

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental post control design only* dengan menggunakan metode difusi sumuran untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia* L.) sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* secara *in vitro*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Agustus 2016 hingga bulan Oktober 2016.

4.3 Bahan yang Diuji dan Sampel Penelitian

Daun pare pada penelitian ini diperoleh dari UPT Materia Medica di Kota Batu. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya dan telah dilakukan identifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia* L.) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 0%. Konsentrasi tersebut merupakan hasil konsentrasi dari penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans* diukur dengan berbagai diameter zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong.

4.5 Estimasi Jumlah Pengulangan

Dalam penelitian ini, banyaknya jumlah pengulangan penelitian yang diperlukan dapat dihitung dengan menggunakan rumus estimasi besar sampel (Loekito, 1998):

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Dalam penelitian ini digunakan lima konsentrasi dari ekstrak etanol daun pare yang berbeda yang ditentukan berdasarkan penelitian pendahuluan, satu kontrol bakteri dan satu kontrol bahan, maka:

$$p = 7$$

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \text{ (dibulatkan menjadi 4)}$$

Jadi pada penelitian ini dilakukan empat kali pengulangan.

4.6 Definisi Operasional

- a. Daun pare yang digunakan adalah daun pare yang masih muda, segar, berwarna hijau dan diambil diujung ranting.
- b. Ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia* L.) adalah ekstrak yang diperoleh dari daun pare yang telah dikeringkan, kemudian dihaluskan, direndam dengan pelarut etanol 96%, diaduk, didiamkan (metode maserasi), dan diambil filtratnya dengan penyaringan yang kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40° Celcius.
- c. Bakteri *Streptococcus mutans* adalah bakteri anaerob gram positif (+) yang merupakan bakteri penyebab karies, diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya dengan isolat standar. Standar kepadatan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1×10^8 CFU/ml. CFU/ml merupakan singkatan dari *Colony Forming Unit/millimeter*. Hasil pewarnaan gram pada bakteri *Streptococcus mutans* adalah warna ungu, bentuk kokus berantai atau

berpasangan, tidak terjadi gelembung udara pada uji katalase, dan tidak menunjukkan adanya zona hambatan di sekitar disk pada uji *optochin*.

- d. Kontrol kuman adalah aquades dengan konsentrasi 0%.
- e. Kontrol bahan adalah ekstrak daun pare (*Momordica charantia* L.) dengan konsentrasi 100%.
- f. Daya antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona hambatan. Zona hambat menunjukkan kemampuan suatu bahan dalam menghambat pertumbuhan bakteri, yang dalam penelitian ini ditandai dengan adanya daerah jernih atau bening disekitar lubang sumuran yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Diameter zona hambat diukur dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan mm.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat dan Bahan Ekstraksi Etanol Daun Pare (*Momordica charantia* L.)

a. **Alat untuk Ekstraksi Etanol Daun Pare (*Momordica charantia* L.) pada penelitian ini adalah sebagai berikut:**

- a. Alat penggerus (*blender*)
- b. *Oven*
- c. Timbangan ukur atau neraca analitik
- d. Kertas saring
- e. Pendingin spiral atau *rotary evaporator*
- f. Tabung erlenmayer
- g. *Freezer*

- h. Vakum
- i. Labu evaporasi
- j. Evaporator
- k. Corong gelas
- l. Botol hasil ekstrak daun pare
- m. Labu penampung etanol
- n. Selang *waterpump*
- o. *Waterbath*
- p. *Waterpump*
- b. Bahan untuk Ekstraksi Etanol Daun Pare (*Momordica charantia* L.) pada**

penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. 100 gram serbuk daun pare (*Momordica charantia* L.)
- b. Aquades steril
- c. Etanol 96%

4.7.2 Alat dan Bahan Identifikasi *Streptococcus mutans*

a. Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram

- a. Gelas objek
- b. Ose
- c. Pembakar spiritus (bunsen)
- d. Kertas penghisap
- e. Mikroskop pembesaran objektif 1000x
- f. Tabung reaksi
- g. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*

h. Bahan pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin)

i. Aquades

b. Alat dan Bahan untuk Uji Katalase

Alat dan bahan yang digunakan untuk uji katalase pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Gelas Objek

b. Pipet

c. Tabung reaksi

d. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*

e. Hidrogen peroksida 3%

c. Alat dan Bahan untuk Uji Optochin

Alat dan bahan yang digunakan untuk tes *optochin* pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Ose

b. Inkubator

c. *Chocolate Agar Plate* (CAP)

d. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*

e. *Optochin* disk

4.7.3 Alat dan Bahan Uji Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pare (*Momordica charantia* L.) terhadap *Streptococcus mutans*

Alat dan bahan yang digunakan untuk uji daya antibakteri ekstrak etanol daun pare terhadap *Streptococcus mutans* pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Tabung reaksi
- b. Ose
- c. Mikropipet
- d. Cawan Pipet
- e. Perforator
- f. Inkubator
- g. Pembakar spiritus
- h. Jangka sorong
- i. *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB)
- j. *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA)
- k. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*
- l. Ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia* L.) dengan konsentrasi 0%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100%.
- n. Aquades

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Prosedur untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pare (*Momordica charantia* L.)

Prosedur pembuatan ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia* L.) adalah sebagai berikut:

a. Proses Pengeringan

Daun pare yang akan digunakan dipilih terlebih dahulu. Lalu daun pare dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Daun pare yang telah dicuci bersih dipotong

kecil-kecil kemudian dioven dengan suhu 40-60⁰ Celcius atau dijemur dengan panas matahari hingga kering.

b. Proses Ekstraksi (Metode Maserasi)

Daun pare (*Momordica charantia* L.) yang telah dikeringkan diblender sehingga didapatkan serbuk halus daun pare kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik sebanyak 100 gram. Serbuk daun pare tersebut kemudian dimasukan dalam tabung erlenmeyer. Kemudian direndam dengan pelarut etanol 96% sebanyak 100 ml untuk mengeluarkan senyawa yang terkandung dalam daun pare. Tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu diaduk sampai benar-benar tercampur kurang lebih selama 30 menit. Diamkan satu malam sampai mengendap. Ambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah tercampur dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring. Proses perendaman ini dilakukan sampai 3 kali.

c. Proses Evaporasi

Larutan hasil rendaman ditampung dan dibiarkan mengendap. Endapan dipisahkan dari larutan yang tidak mengendap. Larutan yang tidak mengendap dimasukkan dalam labu *evaporasi* 1 liter. Pasang labu *evaporasi* pada *evaporator*, isi *waterbath* dengan air sampai penuh. Pasang semua rangkaian alat termasuk *rotary evaporator*, pemanas *waterbath* (atur hingga 70⁰ Celcius atau sesuai dengan titik didih pelarut), sambungkan dengan aliran listrik. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu *evaporasi*. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung sekitar 1,5 sampai 2 jam untuk satu labu, dengan ukuran 1000 ml. Ekstrak kental dioven pada suhu 70⁰ Celcius untuk

menghilangkan pelarut etanol yang tersisa. Masukkan hasil ekstraksi ke dalam botol kemudian simpan dalam *freezer*. Hasil akhir inilah ekstraksi yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak daun pare dengan konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol.

4.8.2 Identifikasi i *Streptococcus mutans*

Prosedur identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* adalah sebagai berikut:

a. Pewarnaan Gram

- a. Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
- b. Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas objek, lalu ditambah sedikit bakteri yang diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquades yang telah diletakkan di atas gelas objek dan diratakan.
- c. Sediaan dikeringkan diudara, kemudian difiksasi dengan cara melewatkan sediaan beberapa kali di atas api. Sediaan siap untuk diwarnai.
- d. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama satu menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- f. Alkohol 96% diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 5-10 detik. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- g. Safranin diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.

- h. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap sampai kering, kemudian ditetesi minyak emersi.
- i. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif dengan perbesaran 97-100x.
- j. Hasil positif : *Streptococcus mutans* merupakan bakteri kokus berwarna ungu (Gram positif).

b. Uji Katalase

- a. Sediakan pembenihan cair bakteri pada gelas obyek.
- b. Kemudian sediaan ditetesi H₂O₂ 3% sebanyak 2-3 tetes.
- c. Mengamati ada tidaknya gelembung udara yang terjadi.
- d. Apabila terjadi gelembung udara termasuk bakteri *Staphylococcus*. Bila tidak terjadi gelembung udara (katalase negatif) maka termasuk bakteri *Streptococcus*.

c. Uji Optochin

- a. Bakteri digoreskan merata pada permukaan media CAP.
- b. Letakkan *optochin* disk di tengah inokulum dengan penjepit steril.
- c. Mengatur posisi disk dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan disk dalam agar.
- d. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37° Celcius dalam inkubator.
- e. Mengamati zona hambatan disekeliling 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 negatif dan diidentifikasi sebagai bakteri *Streptococcus mutans*.

4.8.3 Pembiakan *Streptococcus mutans*

Bakteri *Streptococcus mutans* telah diidentifikasi lalu dibiakkan pada media cair dengan menggunakan *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) selama 1 x 24 jam pada suhu 37° Celcius.

4.8.4 Pembuatan Suspensi Uji *Streptococcus mutans*

- a. Ambil 5 koloni bakteri dengan ose ($d \geq 1$ mm) kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{maks} = 625$ nm (Murray *et al.*, 1999).
- b. Apabila belum setara, dilakukan pengenceran menggunakan rumus:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan:

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_2 = *Optical density* ($0,1 = 10^8$ CFU/ml)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

- d. Dari hasil yang diperoleh dibuat pembiakan cair bakteri yang mengandung $1 - 5 \times 10^8$ CFU/ml.

4.9 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pare (*Momordica charantia* L.) terhadap *Streptococcus mutans* Menggunakan Metode Difusi Sumuran

Prosedur uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia* L.) adalah sebagai berikut:

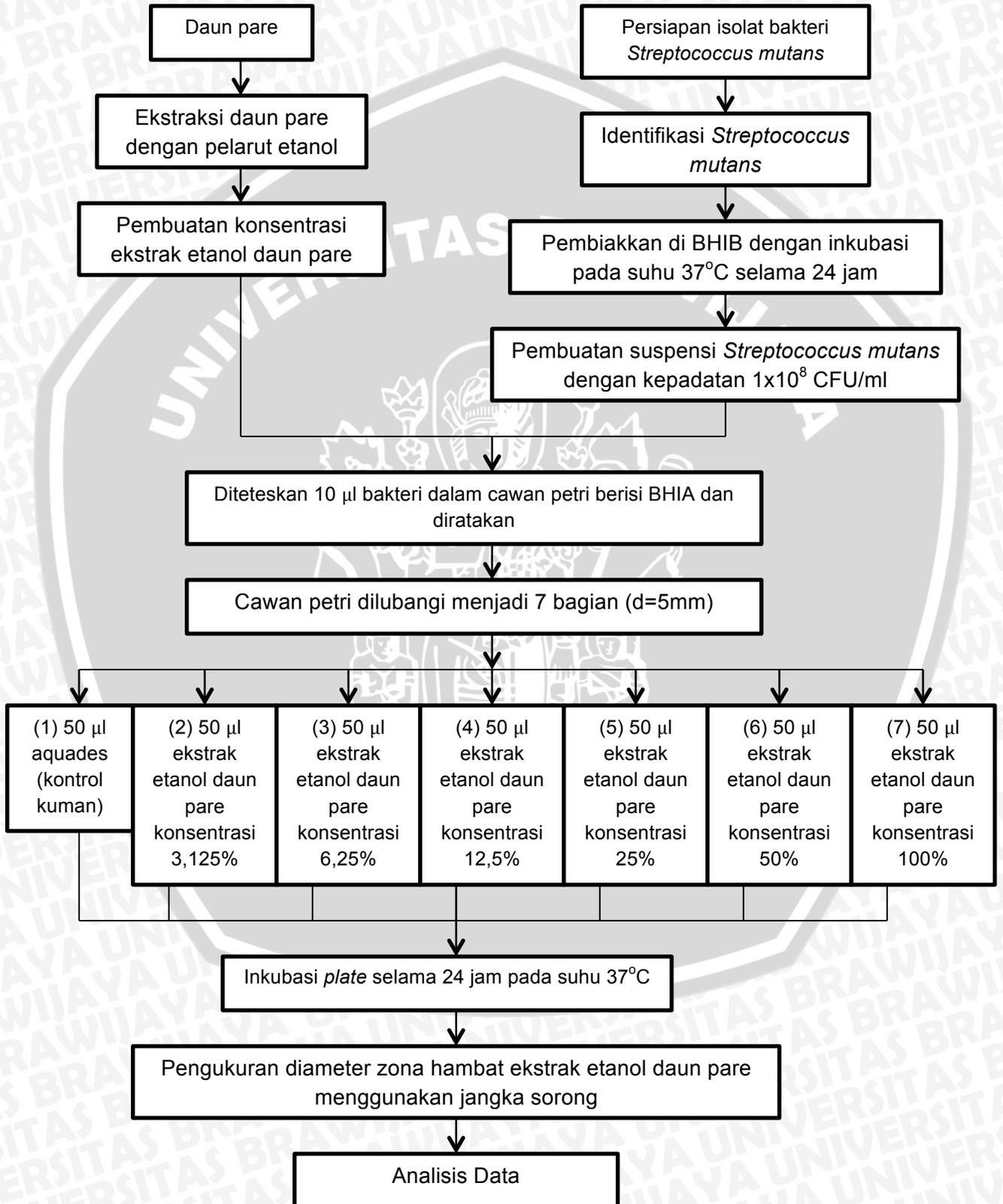
- a. Menyiapkan empat cawan petri yang akan berisi *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) lalu biakan bakteri *Streptococcus mutans* disetarakan kekeruhannya dengan larutan standar *Mc Farland* 0,5 sebanyak 100 μ l.
- b. Ambil bakteri sebanyak 10 μ l dengan menggunakan mikropipet kemudian dituangkan pada cawan petri yang berisi BHIA dan diratakan dengan cara *plate* diputar secara perlahan agar bakteri dan media menjadi homogen.
- c. Setelah media *setting*, pada *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) dibuat 7 lubang sumuran dengan menggunakan perforator dengan masing-masing berdiameter 5 mm setelah itu dimasukkan 50 μ l ekstrak etanol daun pare dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 100% sebagai kontrol bahan, 0% (aquades) sebagai kontrol bakteri.
- d. Masing-masing lubang sumuran pada *plate* dengan satu konsentrasi sehingga mewakili 4 pengulangan dan masing-masing diberi label. Setiap *plate* terdiri dari berbagai macam konsentrasi. *Plate* pertama yang berarti pengulangan pertama berisi konsentrasi 0% (aquades) sebagai kontrol bakteri, larutan ekstrak etanol daun pare dengan konsentrasi 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100% sebagai kontrol bahan. Begitu juga pada *plate* yang kedua, ketiga dan keempat.
- e. Setelah semua lubang berisi larutan, cawan petri diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37° Celcius.
- f. Setelah dilakukan inkubasi, zona hambat yang terbentuk dapat diukur dengan menggunakan jangka sorong.

4.10 Pengamatan dan Pengukuran

Larutan yang diletakkan di dalam sumuran akan memberikan suatu zona bebas bakteri mengelilingi daerah sumuran dimana luasnya zona berbanding lurus pada kekuatan sampel dalam menghambat bakteri. Zona hambat yang dihasilkan mempunyai bentuk lingkaran dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,01 satuan millimeter (mm). Pengukuran diameter zona hambat dilakukan sebanyak 4 kali (arah vertikal, horizontal, dan dua arah diagonal) dan dihitung rata-ratanya. Diameter diukur dari batas terluar dari zona hambat dari satu sisi ke sisi lainnya.



4.11 Alur Penelitian



4.12 Analisis Data

Data-data hasil penelitian di analisis dengan menggunakan uji statistik. Data tersebut diuji distribusi normalitas menggunakan uji *Shapiro-wilk*. Dan uji homogenitas (*Levene*) untuk mengetahui kesamaan varian dari beberapa populasi. Apabila data berdistribusi normal dan homogen maka analisis yang digunakan adalah uji statistik parametrik yaitu uji *One way ANOVA*, uji Korelasi Pearson dan uji Regresi. Uji statistik parametrik *One way ANOVA* bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh perbedaan pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Sedangkan uji Korelasi Pearson digunakan untuk mengetahui adanya hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia* L.) terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Dan uji Regresi untuk mengetahui seberapa besar hubungan konsentrasi ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia* L.) terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.