

## BAB 4

### ME TODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan desain penelitian *true experimental posttest-only control group design*. Metode yang digunakan adalah metode dilusi tabung untuk mengetahui efektifitas antibakteri ekstrak etanol gambir (*Uncaria gambir Roxb*) terhadap bakteri penyebab karies *Streptococcus mutans* secara *in vitro*.

#### 4.2 Bahan yang Diuji dan Sampel Penelitian

Bahan yang diujikan pada penelitian ini adalah gambir (*Uncaria gambir Roxb*) yang diperoleh dari kota Blitar sedangkan sampel bakteri *Streptococcus mutans* yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.3 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Agustus 2013 sampai bulan Oktober 2013

#### 4.4 Identifikasi Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak etanol gambir (*Uncaria gambir Roxb*) dengan konsentrasi 11.25%, 10%, 8.75%, 7.5%, 6.25%, 0% (kontrol negatif), dan 100% (kontrol positif). Penipisan seri pada penelitian ini digunakan untuk menentukan konsentrasi ekstrak etanol gambir (*Uncaria gambir Roxb*) yang akan digunakan pada penelitian sesungguhnya dan untuk mendapatkan KBM yang lebih tepat serta untuk mendapatkan persamaan regresi yang lebih teliti. Jarak antar konsentrasi yang terlalu dekat (<1%) akan menyebabkan tingkat kesalahan pengambilan ekstrak meningkat.

##### 4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah jumlah pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

##### 4.4.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol penelitian ini terdiri atas suhu dan lama inkubasi. Dalam penelitian ini digunakan suhu 37<sup>0</sup> C dan lama inkubasi 24 jam.

#### 4.5 Definisi Operasional

**4.5.1 Gambir (*Uncaria gambir Roxb*)** berupa getah daun dan ranting dari tanaman *Uncaria gambir (Uncaria gambir Roxb) Roxb* yang telah dikeringkan, berbentuk blok, berwarna coklat, didapat dari kota Blitar, dan sudah dikonfirmasi terlebih dahulu kebenarannya di Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

**4.5.2 Ekstrak etanol gambir (*Uncaria gambir Roxb*)** adalah ekstrak yang diperoleh dengan melakukan ekstraksi gambir yang sudah digerus dan

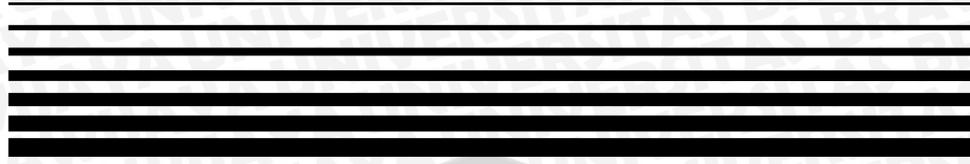
dihaluskan sehingga didapat gerusan gambir (*Uncaria gambir Roxb*) yang kemudian diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi.

**4.5.3 Bakteri *Streptococcus mutans*** adalah bakteri yang terlihat dengan warna ungu pada pewarnaan gram, tidak menunjukkan adanya gelembung pada tes *katalase*, dan tidak menunjukkan adanya zona hambatan di sekitar disk pada tes *optochin*.

**4.5.4 Standar kepadatan bakteri** yang digunakan dalam penelitian ini sebesar  $10^6$  CFU/ ml.

**4.5.5 Koloni bakteri *Streptococcus mutans*** adalah sekumpulan bakteri yang ditunjukkan dengan bentukan bulat berwarna kuning yang tumbuh pada media *Brain Heart Infusion Agar (BHIA)* setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam.

**4.5.6 Kadar Hambat Minimum (KHM)** adalah kadar atau konsentrasi terendah dari ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji (*Streptococcus mutans*) dan ditandai dengan tidak terdapatnya kekeruhan pada ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) dalam tabung yang telah diberi bakteri tersebut. KHM didapatkan dengan cara mengamati dan membandingkan kekeruhan atau pertumbuhan bakteri dengan kontrol positif. KHM didapatkan pada tabung yang jernih pada pengenceran tertinggi. Penentuan KHM dilakukan dengan metode pengenceran (metode dilusi tabung). Pengamatan kejernihan tabung dibantu dengan latar belakang garis-garis horizontal yang berbeda ketebalannya guna menilai pertumbuhan bakteri secara kualitatif.



Semakin banyak garis yang tampak menunjukkan semakin efektifnya bahan coba.

**4.5.7 Original Inoculum (OI)** adalah suspensi bakteri dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi dan digunakan untuk mencari kategori KBM.

**4.5.8 Kadar Bunuh Minimum (KBM)** adalah kadar atau konsentrasi terendah dari ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) yang mampu membunuh bakteri uji (*Streptococcus mutans*), ditandai dengan pertumbuhan koloni bakteri kurang dari 0,1% *original inoculum* pada media *Brain Heart Infusion Agar (BHIA)* yang telah dilakukan penggoresan (*streaking*) dengan satu ose larutan ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*). Untuk menghitung koloni yang ada digunakan *colony counter* guna menilai pertumbuhan kuman secara kuantitatif.

**4.5.9 Kontrol Positif (Kontrol Ekstrak)** adalah bahan berupa larutan ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) 100%.

**4.5.10 Kontrol Negatif (Kontrol Bakteri)** adalah tabung dengan konsentrasi 0%, tabung dengan bakteri tanpa larutan ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*).

#### 4.6. Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.6.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) adalah : grinder mekanik, timbangan analitik, labu erlenmeyer, kertas filter, dan *rotary evaporator*. Alat yang digunakan untuk identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* adalah bunsen, korek api, gelas objek, ose, mikroskop dengan perbesaran 400x, plate steril, penjepit steril dan penggaris. Alat yang digunakan untuk uji ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) adalah tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, mikropipet, pipet *tip*, stiker label, spidol marker, inkubator, *vortex*, ose, plate steril, *colony counter*, dan spektrofotometer.

##### 4.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) adalah gambir 100 gram yang telah dihaluskan hingga menjadi bubuk, etanol 96% sebanyak 900 ml, dan aquades steril.

Bahan yang dibutuhkan untuk identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* adalah : aquades steril, biakan bakteri *Streptococcus mutans*, pewarna gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), kertas penghisap, minyak emersi, air, larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, *Blood Agar Plate (BAP)*, *optochin disk*, *Brain Heart Infusion Broth (BHIB)*, *Brain Heart Infusion Agar (BHIA)*.

Bahan yang dibutuhkan untuk uji ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) adalah ekstrak etanol gambir (*Uncaria gambir Roxb*), suspensi bakteri *Streptococcus mutans*, *Brain Heart Infusion Agar (BHIA)*, *Brain Heart Infusion Broth (BHIB)*, NaCl 0,85%, dan aquades steril.

#### 4.7 Estimasi Jumlah Pengulangan

Dalam penelitian ini, banyaknya pengulangan ditentukan dengan menggunakan rumus estimasi besar pengulangan (Notobroto, 2005) sebagai berikut

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan/ jumlah konsentrasi

n = jumlah pengulangan

Dalam penelitian ini digunakan 6 macam perlakuan dengan konsentrasi yang berbeda, maka :

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

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5 \approx 4$$

Jadi jumlah pengulangan yang harus dilakukan untuk mendapatkan jumlah sampel yang dapat dipercaya adalah sebanyak 4 kali pengulangan.

#### 4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari prosedur identifikasi *Streptococcus mutans*, yaitu pewarnaan Gram, tes katalase dan tes Optochin, pembuatan ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*), pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*, uji efektivitas antibakteri ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*).

#### 4.8.1 Identifikasi Bakteri *Streptococcus mutans* (Chielwin, 2011)

Untuk membuktikan bahwa koloni yang tumbuh adalah bakteri *Streptococcus mutans* maka dilakukan serangkaian tes, antara lain tes pewarnaan gram untuk menentukan bakteri tersebut termasuk kategori gram positif kokus dengan hasil positif berwarna ungu, tes katalase untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Staphylococcus aureus* dengan hasil negatif tidak terdapat gelembung, dan tes optochin untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Streptococcus pneumoniae* dengan hasil negatif.

##### A. Pewarnaan Gram

Prosedur pewarnaan gram yang pertama adalah dengan membuat sediaan (slide) pada gelas objek dan dikeringkan di udara kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewati di atas api bunsen. Kemudian sediaan dituangi kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit. Setelah satu menit, sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dituangi larutan lugol, dibiarkan selama 1 menit. Sisa lugol kemudian dibuang dan dibilas dengan air. Setelah itu sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dituangi safranin selama 30 detik, kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi, dan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 1000x. Hasil positif : *Streptococcus mutans* tercat ungu (gram positif) (Chielwin, 2011).

### B. Tes Katalase

Tes katalase dilakukan dengan menyediakan pembenihan cair bakteri *Streptococcus mutans* pada gelas objek. Kemudian sediaan tersebut ditetesi dengan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Perhatikan ada tidaknya gelembung udara yang terjadi. Hasil untuk *Streptococcus mutans* adalah tidak ada gelembung (tes katalase negatif) (Chielwin, 2011).

### C. Tes Optochin

Tes optochin dilakukan dengan melakukan *streaking* bakteri sebanyak 1 ose pada *Blood Agar Plate (BAP)*. Letakkan optochin disk di tengah inokulum dengan penjepit steril. Kemudian posisi disk diatur dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan disk dalam agar. Inkubasi selama 1 malam pada suhu 37<sup>o</sup> C dalam inkubator. Setelah itu amati zona hambatan di sekeliling disk. Jika terdapat zona ≤ 14 mm yang mengelilingi disk dengan diameter 6 mm atau zona ≤ 16 mm yang mengelilingi disk dengan diameter 10 mm, hasil tes adalah negatif dan diidentifikasi sebagai *Streptococcus mutans* (Chielwin, 2011).

#### 4.8.2 Penyetaraan Suspensi Bakteri Uji

Suspensi uji *Streptococcus mutans* dibuat dengan mempersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* dari *BHI* yang telah diidentifikasi. Ambil 5 koloni dengan ose (d ≥ 1 mm), kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur *Optical Density (OD)* atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada λ = 625 nm. Dari hasil yang diperoleh, pertama-tama dibuat pembenihan cair bakteri yang mengandung 1x 10<sup>8</sup> CFU/ ml dengan rumus

$n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$  (Karori *et al.*, 2007). Untuk mendapatkan suspensi bakteri yang mengandung  $1 \times 10^6$  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 bakteri dengan konsentrasi  $10^7$  CFU/ml. Proses dilanjutkan sekali lagi, dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung  $10^7$  CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan pembenihan cair bakteri dengan konsentrasi  $1 \times 10^6$  CFU/ml (Karori *et al.*, 2007).

#### 4.8.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Gambir (*Uncaria gambir Roxb*)

##### 1. Proses Ekstraksi (Setyawan, 2013)

Gambir (*Uncaria gambir Roxb*) blok dihancurkan dan dihaluskan dengan grinder mekanik. Selanjutnya bubuk gambir (*Uncaria gambir Roxb*) tersebut ditimbang dengan neraca analitik dan diambil sebanyak 100 g. Sampel bubuk gambir (*Uncaria gambir Roxb*) tersebut dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer kemudian ditambahkan pelarut etanol 96% hingga mencapai volume total 1 liter. Selanjutnya, tutup tabung erlenmeyer rapat-rapat dan kocok dengan perlahan 1-2 kali dalam sehari. Tabung erlenmeyer disimpan pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah 24 jam, campuran dipisahkan (difiltrasi) dengan kertas saring (kertas filter) hingga diperoleh filtrat berupa larutan ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) yang bebas dari partikel kasar. Ampas dari penyaringan pertama ini dimaserasi ulang dengan menggunakan pelarut yang baru, dikocok dengan perlahan 1-2 kali dalam sehari, dan setelah 24 jam, campuran dipisahkan (difiltrasi) kembali dengan kertas saring (kertas filter) hingga diperoleh filtrat yang kedua. Ampas dari penyaringan yang kedua ini dimaserasi ulang dengan menggunakan pelarut yang baru,

hingga didapatkan filtrat yang ketiga. Filtrat pertama, kedua, dan ketiga digabung dan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* untuk memisahkan pelarut etanol dari ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*).

## 2. Proses Evaporasi

Evaporator dipasang pada tiang permanen dengan kemiringan 30°-40° terhadap meja percobaan dengan susunan dari bawah ke atas terdiri dari alat pemanas, labu penampung hasil evaporasi, rotary evaporator dan tabung pendingin. Tabung pendingin dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin (pompa sirkulasi air dingin ini terhubung ke bak penampung hasil kondensasi melalui pipa plastik), pompa vakum, dan penampung hasil penguapan. Hasil ekstraksi yang sudah didapat dipindahkan ke labu penampung, kemudian rotary evaporator, alat pompa air dingin, dan alat pompa vakum dinyalakan. Kemudian alat pemanas dinyalakan untuk memanaskan hasil ekstraksi yang diletakkan dalam labu penampung sehingga hasil ekstraksi mendidih pada suhu 80°C (sesuai titik didih etanol) dan etanol tersebut menguap.

Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol, hal ini bertujuan untuk memisahkan etanol dari hasil evaporasi. Proses evaporasi ini dilakukan sampai volume ekstrak berkurang dan menjadi pekat (kental), setelah itu proses evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil sehingga didapatkan ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) dengan konsentrasi 100% (Setyawan, 2013).

#### 4.8.4 Rangkaian Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Gambir (*Uncaria gambir Roxb*) (Dzen, 2003)

1. Isolat yang diduga *Streptococcus mutans* dilakukan uji identifikasi bila telah terbukti distandarisasi dengan menggunakan standar Mc Farland 0,5 pada *nutrient broth*.
2. Disiapkan 8 tabung steril, 6 tabung reaksi untuk masing – masing perlakuan, 1 tabung kontrol ekstrak (positif), dan 1 tabung Kontrol Negatif (Kontrol Bakteri). Kontrol Positif (Kontrol Ekstrak) adalah tabung dengan ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) 100%. Kontrol Negatif adalah tabung dengan konsentrasi 0% atau tabung dengan bakteri tanpa larutan ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*).
3. Pembuatan ekstrak etanol gambir (*Uncaria gambir Roxb*) konsentrasi 22.5%, 20%, 17.5%, 15%, 12.5%.  
 $22.5\% = 0.225 \text{ ml ekstrak etanol gambir (Uncaria gambir Roxb)}$   
dengan konsentrasi 100% + 0.775 ml aquades steril  
 $20\% = 0.200 \text{ ml ekstrak etanol gambir (Uncaria gambir Roxb)}$   
dengan konsentrasi 100% + 0.800 ml aquades steril  
 $17.5\% = 0.175 \text{ ml ekstrak etanol gambir (Uncaria gambir Roxb)}$   
dengan konsentrasi 100% + 0.825 ml aquades steril  
 $15\% = 0.150 \text{ ml ekstrak etanol gambir (Uncaria gambir Roxb)}$   
dengan konsentrasi 100% + 0.850 ml aquades steril  
 $12,5\% = 0.125 \text{ ml ekstrak etanol gambir (Uncaria gambir Roxb)}$   
dengan konsentrasi 100% + 0,875 ml aquades steril
4. Menyiapkan perbenihan cair bakteri.

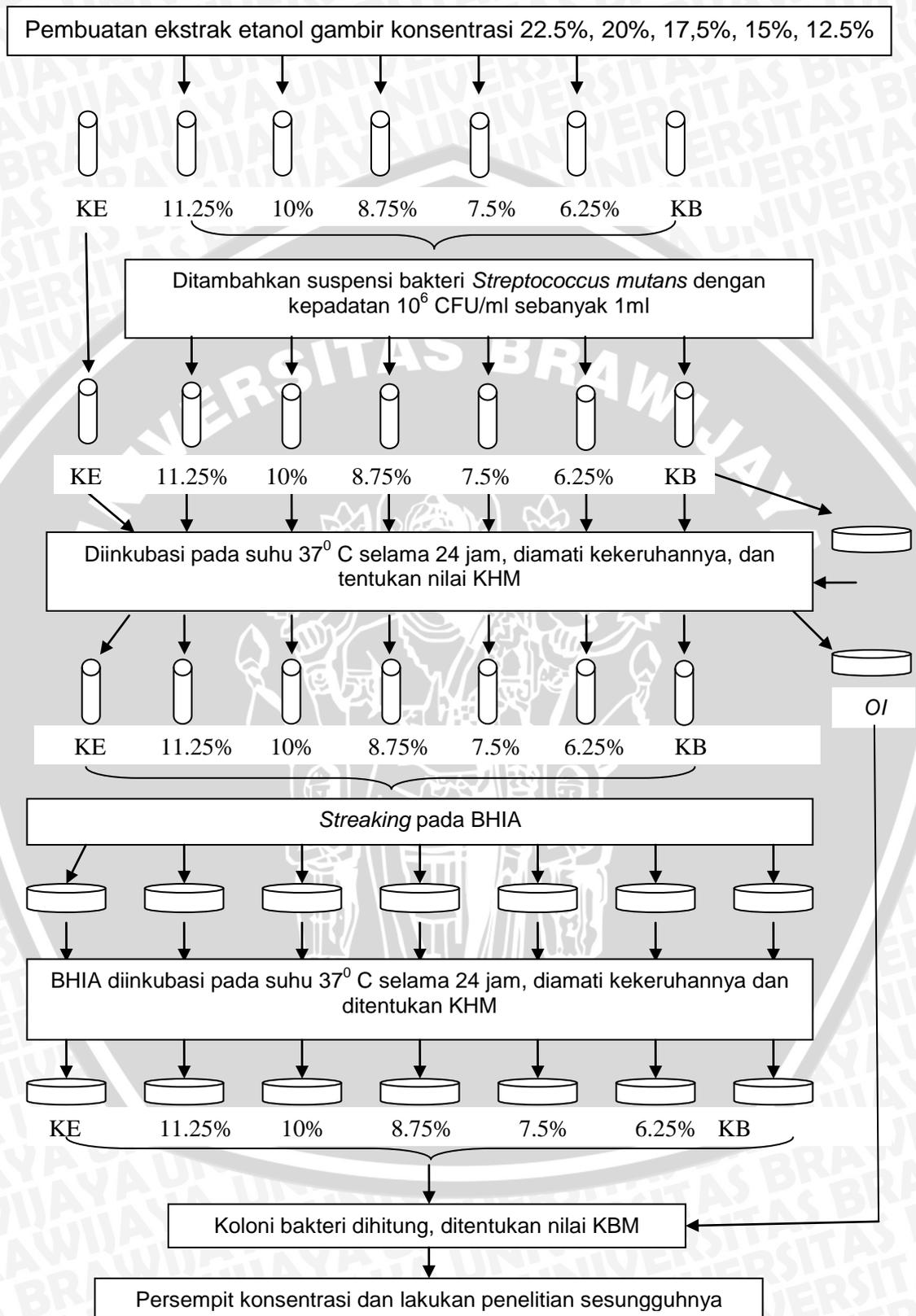
5. Pembenihan cair bakteri dimasukkan pada tabung dengan konsentrasi 22.5%, 20%, 17,5%, 15%, 12.5%, serta pada kontrol bakteri (negatif) masing-masing sebanyak 1 ml sehingga konsentrasi akhir ekstrak etanol gambir adalah 11.25%, 10%, 8.75%, 7.5%, 6.25%, 0% (kontrol negatif), dan 100% (kontrol positif).
6. Kontrol bakteri (0%) digoreskan pada *BHIA* sebagai *original inokulum* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
7. Semua tabung di *vortex* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
8. Pada hari kedua semua tabung dan *BHIA* sebagai *OI* dikeluarkan dari inkubator.
9. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung dengan bantuan tiga garis yang berbeda ketebalannya sebagai latar belakang.
10. *OI* dihitung dengan *colony counter*.
11. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada media *BHIA*. Kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C.
12. Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada *BHIA* atau jumlah koloninya kurang dari 0,1 % jumlah koloni *OI*.

#### 4.9 Analisis dan Pengolahan Data

KHM yang ditandai dengan konsentrasi terendah dimana tidak didapatkan kekeruhan pada tabung (sesuai kontrol bahan).

Penentuan KBM didasarkan pada pertumbuhan jumlah koloni bakteri di *BHIA* yang ditandai dengan konsentrasi terendah di mana koloni bakteri yang tumbuh <0.1% dari *original inoculum*.

Dari data tentang pertumbuhan koloni bakteri pada *BHIA* maka dapat dilakukan analisa pengaruh masing-masing perlakuan yaitu pemberian konsentrasi ekstrak etanol gambir (*Uncaria gambir Roxb*) terhadap pertumbuhan koloni bakteri pada *BHIA*. Untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna antara masing-masing perlakuan maka dilakukan uji *one-way Anova*. Pada penelitian ini digunakan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Jika didapatkan beda varian bermakna ( $p < 0,05$ ), berarti ada perbedaan yang nyata antara masing-masing konsentrasi perlakuan terhadap pertumbuhan koloni bakteri pada *BHIA*. Untuk menunjukkan apakah ada hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) dan jumlah koloni *Streptococcus mutans* yang tumbuh pada *BHIA*, maka dilakukan uji korelasi. Kemudian dilanjutkan dengan uji regresi untuk melihat seberapa besar hubungan tersebut.



Gambar 4.1. Alur Penelitian