

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Dalam penelitian ini metode yang digunakan adalah menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorik secara *in vitro* dengan menggunakan metode dilusi tabung dan dilusi agar untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak daun meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Metode dilusi tabung dan dilusi agar dipakai untuk uji kepekaan antibakteri. Tahap pengujian bahan di media cair *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) kemudian dilanjutkan dengan tahap penggoresan pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan September sampai dengan Desember 2013.

4.3 Sampel dan Besar Sampel

Sampel penelitian ini adalah jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari stok Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Besar sampel yang diperlukan dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Lukito, 1998):

$$6(n-1) \geq 16$$

$$6n-6 \geq 16$$

$$6n \geq 22$$

$$n \geq 22 \rightarrow n = 3,6667 = 4$$

Keterangan:

n : Jumlah pengulangan = 4 kali

p : Jumlah percobaan (6, yaitu 6 konsentrasi ekstrak)

Jadi penelitian ini diperlukan jumlah sampel atau ulangan adalah empat kali.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel-variabel dalam penelitian ini, meliputi :

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun meniran (*Phyllanthus ninuri* Linn) dengan konsentrasi 25%, 22,5%, 20%, 17,5%, 15%, dan 12,5%.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans*.

4.5 Definisi Operasional

- Daun meniran yang digunakan adalah daun setengah tua berwarna hijau muda berasal dari tanaman TOGA yang dijual di Materia Medika Batu yang diidentifikasi terlebih dahulu di Materia Medika Batu.

- b. Ekstrak etanol daun meniran adalah daun meniran yang telah mengalami proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 25%, 22,5%, 20%, 17,5%, 15%, 12,5%.
- c. Isolat bakteri adalah bakteri *Streptococcus mutans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah dilakukan uji identifikasi bakteri terlebih dahulu dengan tes pewarnaan gram, tes katalase, dan tes optocin.
- d. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi antibakteri ekstrak daun meniran terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*, ditandai dengan hasil biakan yang tampak jernih, setelah diinkubasikan 18-24 jam dengan larutan kontrol dalam serial tabung dilusi atau tidak tumbuhnya bakteri pada *serial plate* dilusi agar setelah diinkubasikan 18-24 jam.
- e. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi antibakteri ekstrak daun meniran terendah yang mampu membunuh *Streptococcus mutans* ditandai dengan tidak tumbuhnya koloni bakteri pada BHIA atau kurang dari 0,1 % *Original Inoculum* pada *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA).

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Untuk Identifikasi bakteri

1. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*
2. Bahan-bahan pengecatan gram (Kristal violet, Lugol, Alkohol, dan Safranin)
3. *Object glass*

4. Minyak emersi
5. Ose
6. Mikroskop
7. Kertas penghisap
8. H₂O₂ 3%
9. *Chocolate Agar Plate (CAP)*
10. *Optochin disk*

4.6.2 Untuk Ekstraksi Daun Meniran

1. Daun meniran
2. Penggiling
3. Labu Erlenmeyer
4. *Vacuum evaporator*
5. Timbangan analisis
6. Etanol 96%
7. Gelas ukur
8. Kertas saring
9. *Shaker*



4.6.3 Untuk Dilusi Tabung

1. Rak tabung reaksi
2. Tabung reaksi untuk kontrol bakteri dan ekstrak
3. Pipet steril
4. Inkubator
5. *Brain heart infusion broth* (BHIB)
6. Hasil Ekstraksi
7. Pembenihan cair bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/ml
8. *Aquadest*
9. *Vortex*
10. Media Agar BHI

4.6.4 Untuk *Streaking Plate*

1. *Brain heart infusion agar* (BHIA)
2. Ose
3. Bunsen
4. *Vortex*

4.6.5 Untuk Dilusi Agar

1. Ekstrak daun meniran



2. *Mueller Hinton Agar* (MHA)
3. Pembenihan cair bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/ml
4. Mikro pipet
5. Inkubator

4.6.6 Untuk Pembuatan Bahan Cair Bakteri dengan Kepadatan 10^6 CFU/ml

1. Tabung reaksi
2. Brain *heart infusion* (BHI)
3. Pipet steril
4. Larutan NaCl
5. *Vortex*
6. Spektrofotometer

4.7 Rancangan Operasional Penelitian

4.7.1 Identifikasi Bakteri

Tes yang dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri *Streptococcus mutans* antara lain adalah tes pewarnaan gram untuk menentukan bakteri tersebut termasuk bakteri gram positif atau gram negatif, tes katalase untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Staphylococcus aureus*, dan tes optochin untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Streptococcus pneumoniae*.

1. Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

- a. Dibuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan udara.
- b. Setelah kering difiksasi dengan api bunsen.
- c. Sediaan dituang dengan kristal violet selama 1 menit.
- d. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan dituangi lugol selama 1 menit.
- f. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- g. Sediaan dituangi alkohol 96 % selama 5-10 detik.
- h. Alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- i. Sediaan dituangi safranin selama 30 detik.
- j. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- k. Dikeringkan dengan kertas penghisap.
- l. Diamati dengan mikroskop pembesaran 100-400x dengan intensitas sinar rendah.
- m. Hasil positif maka *Streptococcus mutans* akan tercatat warna ungu.

2. Tes Katalase

- a. Sediakan pembenihan cair bakteri pada gelas objek.
- b. Kemudian sediaan tersebut ditetesi larutan H₂O₂ 3%.
- c. Diamati ada tidaknya gelembung udara yang terjadi.

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

3. Tes Optochin

a. Membagi *Chocolate Agar Plate* (CAP) menjadi empat kuadran.

b. Melakukan streaking 1 atau 1 ½ kuadran pada CAP.

c. Letakkan *optochin disk* ditengah inokulum dengan penjepit steril.

d. Mengatur posisi disk dengan menekan *disk* pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan *disk* dalam agar. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C dalam inkubator.

e. 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*.

4.7.2 Persiapan Suspensi Uji Bakteri *Streptococcus mutans*

1. Dipersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* dari media BHI yang telah diuji konfirmasi.

2. Diambil 5 koloni ($d \geq 1\text{mm}$) dengan ose kemudian dimasukkan kedalam 5 ml BHIA steril. Kemudian diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung 1×10^8 hingga 5×10^8 CFU/ml dengan rumus $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$.

3. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^6$ CFU/ml hingga 2×10^6 CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^8 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml. Proses dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml.

4.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Meniran (*Phyllanthus Ninuri* Linn)

1. Daun meniran dicuci bersih, ditiriskan kemudian dijemur sampai benar-benar kering.
2. Daun meniran yang sudah kering kemudian dipotong-potong dan digiling hingga menjadi serbuk.
3. Serbuk daun meniran ditimbang sebanyak 300 gram.
4. Serbuk dimasukkan kedalam tabung erlenmeyer ukuran 1000 ml sebanyak 300 gram.
5. Kemudian direndam dengan 900 ml pelarut etanol 96% sampai serbuk terendam semuanya.
6. Dikocok hingga benar-benar tercampur (kurang lebih 30 menit). Didiamkan 1 malam sampai mengendap.
7. Proses ekstraksi dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih.
8. Kemudian hasil ekstraksi siap dievaporasi.
9. Etanol yang didapat dalam filtrat diuapkan menggunakan *vacum evaporator* pada suhu 40° C kurang lebih selama 1 jam sehingga diperoleh ekstrak kental daun meniran yang berwarna hijau tua dengan konsentrasi 100%.

4.7.4 Uji Dilusi Agar untuk Menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM)

Volume total dari agar plate diasumsikan sebesar 15 ml. Konsentrasi ekstrak daun meniran yang digunakan pada percobaan ini adalah 17,5%, 15%, 12,5%, 10%, 7,5% dan 5% yaitu, sebagai berikut :

- KK = 15 ml agar
- 17,5% = 2,625 ml ekstrak daun meniran ditambahkan dengan 12,375 ml MHA
- 15% = 2,25 ml ekstrak daun meniran ditambahkan dengan 12,75 ml MHA
- 12,5% = 1,875 ml ekstrak daun meniran ditambahkan dengan 12,75 ml MHA
- 10% = 1,5 ml ekstrak daun meniran ditambah dengan 13,5 ml MHA
- 7,5% = 1,125 ml ekstrak daun meniran ditambahkan dengan 13,875 ml MHA
- 5 % = 0,75 ml ekstrak daun meniran ditambah dengan 14,25 ml MHA

Campurkan ekstrak daun meniran dengan MHA yang masih hangat. Kemudian homogenkan campuran tersebut dengan memutar searah jarum jam. Biarkan kedua bahan itu mengeras lalu masukkan kedalam inkubator untuk sterilisasi media.

Setelah keesokan harinya teteskan suspensi bakteri, ambil satu tetes suspensi bakteri dengan mikro pipet (satu tetes = $10 \mu\text{l}$ 10^6 CFU/ml). Teteskan pada permukaan agar yang telah disterilisasi secara tegak lurus. Biarkan suspensi bakteri menyerap ke dalam agar sampai mengering. Setelah itu

masukkan plate kedalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37° C. Lakukan pengamatan setelah diinkubasi selama 24 jam.

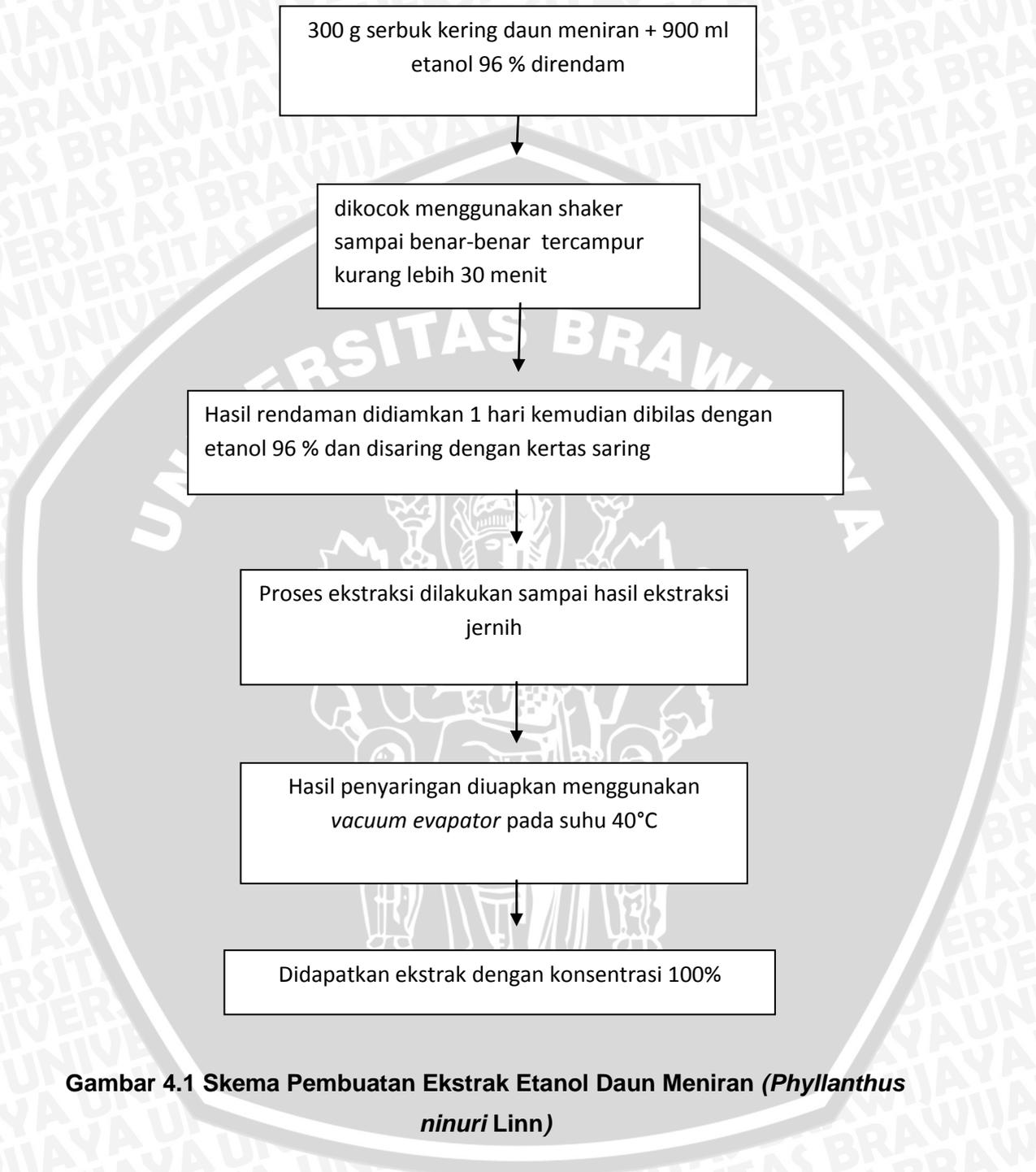
4.7.5 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Meniran (*Phyllanthus ninuri* Linn) Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*

1. Disediakan 8 tabung steril, 6 tabung sebagai uji antibakteri dan 1 tabung sebagai kontrol bakteri (kontrol positif), dan 1 tabung sebagai kontrol bahan (kontrol negatif).
2. Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol meniran didapatkan dari hasil pengenceran seri, yaitu dengan cara perbandingan antara volume ekstrak dengan aquadest.
3. Menyiapkan pembenihan bakteri dengan konsentrasi $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml.
4. Pembuatan konsentrasi ekstrak :
 - a. Tabung 1 : ekstrak etanol daun meniran dengan konsentrasi 25 % yang didapat dari 0,25 ml ekstrak daun meniran ditambahkan dengan 0,75 ml aquadest.
 - b. Tabung 2 : ekstrak etanol daun meniran dengan konsentrasi 22,5 % yang didapat dari 0,725 ml ekstrak daun meniran ditambahkan dengan 0,85 ml aquadest.
 - c. Tabung 3 : ekstrak etanol daun meniran dengan konsentrasi 20 % yang didapat dari 0,2ml ekstrak daun meniran ditambahkan dengan 0,8 ml aquadest.

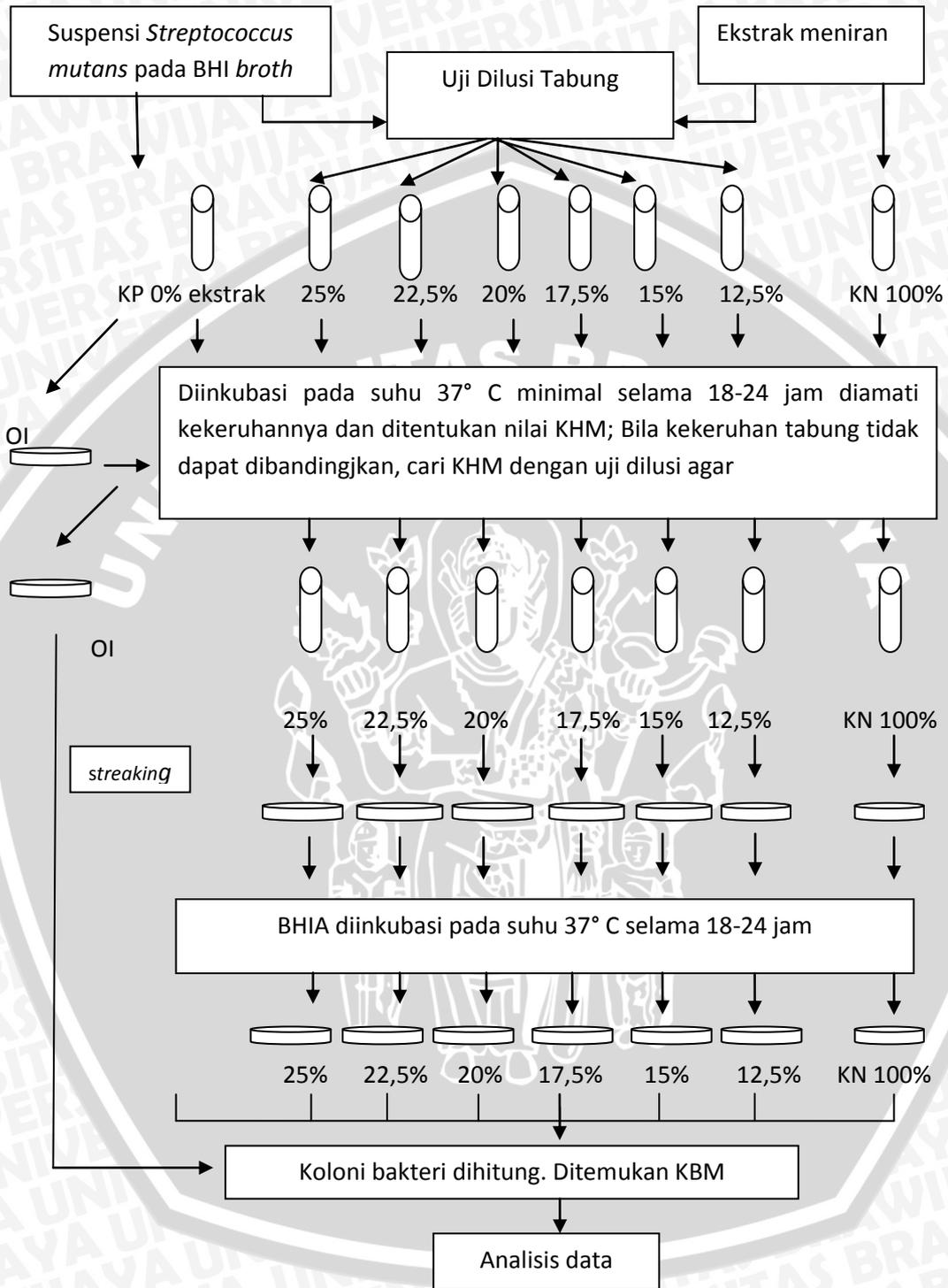
- d. Tabung 4 : ekstrak etanol daun meniran dengan konsentrasi 17,5 % yang didapat dari 0,175 ml ekstrak daun meniran ditambahkan dengan 0,825 ml aquadest.
 - e. Tabung 5 : ekstrak etanol daun meniran dengan konsentrasi 17,5 % yang didapat dari 0,175 ml ekstrak daun meniran ditambahkan dengan 0,825 ml aquadest.
 - f. Tabung 6 : ekstrak etanol daun meniran dengan konsentrasi 15 % yang didapat dari 0,15 ml ekstrak daun meniran ditambahkan dengan 0,85 ml aquadest.
 - g. Tabung 7 : ekstrak etanol daun meniran dengan konsentrasi 12,5 % yang didapat dari 0,125 ml ekstrak daun meniran ditambahkan dengan 0,875 ml aquadest.
 - h. Setelah pengenceran seri selesai, dimasukkan 1 ml inokulum standart (bakteri *Streptococcus mutans*) pada tabung no 1-7
5. Koloni bakteri (kontrol positif) digoreskan pada media *brain heart infusion agar* (BHIA) sebagai *original inokulum* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
 6. Seluruh tabung di *vortex* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
 7. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. Kadar hambatan minimum (KHM) di dapatkan dengan cara mengamati secara visual yaitu dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan kekeruhan atau pembuatan endapan apabila hasil keruh dan tidak bisa diamati maka dilakukan dilusi agar untuk mencari KHM.

8. Untuk lebih memperjelas hasil yang didapat, maka dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA). Kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C.
9. Pada hari ketiga, didapatkan data Kadar Bunuh Minimum (KBM) dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni kuman dengan *colony counter*. Kadar bunuh minimum (KBM) ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA), jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di *Original Inokulum*.

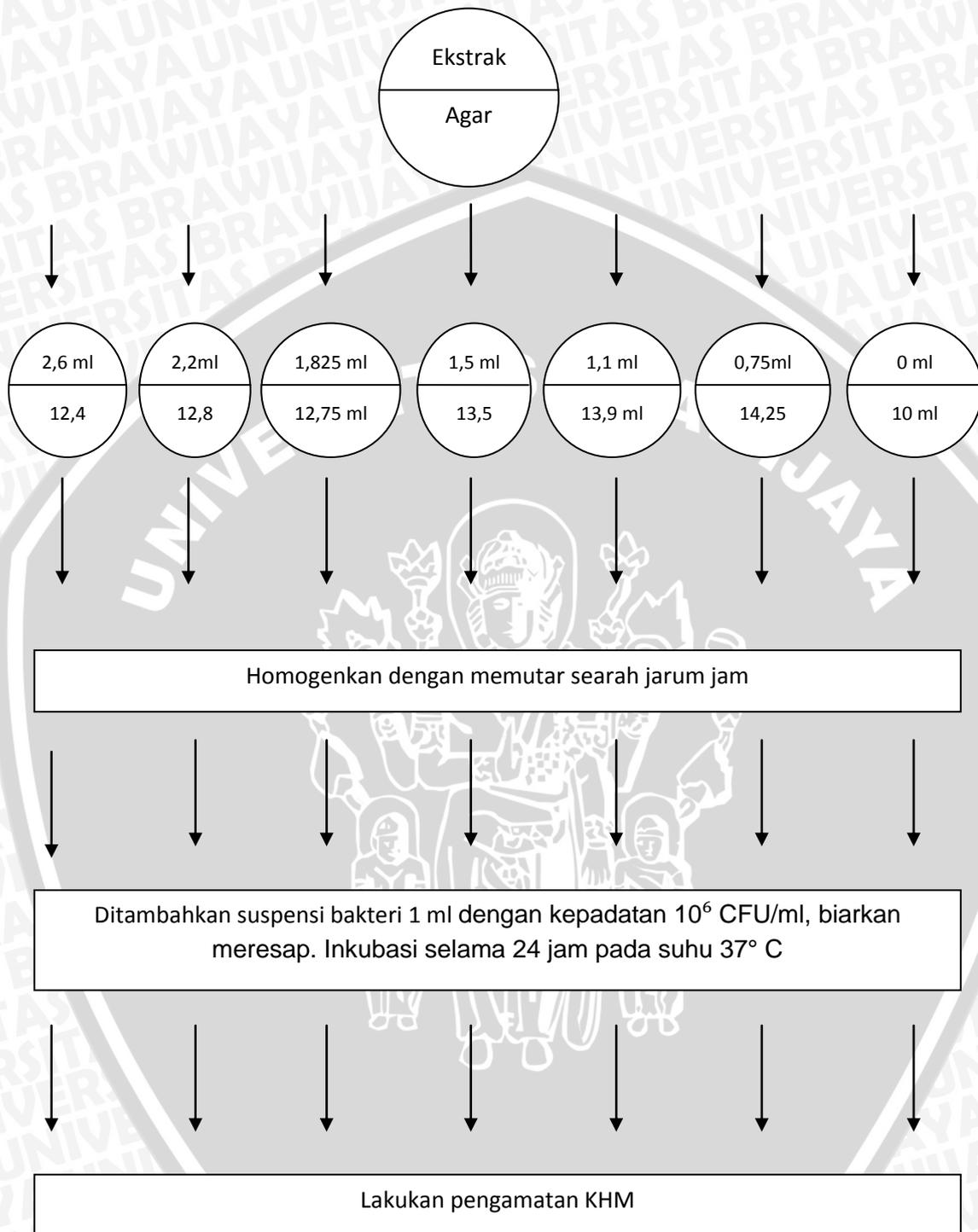




Gambar 4.1 Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Meniran (*Phyllanthus ninuri* Linn)



Gambar 4.2 Skema Alur Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Meniran Terhadap *Streptococcus mutans*



Gambar 4.3 Penentuan KHM dengan Metode Dilusi Agar

4.8 Pengumpulan Data

Data diperoleh berupa kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif didapatkan dengan cara melihat tingkat kekeruhan dan melihat ada atau tidaknya bakteri yang tumbuh pada *plate* BHIA. Data kuantitatif dapat dilihat dengan cara menghitung jumlah koloni *Streptococcus mutans* dengan menggunakan *colony counter*.

4.9 Analisis Data

Data terlebih dahulu uji distribusi dan homogenitas varian menggunakan tes Kolmogorov Smirnov. Apabila data terdistribusi normal, analisis data yang digunakan adalah uji statistic *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95 % digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun meniran terhadap jumlah koloni *Streptococcus mutans*. Hipotesis ditentukan melalui nilai signifikansi yang muncul $p < 0,01$ maka hipotesis diterima, bila nilai signifikansi $p > 0,01$ maka hipotesis ditolak. Uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak daun meniran terhadap pertumbuhan koloni *S.mutans*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 17.0.)