

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true eksperimental posttest only control group design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan daya antibakteri antara ekstrak teh hijau dan teh hitam terhadap *Streptococcus mutans* pada berbagai konsentrasi. Metode yang digunakan adalah metode difusi sumuran. Perbedaan daya antibakteri antara ekstrak teh hijau dan teh hitam dapat diketahui dengan membandingkan diameter zona hambatan ekstrak teh hijau dan teh hitam. Kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol, selanjutnya dilakukan observasi dan analisa.

#### 4.2 Sampel

Sampel yang dipergunakan di dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

##### 4.2.1 Estimasi Jumlah Pengulangan

Jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian dihitung dengan rumus estimasi jumlah pengulangan dari Lukito (1998) sebagai berikut:

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan 7 macam perlakuan yaitu 6 macam perlakuan dengan konsentrasi berbeda (3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100%) dan kontrol negatif (0%), maka :

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \approx 4$$

Jadi pada penelitian ini masing-masing perlakuan dilakukan empat kali pengulangan.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan *Streptococcus mutans*, diukur dengan berbagai diameter zona hambatan yang terbentuk dalam milimeter dengan menggunakan kaliper.

#### 4.3.2 Variabel Bebas

Ekstrak teh hijau dan teh hitam masing-masing dengan konsentrasi 0%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100%. Konsentrasi ekstrak tersebut didapatkan dari penelitian pendahuluan.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Agustus 2013 sampai September 2013.

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.5.1 Alat

##### 4.5.1.1 Alat untuk Ekstraksi Teh Hijau dan Teh Hitam

Alat yang digunakan untuk mengekstraksi teh hijau dan teh hitam pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Blender
2. Oven
3. Timbangan analitik
4. Kertas filter
5. *Rotary evaporator*
6. Tabung erlenmayer
7. *Freezer*

##### 4.5.1.2 Alat untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

Alat yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dengan pewarnaan gram pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Gelas Objek
2. Ose
3. Pembakar spiritus
4. Kertas penghisap
5. Mikroskop pembesaran objektif 1000x

## 6. Tabung reaksi

### 4.5.1.3 Alat untuk Tes Katalase

Alat yang digunakan untuk tes katalase pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Gelas Objek
2. Pipet
3. Tabung reaksi

### 4.5.1.4 Alat untuk Tes Optochin

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

1. Ose
2. Inkubator

### 4.5.1.5 Alat untuk Uji Daya Antibakteri Ekstrak Teh Hijau dan Teh Hitam terhadap *Streptococcus mutans*

Alat yang digunakan untuk menguji daya antibakteri ekstrak teh hijau dan teh hitam pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tabung reaksi
2. Cawan petri
3. Ose
4. Mikropipet
5. Pelubang
6. Inkubator

## 7. Jangka sorong

### 4.5.2 Bahan

#### 4.5.2.1 Bahan untuk Ekstraksi Teh Hijau dan Teh Hitam

Bahan yang digunakan untuk mengekstraksi teh hijau dan teh hitam pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Daun teh hijau kering
2. Daun teh hitam kering
3. Aquades steril
4. Etanol 96%

#### 4.5.2.2 Bahan untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

Bahan yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dengan pewarnaan gram pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Isolat *Streptococcus mutans*
2. Pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin)
3. Aquadest

#### 4.5.2.3 Bahan untuk Tes Katalase

Bahan yang digunakan untuk tes katalase pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*
2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%

#### 4.5.2.4 Bahan untuk Tes Optochin

Bahan yang digunakan untuk tes optochin pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. *Chocolate Agar Plate (CAP)*
2. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*
3. *Optochin disk*

#### 4.5.2.5 Bahan untuk Uji Daya Antibakteri Ekstrak Teh Hijau dan Teh Hitam terhadap *Streptococcus mutans*

Bahan yang digunakan untuk menguji daya antibakteri ekstrak teh hijau dan teh hitam terhadap *Streptococcus mutans* pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Hard agar
2. Soft agar
3. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*
4. Ekstrak teh hijau
5. Ekstrak teh hitam
6. Aquades

#### 4.6 Definisi Operasional

1. *Streptococcus mutans* adalah bakteri kokus gram positif anaerob fakultatif, bakteri *Streptococcus mutans* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Standar kepadatan bakteri *Streptococcus mutans* yang digunakan dalam penelitian ini sebesar  $10^6$  CFU/ml.

2. Bakteri *Streptococcus mutans* adalah bakteri yang terlihat berwarna ungu pada pewarnaan gram, tidak menunjukkan adanya gelembung udara pada uji tes katalase dan tidak menunjukkan adanya zona hambatan di sekitar disk tes optochin.
3. Teh hijau dan Teh hitam yang dipakai dalam penelitian ini adalah teh hijau dan teh hitam yang dibeli secara langsung dari PT Perkebunan Nusantara XII, Wonosari, Lawang.
4. Ekstrak teh hijau merupakan teh hijau yang telah diekstrak dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%.
5. Ekstrak teh hitam merupakan teh hitam yang telah diekstrak dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%.
6. Metode maserasi adalah cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisa dalam cairan penyari selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya (Ditjen POM, 2000).
7. Larutan kontrol merupakan larutan kontrol negatif yang berisi aquades (0%).
8. Daya antibakteri adalah besarnya zona hambatan *Streptococcus mutans* yang terbentuk di daerah sekeliling sumuran yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan menggunakan metode difusi sumuran dan diukur menggunakan kaliper dalam satuan mm. Skala ukur rasio.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari pembuatan ekstrak teh hijau dan teh hitam dengan metode maserasi, prosedur identifikasi *Streptococcus mutans*, yaitu pewarnaan gram, tes katalase dan tes optochin, pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*, uji aktivitas antibakteri ekstrak teh hijau dan teh hitam terhadap *Streptococcus mutans*.

##### 4.7.1 Proses Pembuatan Ekstrak Teh Hijau

1. Daun teh hijau kering dihaluskan dengan blender.
2. Ditimbang sebanyak 100 g.
3. Sebanyak 100 g serbuk teh hijau dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer ukuran  $\pm 1$  l.
4. Kemudian rendam dengan etanol 96% sampai volume 900 ml.
5. Lalu tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu kocok sampai benar-benar tercampur ( $\pm 30$  menit) dan disimpan pada suhu kamar selama 24 jam.
6. Setelah 24 jam, campuran disaring dengan kertas filter hingga diperoleh cairan yang bebas dari partikel kasar.
7. Hasil selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak teh hijau dengan alat *rotary evaporator* pada temperatur  $65^{\circ}\text{C}$  hingga semua pelarut terpisah dan didapatkan cairan ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%.
8. Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu  $50-60^{\circ}\text{C}$  selama 5 jam.
9. Kemudian disimpan dalam *freezer*.



#### 4.7.2 Proses Pembuatan Ekstrak Teh Hitam

1. Daun teh hitam kering dihaluskan dengan blender.
2. Ditimbang sebanyak 100 g.
3. Sebanyak 100 g serbuk teh hitam dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer ukuran  $\pm 1$  l.
4. Kemudian rendam dengan etanol 96% sampai volume 900 ml.
5. Lalu tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu kocok sampai benar-benar tercampur ( $\pm 30$  menit) dan disimpan pada suhu kamar selama 24 jam.
6. Setelah 24 jam, campuran disaring dengan kertas filter hingga diperoleh cairan yang bebas dari partikel kasar.
7. Hasil selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak teh hitam dengan alat *rotary evaporator* pada temperatur  $65^{\circ}\text{C}$  hingga semua pelarut terpisah dan didapatkan cairan ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%.
8. Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu  $50-60^{\circ}\text{C}$  selama 5 jam.
9. Kemudian disimpan dalam *freezer*.

#### 4.7.3 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Teh Hijau

Ekstrak teh hijau awal dianggap 100%. Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi 50% sebanyak 10 ml.

$$50\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 = 10 \times 50$$

$$V_1 = 5 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 5 \text{ ml aquades}$$

Dari ekstrak dengan konsentrasi 50% dibuat ekstrak dengan konsentrasi 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125% masing-masing sebanyak 1 ml.

$$25\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 50 = 1 \times 25$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 0,5 \text{ ml aquades}$$

$$12,5\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 50 = 1 \times 12,5$$

$$V_1 = 0,25 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 0,75 \text{ ml aquades}$$

$$6,25\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 50 = 1 \times 6,25$$

$$V_1 = 0,125 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 0,875 \text{ ml aquades}$$

$$3,125\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 50 = 1 \times 3,125$$

$$V_1 = 0,625 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 0,375 \text{ ml aquades}$$

#### 4.7.4 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Teh Hitam

Ekstrak teh hitam awal dianggap 100%. Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi 50% sebanyak 10 ml.

$$50\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 = 10 \times 50$$

$$V_1 = 5 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 5 \text{ ml aquades}$$

Dari ekstrak dengan konsentrasi 50% dibuat ekstrak dengan konsentrasi 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125% masing-masing sebanyak 1 ml.

$$25\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 50 = 1 \times 25$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 0,5 \text{ ml aquades}$$

$$12,5\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 50 = 1 \times 12,5$$

$$V_1 = 0,25 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 0,75 \text{ ml aquades}$$

$$6,25\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 50 = 1 \times 6,25$$

$$V_1 = 0,125 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 0,875 \text{ ml aquades}$$

$$3,125\% \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 50 = 1 \times 3,125$$

$$V_1 = 0,625 \text{ ml (ekstrak 100\%)} + 0,375 \text{ ml aquades}$$

#### 4.7.5 Tes Identifikasi Bakteri

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

##### 4.7.5.1 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
2. Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas objek ditambah sedikit biakan bakteri yang diambil menggunakan ose, selanjutnya

disuspensikan dengan aquades pada gelas objek dan diratakan.

Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.

3. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
4. Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
5. Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
6. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan ditetesi safranin selama  $\frac{1}{2}$  menit. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
8. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
9. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 1000x.
10. Hasil positif: *Streptococcus mutans* tercat ungu (Gram positif).

#### 4.7.5.2 Tes Katalase

1. Sediakan pembenihan cair bakteri pada gelas objek.
2. Kemudian sediaan tersebut ditetesi larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%.
3. Diamati ada tidaknya gelembung udara yang terjadi.
4. Hasil untuk *Streptococcus mutans* adalah katalase negatif (tidak terjadi gelembung udara).

#### 4.7.5.3 Tes Optochin

1. Melakukan streaking pada *Chocolate Agar Plate* (CAP).
2. Letakkan cakram optochin di tengah inkulum dengan penjepit steril.
3. Mengatur posisi cakram dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan disk dalam agar.
4. Inkubasi selama 1 malam pada suhu 37°C dalam inkubator.
5. Mengamati zona hambatan di sekeliling disk. Bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan hasil negatif dengan adanya zona hambatan < 14 mm yang menunjukkan resistensi bakteri di sekeliling cakram optochin.

#### 4.7.6 Persiapan Suspensi Uji *Streptococcus mutans*

1. Dipersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* dari media BHIB yang telah diuji konfirmasi.
2. Suspensi bakteri pada BHIB dispektrofotometri dengan  $\lambda = 625$  sehingga diketahui Optical Density (OD) yang setara dengan  $10^8$  CFU/ml. Kemudian dengan rumus pengenceran  $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$ , kepadatan bakteri tersebut diencerkan 2x dengan NaCl menjadi  $10^6$  CFU/ml (Murray, 1999)

#### 4.7.7 Uji Daya Antibakteri Ekstrak Teh Hijau terhadap

##### *Streptococcus mutans* secara in vitro

1. Menyiapkan medium BHI (Hard Agar dan Soft Agar).
2. Menancapkan alat sumuran berdiameter 6 mm sebanyak 7 buah pada medium Hard Agar.

3. Menambahkan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* sebanyak 0,1 ml lalu diratakan.
4. Menuangkan medium Soft Agar (hangat-hangat kuku), goyang searah jarum jam. dan membiarkan hingga dingin dan memadat.
5. Mengambil alat sumuran, jika medium sudah benar-benar memadat.
6. Memasukkan ekstrak teh hijau konsentrasi 0%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100% ke dalam masing-masing lubang dengan dipipet sebanyak 50 µl.
7. Memasukkan plate ke dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
8. Daya antibakteri yang terjadi ditentukan dengan mengukur diameter zona hambatan pertumbuhan dengan menggunakan jangka sorong.
9. Pengulangan perlakuan sebanyak 4 kali.

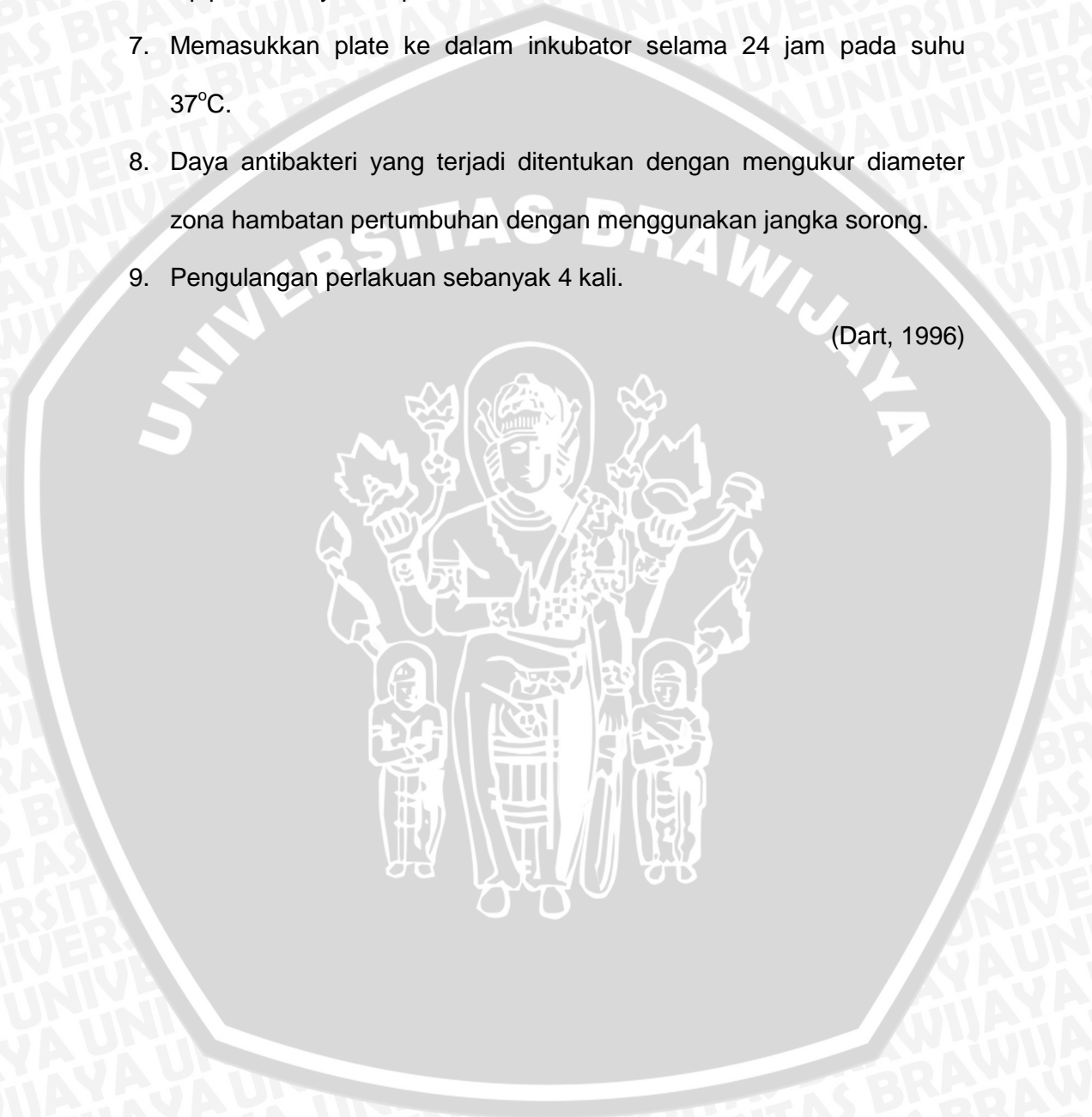
(Dart, 1996)

#### **4.7.8 Uji Daya Antibakteri Ekstrak Teh Hitam terhadap *Streptococcus mutans* secara in vitro**

1. Menyiapkan medium BHI (Hard Agar dan Soft Agar).
2. Menancapkan alat sumuran berdiameter 6 mm sebanyak 7 buah pada medium Hard Agar.
3. Menambahkan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* sebanyak 0,1 ml lalu diratakan.
4. Menuangkan medium Soft Agar (hangat-hangat kuku), goyang searah jarum jam dan membiarkan hingga dingin dan memadat.
5. Mengambil alat sumuran, jika medium sudah benar-benar memadat.

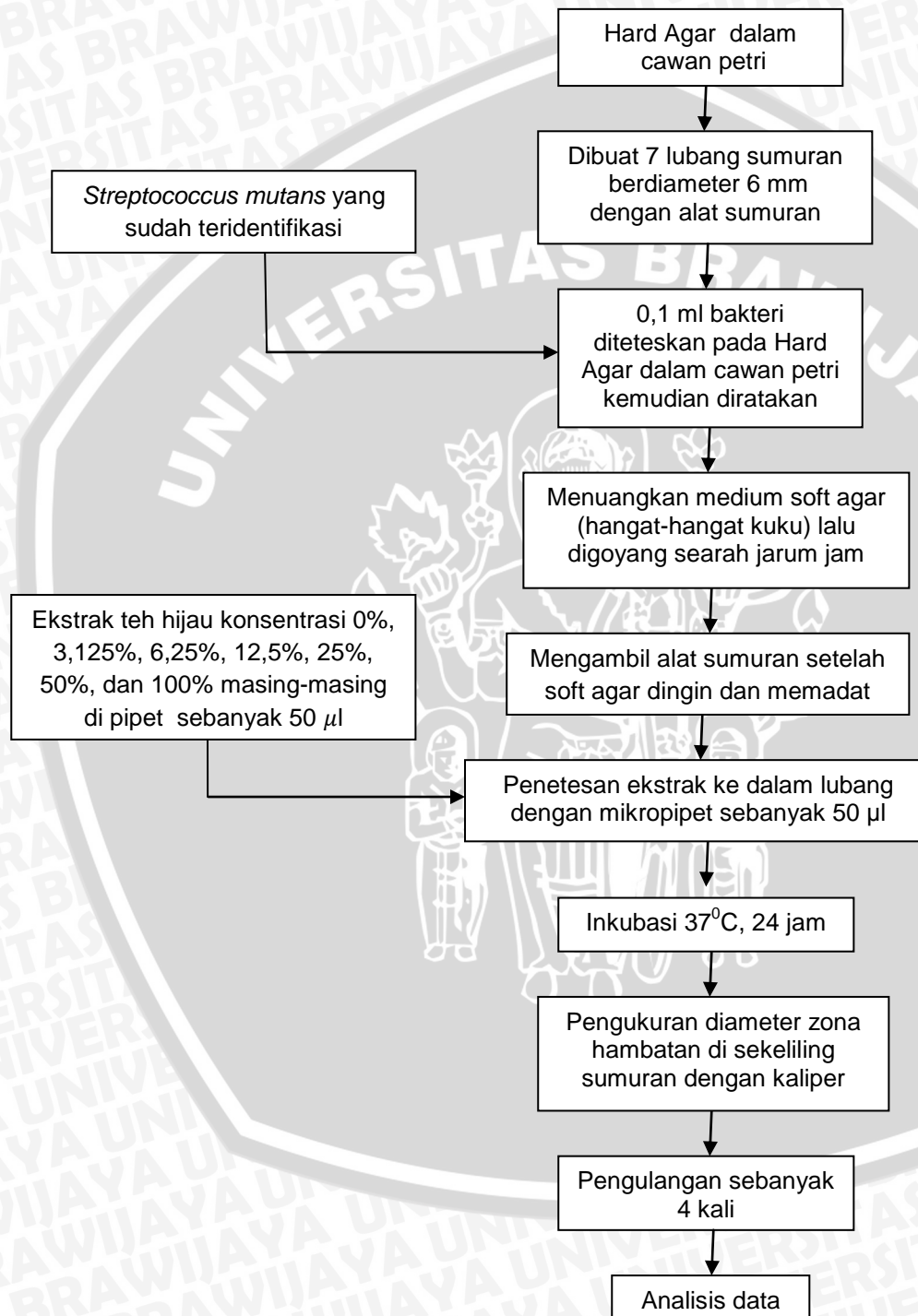
6. Memasukkan ekstrak teh hitam konsentrasi 0%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100% ke dalam masing-masing lubang dengan dipipet sebanyak 50  $\mu$ l.
7. Memasukkan plate ke dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
8. Daya antibakteri yang terjadi ditentukan dengan mengukur diameter zona hambatan pertumbuhan dengan menggunakan jangka sorong.
9. Pengulangan perlakuan sebanyak 4 kali.

(Dart, 1996)



## 4.8 Alur Penelitian

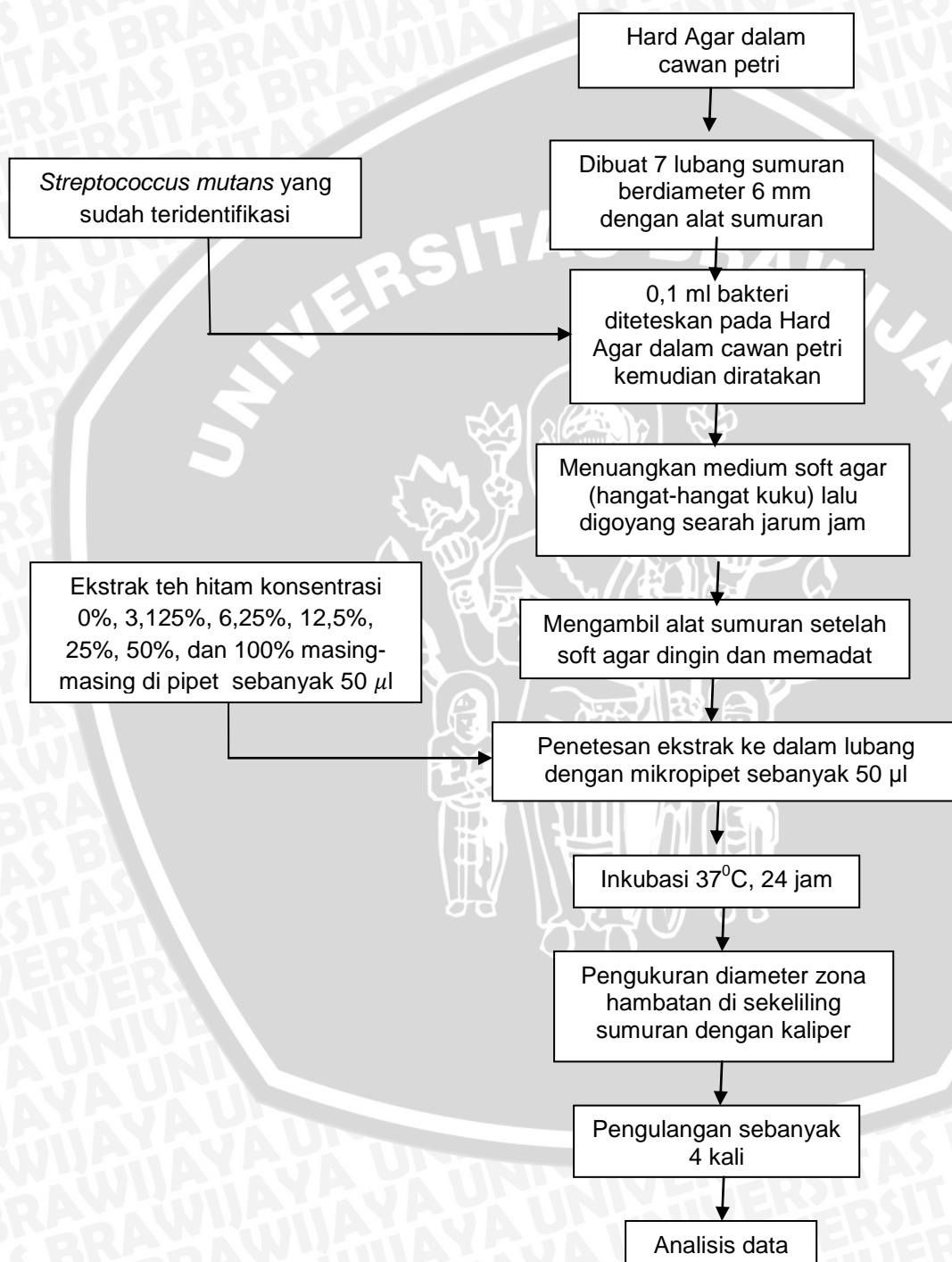
### 4.8.1 Alur Penelitian Ekstrak Teh hijau terhadap *Streptococcus mutans*



Gambar 4.1 Alur Penelitian Daya Antibakteri Ekstrak Teh hijau (Dart, 1996)



#### 4.8.2 Alur Penelitian Ekstrak Teh hitam terhadap *Streptococcus mutans*



Gambar 4.2 Alur Penelitian Daya Antibakteri Ekstrak Teh hitam (Dart, 1996)

#### 4.9 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitas varians data dengan uji *Levene (Levene test homogeneity of variances)*. Apabila data berdistribusi normal dan varians data homogen, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *One-way ANOVA*, uji *Korelasi Pearson*, dan uji *t* tidak berpasangan. Uji statistik *One-way ANOVA* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pemberian berbagai konsentrasi ekstrak teh hijau dan teh hitam terhadap rerata diameter zona hambatan *Streptococcus mutans*. Uji *Korelasi Pearson* untuk mengetahui besarnya hubungan dari pemberian ekstrak teh hijau dan teh hitam terhadap rerata diameter zona hambatan *Streptococcus mutans*, dan uji *t* tidak berpasangan digunakan untuk membandingkan rerata diameter zona hambatan *Streptococcus mutans* antara dua ekstrak (ekstrak teh hijau dan teh hitam) pada masing-masing konsentrasi. Analisis data menggunakan program *SPSS (Statistical Product of Service Solution) for Windows* versi 16.0, pada taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ).