

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan untuk penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik *in vitro* untuk mengetahui zona hambat berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* Less) terhadap kolonisasi bakteri *Streptococcus mutans* dengan menggunakan metode difusi sumuran untuk mendapatkan zona hambat.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan di lakukan pada bulan oktober sampai desember 2014, dan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3 Bahan yang Diuji dan Sampel Penelitian

Bahan yang diuji dalam penelitian ini adalah daun beluntas yang diperoleh dari Materia Medika kota Batu, kemudian dibuat ekstrak etanol 96% daun beluntas dengan perbandingan antara daun beluntas dengan etanol 96% yaitu 1 : 9. Jadi bila ada 100 gram bubuk kering daum beluntas maka etanol yang dipakai adalah 900 gram.

Bakteri *Streptococcus mutans* diperoleh dari stok Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan kepadatan 10^8 CFU/ml per

tube. Jumlah pengulangan dapat diketahui dengan menggunakan rumus Loekito

(1998) sebagai berikut:

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

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n = 4$$

Keterangan:

n = Jumlah pengulangan (4 kali pengulangan).

p = Jumlah perlakuan.

Jadi pada penelitian ini, setiap perlakuan dilakukan empat kali pengulangan.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun beluntas dengan konsentrasi 7%, 8%, 9%, 10%, dan 11% Konsentrasi tersebut didapatkan dari penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang di observasi dengan melihat adanya zona hambat yang diukur menggunakan jangka sorong pada media agar BHI (*brain Heart Infusion*).

4.5 Definisi Operasional

1. *Streptococcus mutans* adalah bakteri gram positif anaerob yang diperoleh dari biakan yang dimiliki oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dan dibiakkan oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Standar kepadatan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 10^8 bakteri/ml.

Bakteri *Streptococcus mutans* adalah bakteri dengan bentukan bulat berwarna kuning yang tumbuh pada media tanam, terlihat warna ungu pada perwarnaan gram, tidak menunjukkan gelembung pada uji katalase, hasil *streaking* pada *Blood Agar Plate* berwarna hijau dan tidak menunjukkan adanya zona hambatan disekitar disk pada tes optochin.

2. Daun Beluntas (*Pluchea Indica Less*) merupakan ekstrak dari daun beluntas (*Pluchea Indica Less*) yang berukuran $\pm 3 - 6$ cm, diperoleh dan diidentifikasi Materia Medika. Daun beluntas diekstrak menggunakan metode *Maserasi* dengan pelarut etanol 96%.

3. Ekstrak daun beluntas adalah daun beluntas yang diekstrak dengan pelarut etanol 96% dan menggunakan metode ekstraksi maserasi.
4. Larutan kontrol merupakan larutan kontrol negatif yang berisi air (aquadest).

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Pembuatan ekstrak daun beluntas

4.6.1.1 Bahan Pembuatan Ekstraksi dan Evaporasi Daun Beluntas

- Serbuk daun beluntas sebanyak 100 gram
- Etanol 96% sebagai pelarut ekstrak
- Aquadest

4.6.1.2 Alat Pembuatan Ekstraksi dan Evaporasi Daun Beluntas

- Blender untuk menghaluskan
- Oven
- Timbangan
- Gelas Erlenmeyer
- Corong gelas
- Kertas saring
- Evaporator
- Labu evaporator dan labu penampung etanol
- Pendingin spiral (*rotary evaporator*)
- Selang *waterpump*
- Waterpump

- *Waterbath*
- Botol hasil ekstrak

4.6.2 Identifikasi Bakteri

4.6.2.1 Pewarnaan Gram

4.6.2.1.1 Bahan Pewarnaan Gram

- Isolat *Streptococcus mutans*
- Pewarna gram (kristal violet, logol, etanol 96%, Safranin)
- Minyak emersi

4.6.2.1.2 Alat Pewarnaan Gram

- Ose lurus, ose lengkung
- Kertas penghisap
- Mikroskop perbesaran obyektif 100x
- Tabung reaksi
- Api spiritus
- Gelas obyek

4.6.2.2 Tes Katalase

4.6.2.2.1 Bahan Tes Katalase

- H₂O₂ 3%
- Perbenihan cair

4.6.2.2.2 Alat Tes Katalase



- pipet
- *Object glass*

4.6.2.3 Tes Hemolisis dan Optochin

4.6.2.3.1 Bahan Tes Hemolisis dan Optochin

- *Chocolate Agar Plate*
- Suspensi bakteri
- *Blood Agar Plate*
- *Optochin Disk*

4.6.2.3.2 Alat Tes Hemolisis dan Optochin

- Ose
- Inkubator

4.6.3 Uji Aktivitas Antimikroba

4.6.3.1 Bahan Uji Aktivitas Antimikroba

- Hasil ekstraksi daun beluntas
- *Brain Heart Infusion* (BHI) broth
- BHI Agar
- Isolat bakteri *Streptococcus mutans*
- Larutan standar *Mc Farland*

4.6.3.2 Alat Tes Uji Aktivitas Antimikroba

- Tabung steril

- Mikropipet
- Ose lengkung
- Inkubator
- Lampu spiritus
- Label
- Vortex

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Sediaan Ekstrak

4.7.1.1 Proses Pengeringan

1. Daun beluntas dicuci dengan air bersih.
2. Daun beluntas yang telah dicuci dipotong kecil-kecil kemudian dioven dengan suhu 70°C.

4.7.1.2 Proses Ekstraksi

1. Daun beluntas yang sudah dikeringkan dihaluskan dengan blender sampai halus hingga menjadi serbuk kemudian ditimbang sebanyak 100 gram (sampel kering).
2. Serbuk daun beluntas dimasukkan kedalam tabung erlenmeyer.
3. Kemudian ditambahkan 900 ml etanol 96%.
4. Tabung erlenmeyer ditutup rapat-rapat dan kocok dengan perlahan. Dilakukan 1 - 2 kali dalam sehari.
5. Tabung erlenmeyer disimpan pada suhu kamar selama 24 jam.

6. Setelah 24 jam, campuran disaring dengan kertas filter hingga diperoleh cairan berwarna yang bebas dari partikel kasar.
7. Diperoleh larutan ekstrak daun beluntas dengan konsentrasi 100%.

4.7.1.3 Proses Evaporasi

1. Hasil selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol 96% dengan ekstrak daun beluntas menggunakan alat *rotavapor*.
2. *Evaporator* dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung pada kemiringan 30⁰-40⁰ terhadap meja percobaan.
3. Hasil rendaman etanol 96% dipindahkan ke labu pemindah ekstraksi.
4. Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah *evaporator*, pendingin spiral dihubungkan pada bagian atas *evaporator*, lalu penampung etanol 96% dihubungkan pada bagian atas *evaporator*, pendingin spiral dihubungkan dengan *waterpump* dengan selang plastik.
5. *Waterpump* ditempatkan dalam bak yang berisi *aquadest*, *waterpump* dihubungkan dengan sumber listrik sehingga *aquadest* akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan merata).
6. Satu set alat evaporasi diletakkan sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam *aquadest* pada *waterbath*.
7. Vakum dari *waterbath* dihubungkan dengan sumber listrik dan suhu pada *waterbath* diatur sesuai dengan titik didih etanol 96%.
8. Sirkulasi dibiarkan berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama \pm 2-3 jam.

9. Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 50°C-60°C selama 5 jam.
10. Untuk melarutkan ekstrak tersebut, tambahkan *aquadest* dan aseton \pm 1% atau sampai ekstrak dapat tercampur merata. Hasil ekstrak dimasukkan dalam botol dan disimpan di freezer.

4.7.2 Identifikasi Bakteri

Untuk mengidentifikasi *Streptococcus mutans* dilakukan sejumlah tes yang terdiri atas pewarnaan gram, tes katalase, tes hemolisis dan optochin. Pewarnaan gram bertujuan untuk membedakan bakteri gram positif dan negatif. Tes katalase berfungsi membedakan genus *Streptococcus* dari *Staphylococcus*. Hasil tes katalase *Streptococcus mutans* akan menunjukkan hasil negatif (Bailey and Scott, 2002). Tes hemolisis bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri dapat menghemolisa sel darah merah, sehingga dapat membedakan α -hemolytic, β -hemolytic, dan γ -hemolytic. Tes optochin bertujuan untuk membedakan *Streptococcus pneumoniae* dengan *Streptococcus viridans*.

4.7.2.1 Pewarnaan Gram (Baron et al., 1999)

Prosedur pewarnaan gram:

- a. Gelas objek dibersihkan dengan kapas dan dilewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak, kemudian biarkan dingin.

- b. Sediaan bakteri dibuat diatas gelas obyek dengan ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis) dan dibiarkan kering diudara. Kemudian difiksasi diatas lampu bunsen.
- c. Sediaan dituangi dengan Kristal violet. Setelah satu 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
- d. Kemudian sediaan dituangi dengan Lugol. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
- e. Sediaan dituangi dengan etanol 96%. Setelah 5-10 detik atau sampai warna cat luntur, sediaan dibilas dengan air.
- f. Sediaan dituangi dengan Safranin. Setelah 30 detik, sediaan dibilas dengan air.
- g. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, selanjutnya dilihat dengan menggunakan mikroskop dengan menggunakan minyak emersi pada lensa obyektif pembesaran 100 x.

4.7.2.2 Tes Katalase(Jawetz *et al.*, 1996)

- a. Pembenihan cair bakteri disediakan pada gelas obyek.
- b. Kemudian sediaan tersebut ditetesi larutan H₂O₂ 3%.
- c. Ada tidaknya gelembung udara yang terjadi diperhatikan.

Bila gelembung tidak timbul, maka koloni bakteri dalam tabung reaksi bersifat katalase negatif. Tes katalase (-) menunjukkan *Streptococcus mutans*.

4.7.2.3 Tes Hemolisis dan Optochin

Untuk tes hemolisis lakukan *streaking* bakteri pada media *Blood Agar Plate* (BAP). Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Lakukan pengamatan pada BAP. Bila BAP berubah warna menjadi hijau, berarti bakteri tersebut memiliki sifat α -hemolisis. Bila BAP berubah warna menjadi jernih, maka bakteri tersebut bersifat β -hemolisis. Bila BAP tidak berubah warna, berarti bakteri bersifat γ -hemolisis/non-hemolisis.

Prosedur tes optochin:

- a. *Chocolate Agar Plate* (CAP) dibagi menjadi empat kuadran.
- b. Dilakukan *streaking* pada seperempat atau satu setengah kuadran pada *Chocolate Agar Plate*.
- c. Optochin disk diletakkan ke tengah kuadran dengan menggunakan penjepit steril.
- d. Posisi disk diatur dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar tetapi tidak membenamkan disk dalam agar.
- e. Plate ditutup dan dimasukkan kedalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- f. Plate diperiksa untuk zona inhibisi pertumbuhan disekitar cakram mengukur dan mencatat zona media penghambatan (mm).
- g. Zona hambatnya diamati, apabila sensitif terhadap optochin berarti menunjukkan *Streptococcus pneumoniae*.
- h. 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*. Apabila hasil negatif maka diidentifikasi sebagai *Streptococcus mutans* (Bailey and Scott, 2002).

4.7.3 Persiapan Suspensi Uji *Streptococcus mutans*

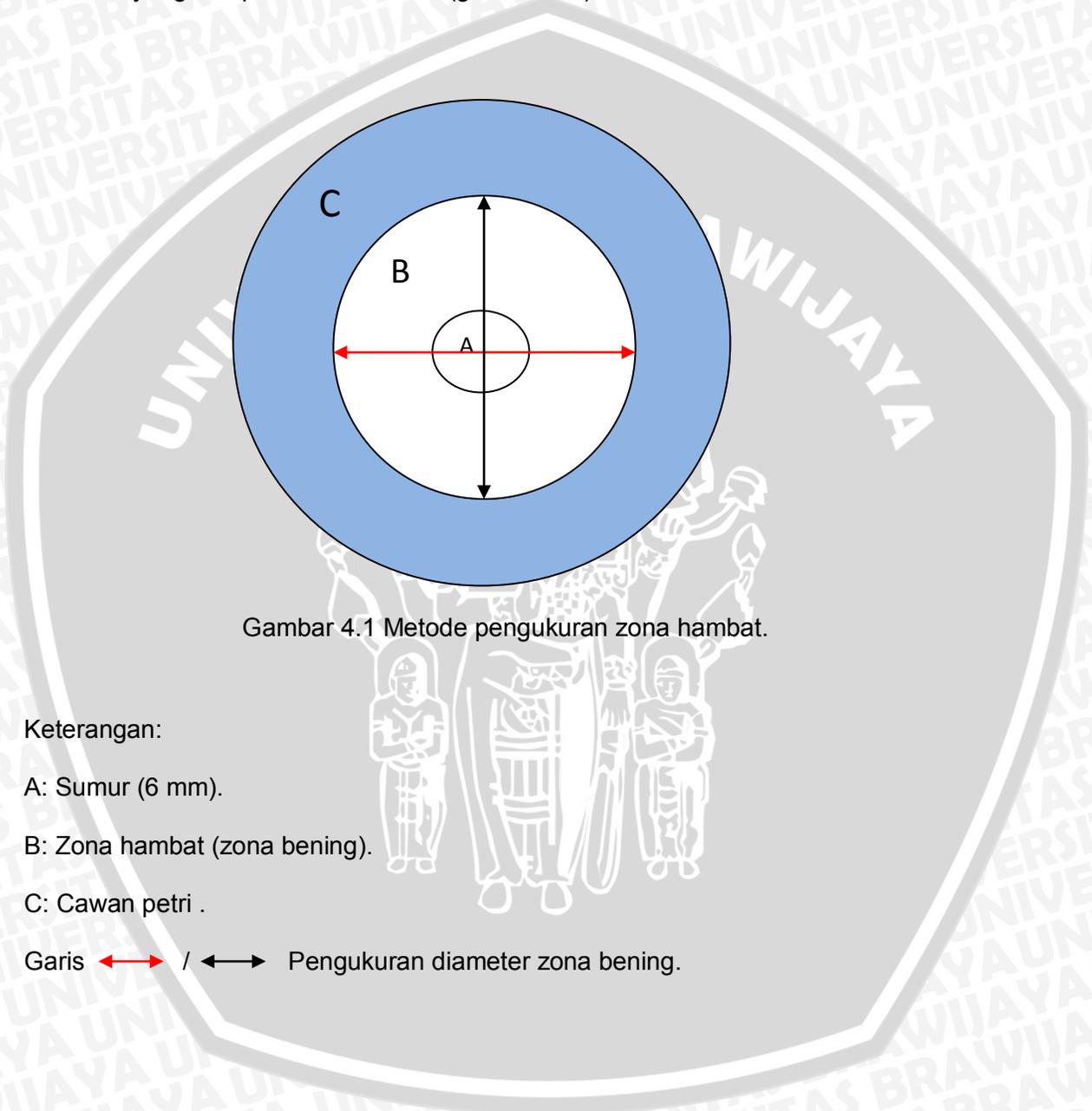
1. Dipersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* dari media BHI yang telah diuji konfirmasi.
2. *Streptococcus mutans* yang telah diidentifikasi dibiakkan pada medium cair dengan menggunakan *BHI broth* dan disimpan dalam *anaerobic jar* selama 24 jam pada suhu 37°C. Kekeruhan kultur tersebut dicocokkan dengan standar 0,5 *Mc Farland* atau setara dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

4.7.4 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica Less*) Terhadap *Streptococcus mutans*

Menyiapkan cawan petri yang berisi agar *Brain Heart Infusion* (BHI) Dengan biakan bakteri *Streptococcus mutans*, pada agar *Brain Heart Infusion* (BHI) dibuat 4 lubang sumuran dengan menggunakan perforator dengan masing-masing berdiameter 6 mm. Setelah itu dimasukan 100 µl ekstrak daun beluntas dengan konsentrasi kontrol negatif, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%.

Uji antibakteri diamati dengan adanya zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran yang telah berisi ekstrak daun beluntas. Pengukuran zona hambat diukur menggunakan *caliper* dengan cara sebagai berikut.

Setiap zona bening diukur diameternya sebanyak dua kali di tempat berbeda dan hasil yang didapat dirata-ratakan (gambar 4.1).



Gambar 4.1 Metode pengukuran zona hambat.

Keterangan:

A: Sumur (6 mm).

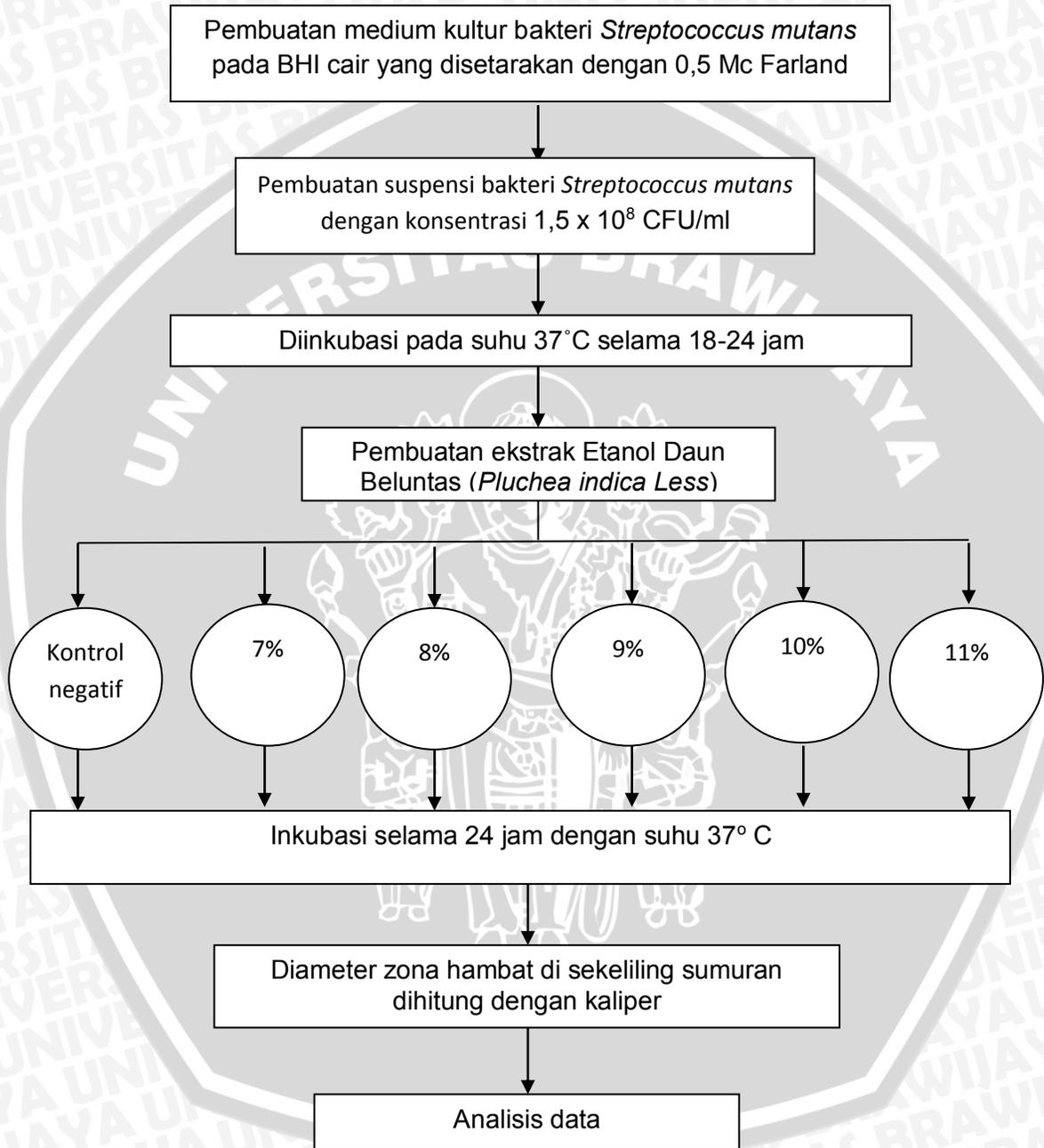
B: Zona hambat (zona bening).

C: Cawan petri .

Garis / Pengukuran diameter zona bening.



Alur penelitian



Gambar 4.2 Alur penelitian

4.8 Analisis Data

Dari data yang diperoleh, maka dapat dibuat analisa statistiknya. Masing-masing dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Setelah data terdistribusi normal dan homogen dilakukan uji *Anova One Way* dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Untuk menunjukkan apakah ada perbedaan tiap konsentrasi ekstrak yang digunakan dengan zona hambat *Streptococcus mutans* pada BHI agar, maka dilakukan uji LSD (*Least Significance Difference*).

