

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian murni (*True Experimental Design*) dengan *Posttest Only Control Group Design*, yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan efektivitas pemberian ekstrak etanol lada hitam dengan ekstrak etanol lada putih pada bakteri *Streptococcus mutans*. Konsentrasi masing-masing ekstrak adalah 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 0% dengan metode difusi sumuran.

4.2 Sampel Penelitian

Bahan yang diuji adalah lada hitam dan lada putih yang didapat dari Materia Medika. Bakteri *Streptococcus mutans* diperoleh dari biakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sampel penelitian ini diambil dengan teknik *random sampling*.

Sampel pada penelitian ini adalah jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans* yang berasal dari jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Lukito sebagai berikut :

$$p(n-1) \geq 15 \text{ (Lukito, 1998)}$$

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \approx 3$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Jadi, jumlah pengulangan yang dilakukan pada tiap perlakuan yaitu masing-masing 3 kali.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Ekstrak etanol lada hitam dan ekstrak etanol lada putih dengan konsentrasi masing-masing 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 0%.

4.3.2 Variabel Terikat

Pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang diukur dengan zona hambat yang terbentuk dalam milimeter dengan menggunakan kaliper.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan November 2013-Februari 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

4.5.1.1 Bahan Pewarnaan Gram

1. Isolat *Streptococcus mutans*
2. Pewarna gram (kristal violet, lugol, etanol 96%, safranin)

4.5.1.2 Bahan Tes Katalase

1. Perbenihan cair

2. H₂O₂ 3%

4.5.1.3 Bahan Tes *Optochin*

1. *Chocolate Agar Plate* (CAP)
2. *Optochin disk*
3. Suspensi bakteri
4. *Blood Agar Plate*

4.5.1.4 Bahan Pembuatan Ekstrak Etanol Lada

1. Lada hitam
2. Lada putih
3. Etanol 96%

4.5.1.5 Bahan Tes Difusi Sumuran

1. Nutrient Agar
2. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*
3. Ekstrak etanol lada hitam dengan 6 konsentrasi yang berbeda
4. Ekstrak etanol lada putih dengan 6 konsentrasi yang berbeda
5. Aquadest

4.5.2 Alat Penelitian

4.5.2.1 Alat Untuk Pewarnaan Gram

1. Ose lurus
2. Gelas objek
3. Mikroskop
4. Tabung reaksi
5. Bunsen brander

4.5.2.2 Alat untuk Tes Katalase

1. Pipet

2. Tabung reaksi

4.5.2.3 Alat untuk Tes *Optochin*

1. Ose
2. Inkubator

4.5.2.4 Alat untuk Membuat Ekstrak Etanol Lada

1. Blender
2. Oven
3. Timbangan analitik
4. Saringan
5. Seperangkat alat evaporasi vakum
 - a. *Rotary evaporator*
 - b. Pompa vakum
 - c. Tabung erlenmayer
 - d. Bak penampung air dingin
 - e. Alat pemanas aquades (*water bath*)
 - f. Pipa plastik

4.5.2.5 Alat untuk Tes Difusi Sumuran

1. Tabung reaksi
2. Mikropipet
3. Cawan petri
4. Pelubang
5. Bunsen brander
6. Inkubator
7. Kaliper

4.6 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel Bebas:					
- Ekstrak etanol lada hitam 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 0%	- Ekstrak lada hitam adalah lada hitam yang didapat dari Materia Medika, diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.	- Aquadest	- Penambahan aquadest	- %	- Kuantitatif (Rasio)
- Ekstrak etanol lada putih 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 0%	- Ekstrak lada putih adalah lada putih yang didapat dari Materia Medika, diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.	- Aquadest	- Penambahan aquadest	- %	- Kuantitatif (Rasio)
Variabel Terikat:					
- Pertumbuhan <i>Streptococcus mutans</i>	- <i>S. mutans</i> didapat dari biakan di Lab. Mikro FKUB, pertumbuhannya diukur dari zona hambat yang terbentuk.	- Kaliper	- Mengukur diameter zona hambat di sekeliling sumuran	- mm (mili meter)	- Kuantitatif (Rasio)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Identifikasi Bakteri

4.7.1.1 Pewarnaan Gram (Baron et al, 1986)

Pada hari pertama, sampel *Streptococcus mutans* diidentifikasi dengan pewarnaan gram. Kemudian beberapa ose ditanam pada BHI agar lalu diinkubasi semalam dengan suhu 37°C.

Prosedur pewarnaan gram :

1. Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas objek, kemudian diambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan aquades yang telah diletakkan di atas gelas objek. Kemudian dibiarkan kering di udara.
2. Suspensi bakteri yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkan di atas api beberapa kali dan sediaan siap untuk diwarnai.
3. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan tunggu selama 1 menit, kemudian kristal violet segera dibuang dan dibilas dengan air.
4. Sediaan dituangi lugol selama 1 menit.
5. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
6. Sediaan ditetesi etanol 96% selama 5-10 detik.
7. Sisa etanol dibuang dan dibilas dengan air.
8. Sediaan dituangi safranin selama 0,5 menit.
9. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
10. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali.

4.7.1.2 Tes Katalase

Tes ini digunakan untuk membedakan *Streptococcus* dengan *Staphylococcus*.

1. Mengambil sebagian perbenihan cair pada tabung.
2. Menetesi dengan 1 ml larutan H₂O₂ 3%.
3. Bila gelembung tidak timbul, maka koloni bakteri dalam tabung reaksi bersifat katalase negatif (bakteri *Streptococcus*).

4.7.1.3 Tes *Optochin*

Tes ini digunakan untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Streptococcus pneumoniae*.

1. Melakukan *streaking* pada CAP.
2. Meletakkan optochin disk di tengah inokulum dengan penjepit steril.
3. Mengatur posisi disk dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan disk dalam agar.
4. Menginkubasi selama 1 malam pada suhu 37°C dalam inkubator.
5. Mengamati zona hambatan di sekeliling disk. Bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan hasil negatif dengan tidak adanya zona hambat.

4.7.2 Pembuatan Sediaan Ekstrak Etanol Lada

4.7.2.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Lada Hitam

1. Lada hitam kering dihaluskan dengan blender.
2. Lada hitam kering ditimbang dan diambil sebanyak 100 g.
3. Lada hitam kering dimasukkan dalam tabung erlenmeyer.
4. Kemudian ditambahkan ±900 ml etanol 96%.

5. Tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu kocok sampai homogen. Pengocokan dilakukan 1-2 jam, lalu diamkan satu malam.
6. Tabung erlenmeyer disimpan pada suhu kamar selama 24 jam.
7. Setelah 24 jam, campuran disaring dengan kertas filter hingga diperoleh cairan yang bebas dari partikel kasar.
8. Selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol menggunakan alat rotary evaporator pada temperatur 65° C (sesuai titik didih etanol) hingga semua pelarut terpisah dan didapatkan cairan ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%.
9. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak etanol lada hitam konsentrasi 100%.

4.7.2.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Lada Putih

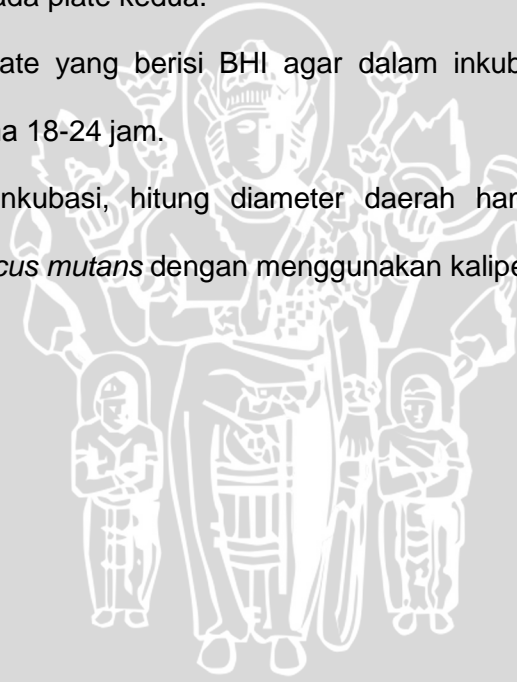
1. Lada putih kering dihaluskan dengan blender.
2. Lada putih kering ditimbang dan diambil sebanyak 100 g.
3. Lada putih kering dimasukkan dalam tabung erlenmeyer.
4. Kemudian ditambahkan ±900 ml etanol 96%.
5. Tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu kocok sampai homogen. Pengocokan dilakukan 1-2 jam, lalu diamkan satu malam.
6. Tabung erlenmeyer disimpan pada suhu kamar selama 24 jam.
7. Setelah 24 jam, campuran disaring dengan kertas filter hingga diperoleh cairan yang bebas dari partikel kasar.
8. Selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol menggunakan alat rotary evaporator pada temperatur 65° C (sesuai titik didih etanol) hingga semua pelarut terpisah dan didapatkan cairan ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%.

9. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak etanol lada putih konsentrasi 100%.

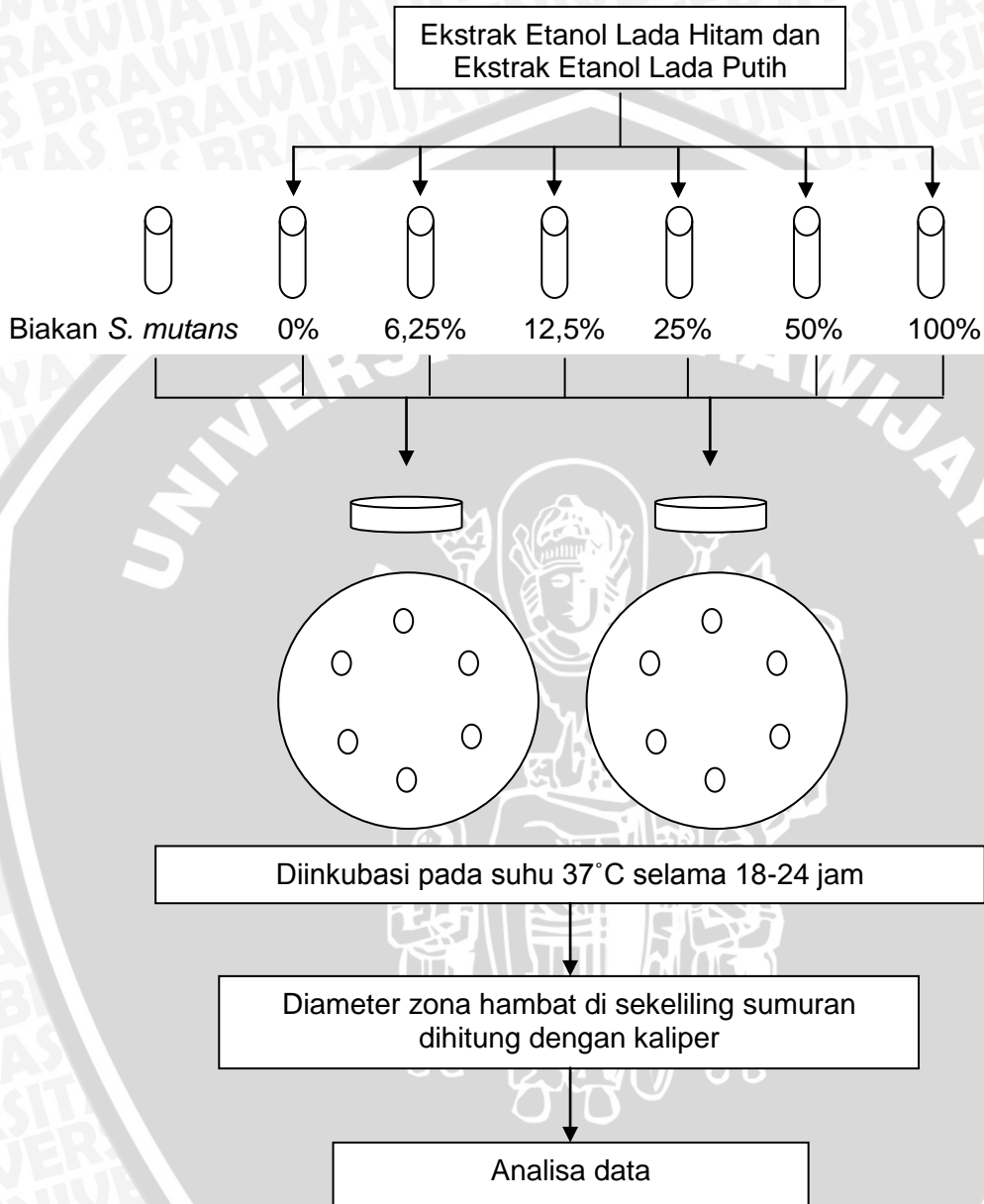
4.7.3 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak etanol lada terhadap *Streptococcus mutans*

1. Siapkan BHI agar yang dibuat dari 28 gram nutrient agar dan 1L air suling. Medium dilarutkan dan diautoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Tambahkan 10 µl kultur bakteri yang diambil dari BHI broth, lalu tuangkan ke dalam plate dan didinginkan hingga suhu mencapai 45° C.
2. Melakukan pengenceran seri ekstrak etanol lada hitam. Tabung 1 diisi ekstrak etanol lada hitam 100% 5 ml. Tabung 2 diisi ekstrak etanol lada hitam 100% 5 ml ditambah 5 ml aquadest steril. Tabung 3 diisi ekstrak etanol lada hitam 50% 5 ml ditambah 5 ml quadest steril. Tabung 4 diisi ekstrak etanol lada hitam 25% 5 ml ditambah 5 ml aquadest steril. Tabung 5 diisi ekstrak etanol lada hitam 12,5% 5 ml ditambah 5 ml aquadest steril. Tabung 6 diisi aquadest 5 m.
3. Melakukan pengenceran seri ekstrak etanol lada putih. Tabung 1 diisi ekstrak etanol lada putih 100% 5 ml. Tabung 2 diisi ekstrak etanol lada putih 100% 5 ml ditambah 5 ml aquadest steril. Tabung 3 diisi ekstrak etanol lada putih 50% 5 ml ditambah 5 ml quadest steril. Tabung 4 diisi ekstrak etanol lada putih 25% 5 ml ditambah 5 ml aquadest steril. Tabung 5 diisi ekstrak etanol lada putih 12,5% 5 ml ditambah 5 ml aquadest steril. Tabung 6 diisi aquadest 5 ml.

4. Dibuat lubang sumuran dengan perforator berdiameter 6 mm sebanyak 6 buah pada tempat yang telah ditentukan pada masing-masing plate yang berisi BHI agar dan bakteri.
5. Teteskan ekstrak etanol lada hitam dengan 6 konsentrasi berbeda dengan mikropipet sebanyak 10 μ l ke dalam masing-masing lubang sumuran pada plate pertama.
6. Teteskan ekstrak etanol lada putih dengan 6 konsentrasi berbeda dengan mikropipet sebanyak 10 μ l ke dalam masing-masing lubang sumuran pada plate kedua.
7. Inkubasi plate yang berisi BHI agar dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.
8. Setelah diinkubasi, hitung diameter daerah hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* dengan menggunakan kaliper.



4.7.4 Kerangka Operasional



4.8 Analisis Data

Dari data yang diperoleh, maka dapat dibuat analisa statistiknya. Masing-masing perlakuan dilakukan uji *Anova One Way* . Pada penelitian ini digunakan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Untuk menunjukkan apakah ada hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak dan jumlah koloni *Streptococcus mutans* yang tumbuh pada BHI agar, maka dilakukan uji korelasi. Kemudian dilanjutkan dengan uji regresi untuk melihat seberapa besar hubungan tersebut. Jika data tidak normal dan varian tidak homogen maka digunakan uji non parametrik *Kruskal Wallis*. Untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok perlakuan ekstrak etanol lada hitam dengan ekstrak etanol lada putih maka dilakukan uji komparasi menggunakan uji T tidak berpasangan.

