

## BAB 4

## METODOLOGI PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Desain penelitian ini adalah *True Experimental Design* yaitu *Posttest Control Group Design*. Dalam penelitian ini peneliti ingin mengetahui perbedaan absorbansi saliva buatan dan pH saliva buatan (yang ditambahkan *Porphyromonas gingivalis* dalam media *BHI-Broth* yang diperkaya hemin, vitamin K, ekstrak yeast) lalu ditambahkan ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 15%, 30%, 45% secara *in vitro*.

## 4.2 Sampel Penelitian

## 4.2.1 Sampel Penelitian

Sampel dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu:

- a. Kelompok A : Kelompok kontrol (Saliva buatan ditambahkan dengan *Porphyromonas gingivalis* dalam media *BHI-Broth* yang diperkaya hemin, vitamin K, dan ekstrak yeast)
- b. Kelompok B : Perlakuan 1 (Saliva buatan ditambahkan dengan *Porphyromonas gingivalis* dalam media *BHI-Broth* yang diperkaya hemin, vitamin K, ekstrak yeast dan diberi ekstrak etanol daun teh hijau konsentrasi 15%)
- c. Kelompok C : Perlakuan 2 (Saliva buatan ditambahkan dengan *Porphyromonas gingivalis* dalam media *BHI-Broth* yang diperkaya hemin,

vitamin K, ekstrak yeast, dan diberi ekstrak etanol daun teh hijau konsentrasi 30%)

- d. Kelompok D : Perlakuan 3 (Saliva buatan ditambahkan dengan *Porphyromonas gingivalis* dalam media *BHI-Broth* yang diperkaya hemin, vitamin K, ekstrak yeast dan diberi ekstrak etanol daun teh hijau konsentrasi 45%)

#### 4.2.2 Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah kelompok sampel pada penelitian ini adalah 4 kelompok. Banyaknya pengulangan dapat ditentukan dengan menggunakan rumus Federer (1977) berikut:

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

$$3(n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 5$$

$$n \geq 6$$

keterangan :

n = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

Sesuai perhitungan tersebut, banyaknya pengulangan pada penelitian ini sebanyak 6 kali.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini terdapat dua variabel yaitu:

- Variabel bebas : konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang diberikan yaitu 15%, 30% dan 45%.

- Variabel terikat : pH dan absorbansi saliva buatan pada masing-masing kelompok perlakuan.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang pada bulan Oktober-November 2015.

#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.5.1 Bahan Penelitian

1. Daun teh hijau kering
2. Etanol 96%
3. Aquades steril
4. Saliva buatan
5. Hemin
6. Vitamin K
7. Ekstrak yeast
8. Isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis*
9. Kertas saring
10. Kapas
11. *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B)

##### 4.5.2 Alat Penelitian

1. pH meter
2. Tabung reaksi steril
3. Tabung valcon steril

4. Mikropipet
5. Pulltip steril
6. Bunsen
7. Timbangan
8. *Anaerobic jar*
9. Autoklaf
10. Ose
11. *Rotary Evaporator*
12. Rak tabung reaksi
13. Spidol marker
14. Spektrofotometer
15. Vibrator

#### 4.6 Definisi Operasional

a. Daun teh hijau (*Camellia sinensis*)

Daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun teh hijau yang telah dikeringkan dan dikemas oleh pabrik.

b. Ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*)

Ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah konsentrasi 15%, 30%, 45%.

c. Saliva buatan

Saliva buatan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan saliva buatan sesuai formula *McDougall* dengan pH 7.

d. *Porphyromonas gingivalis*

Bakteri *Porphyromonas gingivalis* adalah bakteri berbentuk batang pendek (*coccobacilli*), dengan pewarnaan Gram terlihat warna merah. Sediaan bakteri *Porphyromonas gingivalis* didapatkan dari Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Yogyakarta dan telah diidentifikasi.

- e. *BHI-broth* yang diperkaya Hemin, vitamin K dan ekstrak yeast Hemin, vitamin K, dan ekstrak yeast terbukti dapat menstimulasi pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis*. Hemin sebagai pemberi warna hitam pada bakteri merupakan sumber zat besi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* (Xie H *et.al.*, 2012). Vitamin K dikenal dapat menstimulasi pertumbuhan dari periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* (Hojo *et al.*, 2007). Ekstrak yeast yang merupakan ragi terhidrolisasi yang kompleks dan banyak digunakan, kaya akan nitrogen, karbon, sulfur, sedikit nutrisi, vitamin dan senyawa lain yang penting untuk pertumbuhan sehingga digunakan sebagai media untuk memperbanyak mikroorganisme. Sedangkan *BHI-Broth* merupakan media berupa zat cair yang digunakan untuk memperbanyak bakteri (Retno, 2012).
- f. Absorbansi  
Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer dari saliva buatan bertujuan mengetahui hambatan pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis*.

## 4.7 Metode Pengumpulan Data

### 4.7.1 Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan merupakan data primer dan data sekunder. Yang termasuk data primer dari penelitian ini adalah pH ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan berbagai konsentrasi, pH saliva buatan yang ditambahkan *Porphyromonas gingivalis* dalam media *BHI-Broth* sebagai kelompok kontrol dan perlakuan berupa penambahan ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 25%, 50%, 100%, dan absorbansi saliva buatan. Yang termasuk data sekunder dari penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*).

### 4.7.2 Teknik Pengumpulan Data

Untuk data primer, pengumpulan dilakukan dengan cara:

- Data pH saliva buatan dilakukan dengan cara menggunakan pH meter
- Data nilai absorbansi saliva buatan menggunakan spektrofotometer.

Untuk data sekunder, pengumpulan dilakukan dengan cara:

- Data konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) didapatkan dari literatur.

### 4.7.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini terdiri dari pembuatan ekstrak etanol daun teh hijau, pembuatan saliva buatan, pembuatan suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis* dalam media *BHI-Broth* (yang diperkaya hemin, vitamin K, dan ekstrak yeast), uji viabilitas *Porphyromonas gingivalis* pada saliva buatan, dan uji

pengaruh konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau terhadap *Porphyromonas gingivalis* yang dibiakkan pada saliva buatan.

#### 4.7.3.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau

Teh hijau yang digunakan adalah teh hijau kering dalam kemasan dan dibuat serbuk menggunakan blender sehingga menjadi bubuk yang halus dengan partikel yang besarnya homogen, kemudian dimaserasi dengan perbandingan 300 gr daun direndam dalam 3000 ml etanol 96% selama 2 hari dan dilakukan pengadukan tiap harinya. Setelah itu ekstrak yang cair tersebut dipisahkan dengan *vacuum rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kental (konsentrasi 100%).

Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau didapatkan dengan metode pengenceran serial, yaitu:

- a. 15% = 0,15 ml sediaan 100% + 0,85 ml aquades.
- b. 30% = 0,3 ml sediaan 100% + 0,7 ml aquades.
- c. 45% = 0,45 ml sediaan 100% + 0,55 ml aquades (Retno, 2012).

#### 4.7.3.2 Pembuatan Saliva Buatan

Larutan saliva buatan (*buffer*) *McDougall* dengan komposisi campuran 58,80 g  $\text{NaHCO}_3$ ; 48 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 3,42 g KCl; 2,82 g NaCl; 0,72 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,24 g  $\text{CaCl}_2$  dalam 6 liter aquades dengan pH 7 (Islami, 2014).

#### 4.7.3.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

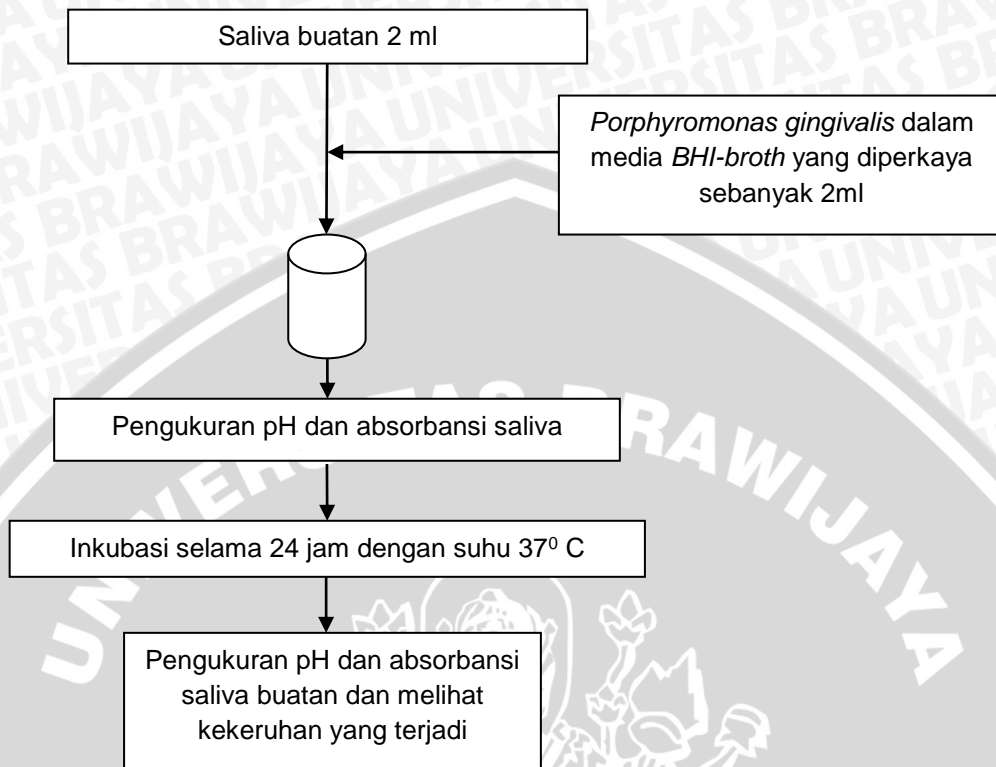
Sebanyak 2 ml larutan BHI-B yang diperkaya dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ose *Porphyromonas gingivalis* kemudian

dilewatkan di atas lampu spiritus yang menyala kemudian ditutup dan dihomogenkan di atas *sentrifuge*. Tabung reaksi tersebut dimasukkan ke dalam desikator kemudian diinkubasi dalam *anaerobic jar* selama 24 jam dengan suhu 37°C. Pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* ditandai dengan adanya kekeruhan pada media. Setelah itu dilakukan pengenceran dengan menambah aquadest steril, dihomogenkan di atas *sentrifuge* dan diukur absorbansinya dengan standar *Mc Farland* no. 0,5 (panjang gelombang 560 nm) menggunakan *spektrofotometer* (Retno, 2012).

#### 4.7.3.4 Uji Viabilitas *Porphyromonas gingivalis* pada Saliva Buatan

Viabilitas bakteri sering disamakan dengan kemampuan untuk membentuk koloni pada media pertumbuhan baik yang berupa medium padat atau larutan. Pada penelitian yang telah dilakukan Dian Retno tahun 2012, hemin, vitamin K, dan ekstrak yeast terbukti dapat menstimulasi pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* dalam media *BHI-A* dan *BHI-B*. Oleh karena itu, uji viabilitas dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* yang dibiakkan pada saliva buatan dalam media *BHI-Broth* yang diperkaya hemin, vitamin K, dan ekstrak yeast. Adanya pertumbuhan bakteri dalam media saliva buatan ditunjukkan dari kekeruhan yang terjadi.





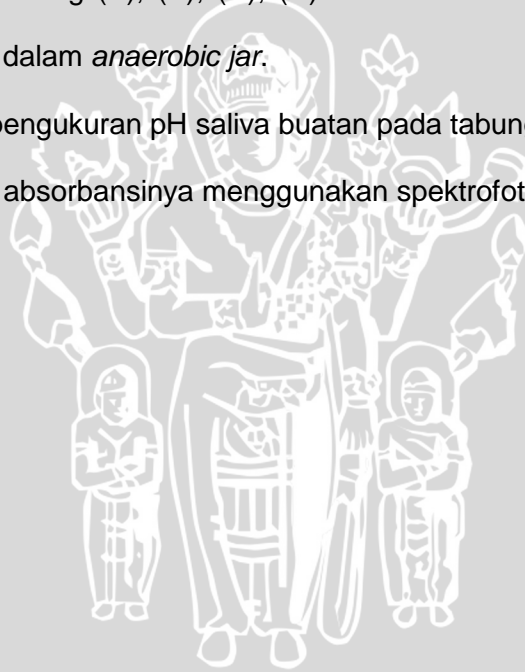
Gambar 4.1 Uji Viabilitas Bakteri

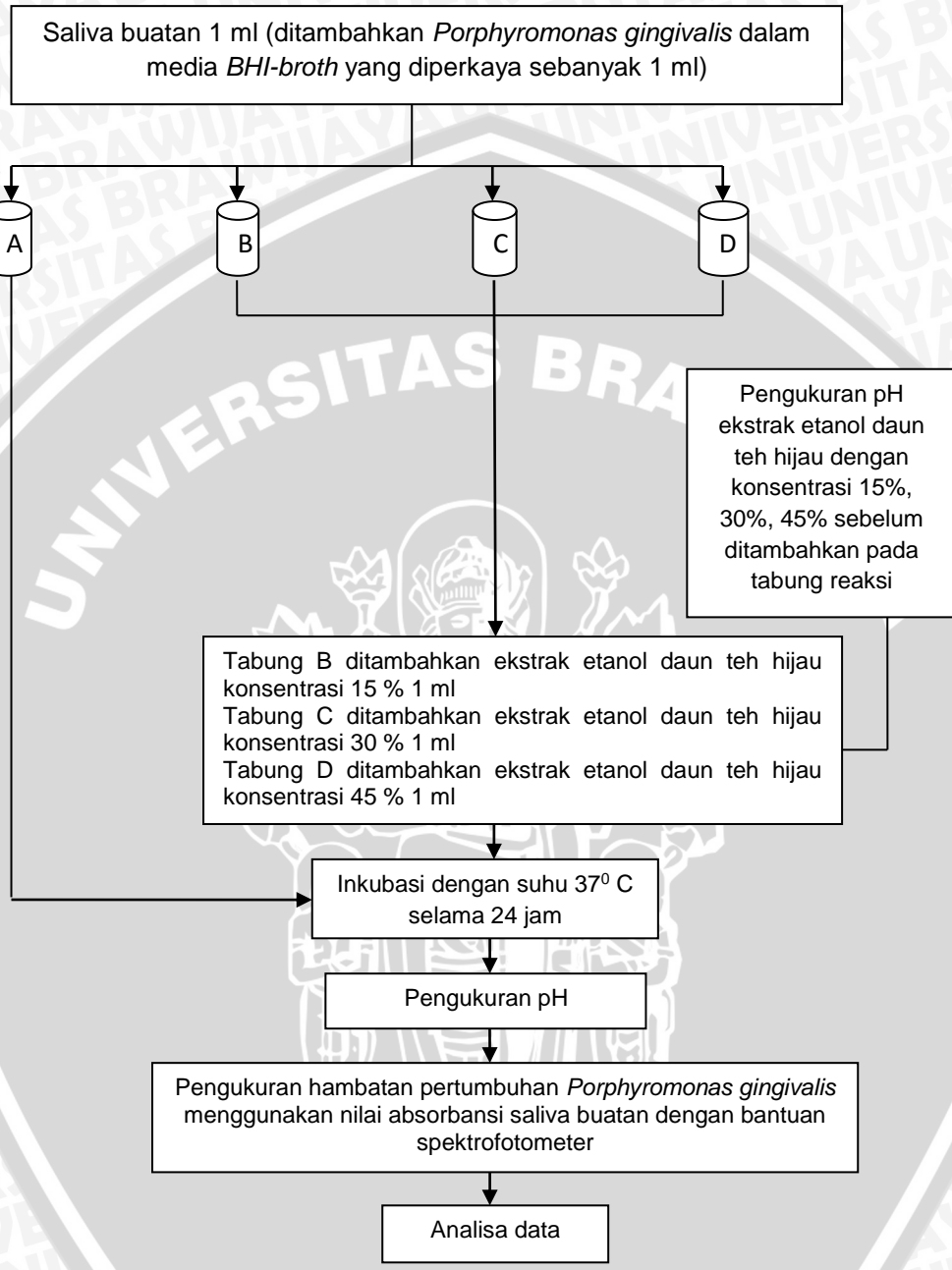
#### 4.7.3.5 Uji Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau terhadap *Porphyromonas gingivalis* yang Dibiakkan pada Saliva Buatan

Rangkaian uji pengaruh konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau terhadap *Porphyromonas gingivalis* yang dibiakkan ada saliva buatan adalah sebagai berikut:

1. Disediakan 4 tabung valcon steril, kemudian pada masing-masing tabung dimasukkan 1 ml saliva buatan.
2. Ditambahkan suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis* dalam media *BHI-broth* yang diperkaya hemin, vitamin K, dan ekstrak yeast pada semua tabung reaksi (A, B, C, dan D).

3. Hitung nilai pH masing-masing ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 15%, 30% dan 45%.
4. Pada tabung perlakuan 1 (B) ditambahkan ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 15% sebanyak 1 ml.
5. Pada tabung perlakuan 2 (C) ditambahkan ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 30% sebanyak 1 ml.
6. Pada tabung perlakuan 3 (D) ditambahkan ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 45% sebanyak 1 ml.
7. Kemudian tabung (A), (B), (C), (D) diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37° C dalam *anaerobic jar*.
8. Dilakukan pengukuran pH saliva buatan pada tabung (A), (B), (C), (D).
9. Diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer.





Gambar 4.2 Alur Penelitian

#### 4.8 Analisa Data

Pengolahan data dilakukan dengan bantuan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) 15.0 for Windows. Data hasil penelitian dilakukan uji distribusi normalitas *Kolmogorov Smirnov* dan uji homogenitas *Levene*. Apabila hasil uji menunjukkan data normal dan homogen ( $p > 0,05$ ) maka dilakukan analisis uji statistik *one way ANOVA*, Korelasi Regresi dan *Post Hoc*.

Hipotesa Statistik:

$H_0$ : tidak ada perbedaan nilai absorbansi dan pH saliva buatan yang telah ditambahkan *Porphyromonas gingivalis* dan ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) antara konsentrasi 15%, 30%, 45% secara *in vitro*.

$H_1$ : ada perbedaan nilai absorbansi dan pH saliva buatan yang telah ditambahkan *Porphyromonas gingivalis* dan ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) antara konsentrasi 15%, 30%, 45% secara *in vitro*.

Apabila  $p \text{ value} \geq \alpha = 0,05$  maka  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak, apabila  $p \text{ value} < \alpha = 0,05$  maka  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima.