*. Tahap selanjutnya yaitu menyeleksi permukaan enamel pada masing-masing gigi menggunakan fitur *polygonal lasso tool*. Kemudian diukur luasnya dengan fitur *histogram* maka akan didapatkan luas permukaan enamel gigi dalam satuan *pixel*. Setelah didapatkan data numerik, selanjutnya dilakukan pengukuran rasio. Hasil akhir dari invensi ini adalah rasio antara luas permukaan plak yang menempel dibanding dengan luas permukaan enamel gigi.

4.9 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi normalitas dan homogenitas varian menggunakan *Shapiro-Wilk* dan *Levene homogeneity test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, 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 metanol daun kersen terhadap pembentukan plak yang dihasilkan bakteri *Streptococcus mutans*. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak metanol daun kersen terhadap pembentukan plak oleh bakteri *Streptococcus mutans*.