

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris (*true experiment-post control design only*) yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* sebagai antimikroba dengan menggunakan metode *tube dilution test* dengan media tumbuh *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dan dilanjutkan dengan penggoresan (*streaking*) pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA).

4.2 Sampel dan Pengulangan

Sampel penelitian ini adalah jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari stok Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah pengulangan dapat diketahui dengan menggunakan rumus Loekito (1998) sebagai berikut:

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

$$n = 4$$

Keterangan:

n = Jumlah Pengulangan (3 kali pengulangan)

p = Jumlah perlakuan (5, yaitu konsentrasi 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,06%)

Jadi pada penelitian ini, setiap perlakuan dilakukan 4 kali pengulangan

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,06%.

4.3.2 Variabel Terikat

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

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini dimulai dari bulan September-Desember 2013.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Untuk Ekstraksi Kulit Buah Manggis

- Kulit Buah Manggis 100 gram
- Gelas ukur
- Penggiling (*Blender*)
- Labu penampung hasil evaporasi
- Tabung ekstraksi
- Tabung pendingin
- *Rotary evaporator*
- Pompa sirkulasi air dingin
- Penimbang
- Bak penampung air dingin
- Pelarut etanol 96%
- Pipa plastik
- Kertas saring
- Pompa vakum
- *Shaker* (pengaduk)
- Penampung hasil penguapan
- Alat pemanas air

- Oven
- Labu penampung hasil ekstraksi

4.5.2 Untuk Identifikasi Bakteri

- Isolat bakteri
- *Blood Agar Plate* (BAP)
- Kertas
- Optochin disk
- Bahan pewarnaan gram (Kristal, violet, Lugol, Alkohol)
- *Object glass*, minyak emersi, ose, mikroskop

4.5.3 Untuk Dilusi Tabung

- 7 Tabung reaksi
- Pipet steril
- Inkubator
- Aquades
- Vortex
- BHIB
- Ekstrak etanol kulit buah manggis
- Perbenihan cair bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/ml

4.5.4 Untuk *Streaking Plate*

- Ose
- Bunsen
- Vortex
- *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA)

4.6 Definisi Operasional

- Kulit Buah Manggis dalam penelitian ini adalah kulit buah yang berwarna ungu-kemerahan yang didapat dari Materia Medika kota Batu.
- Ekstrak kulit buah manggis adalah ekstrak yang diperoleh dari kulit buah manggis yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan setelah itu direndam dalam etanol 96%, diaduk, dilakukan ekstraksi dingin (maserasi) dengan menggunakan ethanol 96%.
- *Streptococcus mutans* adalah bakteri yang terlihat berwarna ungu pada pewarnaan gram, tidak menunjukkan adanya gelembung pada uji katalase, dan tidak menunjukkan adanya zona hambatan disekitar disk pada tes *optochin*. Sediaan bakteri *Streptococcus mutans* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan sudah dikonfirmasi.
- Standar kepadatan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 10^6 bakteri/ml.
- Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak kulit buah manggis yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. KHM didapatkan dengan mengamati dan membandingkan kekeruhan atau pertumbuhan bakteri dengan kontrol menggunakan media.
- Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak kulit buah manggis yang mampu membunuh bakteri *Streptococcus mutans*, ditandai dengan tidak terdapatnya pertumbuhan koloni bakteri atau kurang dari 0,1% *Original Inoculum* pada media *Brain*

Heart Infusion Agar (BHIA) setelah dilakukan *streaking* dengan satu ose larutan ekstrak kulit buah manggis yang tidak menunjukkan kekeruhan.

- Kontrol Kuman (kontrol positif) adalah tabung uji dengan konsentrasi 0% larutan ekstrak kulit buah manggis, yaitu tabung uji ini sepenuhnya hanya terisi larutan kuman.
- Kontrol Bahan (kontrol negatif) adalah tabung dengan konsentrasi 100% larutan ekstrak kulit buah manggis.
- Original inoculum adalah koloni asli/murni bakteri *Streptococcus mutans* yang dibiakkan di medium pertumbuhan *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) sebelum di inkubasi dan digunakan untuk mencari nilai KBM.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Penyiapan Ekstrak Kulit Buah Manggis

4.7.1.1 Proses Ekstraksi

- Kulit manggis yang terpilih (bersih dan tidak busuk) berwarna merah, merah-keunguan atau keunguan diiris tipis lalu dikeringkan di bawah sinar matahari.
- Kulit buah manggis yang telah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan *blender*.
- Setelah halus ditimbang sampai mencapai 100 gram lalu dibungkus menggunakan kertas saring. Kertas saring yang berisi serbuk kulit buah manggis dimasukkan ke dalam tabung ekstraksi.
- Tuang tabung etanol 96% ke dalam tabung ekstraksi sebanyak 900 ml sehingga serbuk kulit manggis terendam etanol 96%, supaya etanol

96% tercampur rata dalam bubuk ekstrak, lalu larutan kulit manggis diaduk selama 15 menit.

- Diamkan larutan tersebut selama ± 12 jam. Keluarkan etanol yang telah berisi zat aktif, kemudian diganti dengan etanol yang baru.
- Aduk selama 15 menit dan diamkan selama 12 jam. Ulangi langkah tersebut beberapa kali sampai air ekstrak jernih. Lalu hasil ekstraksi dievaporasi.

4.7.1.2 Proses Evaporasi

- *Evaporator* dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan $30-40^\circ$ terhadap meja percobaan dengan susunan dari bawah ke atas, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin (dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin, pompa vakum, dan penampung hasil penguapan).
- Hasil ekstraksi dipindahkan ke labu penampung sedangkan *rotary evaporator*, alat pompa air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.
- Alat pemanas aquades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam labu penampung hasil evaporasi mendidih dengan suhu 80°C (sesuai titik didih etanol) dan etanol mulai menguap.
- Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur dengan hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.
- Evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah kental, evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil.

- Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven selama 2 jam pada suhu 80°C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstrak 100%.

4.7.2 Tes Identifikasi Bakteri

Untuk membuktikan bahwa koloni yang tumbuh adalah bakteri *Streptococcus mutans* maka dilakukan serangkaian tes untuk mengidentifikasi bakteri *Streptococcus mutans* antara lain adalah tes pewarnaan gram untuk menentukan bakteri tersebut termasuk bakteri gram positif ataupun bakteri gram negatif, tes katalase untuk membedakan *Streptococcus* dengan *Staphylococcus*, dan tes *optochin* untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Streptococcus pneumoniae*.

4.7.2.1 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

Tujuan dari tes ini adalah untuk menentukan bakteri tersebut termasuk bakteri gram positif atau gram negatif.

- Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan biarkan dingin.
- 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.
- Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
- Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit, sisa kristal violet dibuang dibilas dengan air.

- Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi seranin selama ½ menit. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
- Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 400x.
- Hasil dikatakan positif apabila *Streptococcus mutans* tercat ungu (gram positif).

4.7.2.2 Tes Katalase

Tujuan dari tes ini adalah untuk membedakan *Streptococcus* dengan *Staphylococcus*.

- Sediakan pembersihan cair bakteri pada gelas objek.
- Kemudian sediaan tersebut ditetesi larutan H₂O₂ 3%.
- diamati ada tidaknya gelembung udara yang terjadi.
- Hasil untuk *Streptococcus mutans* adalah tidak ada gelembung (tes katalase negatif).

4.7.2.3 Tes Optochin

Tujuan dari tes ini adalah untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Streptococcus pneumoniae*.

- Membagi *Blood Agar Plate* (BAP) menjadi empat kuadran.
- Melakukan streaking 1 atau 1 ½ kuadran pada BAP.

- Letakkan *Optochin disk* di tengah inokulum dengan penjepit steril. Mengatur posisi disk dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan disk dalam agar.
- Inkubasi selama 1 malam pada suhu 37°C dalam inkubator.
- 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 *Streptococcus mutans*.

4.7.3 Persiapan Suspensi Bakteri

- Dipersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* dari media BHI yang telah diuji konfirmasi.
- Diambil 5 koloni ($d \geq 1$ mm) dengan ose 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. Dari hasil yang diperoleh, dibuat suspensi sel yang mengandung 1×10^8 hingga 5×10^8 CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$ (Murray *et al.*, 1999).
- Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^6$ 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 sel dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml. Proses dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^6$ CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

4.7.4 Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap *Streptococcus mutans*

Menyediakan 7 tabung steril, 5 tabung sebagai uji antimikroba dan 1 tabung sebagai kontrol kuman dan 1 kontrol bahan.

Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi $0,5 \times 10^6$ CFU/ml. Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung konsentrasi yang akan dibuat, masing-masing sebanyak 1 ml. Pembuatan konsentrasi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana*) didapatkan dari hasil pengenceran seri yaitu dengan cara perbandingan antara volume ekstrak kulit buah manggis dengan aquades. Pengenceran seri:

- Tabung 1 : diisi bahan uji, yaitu ekstrak etanol kulit buah manggis dengan konsentrasi 1% yang didapat dari 0,01 ml ekstrak ditambahkan 0,99 ml aquades.
- Tabung 2 : diisi bahan uji, yaitu ekstrak etanol kulit buah manggis dengan konsentrasi 0,5% yang didapat dari 0,005 ml ekstrak ditambahkan 0,995 ml aquades
- Tabung 3 : diisi bahan uji, yaitu ekstrak etanol kulit buah manggis dengan konsentrasi 0,25% yang didapat dari 0,0025 ml ekstrak ditambahkan 0,9975 ml aquades
- Tabung 4 : diisi bahan uji, yaitu ekstrak etanol kulit buah manggis dengan konsentrasi 0,125% yang didapat dari 0,00125 ml ekstrak ditambahkan 0,99875 ml aquades
- Tabung 5 : diisi bahan uji, yaitu ekstrak etanol kulit buah manggis dengan konsentrasi 0,06% yang didapat dari 0,0006 ml ekstrak ditambahkan 0,9994 ml aquades

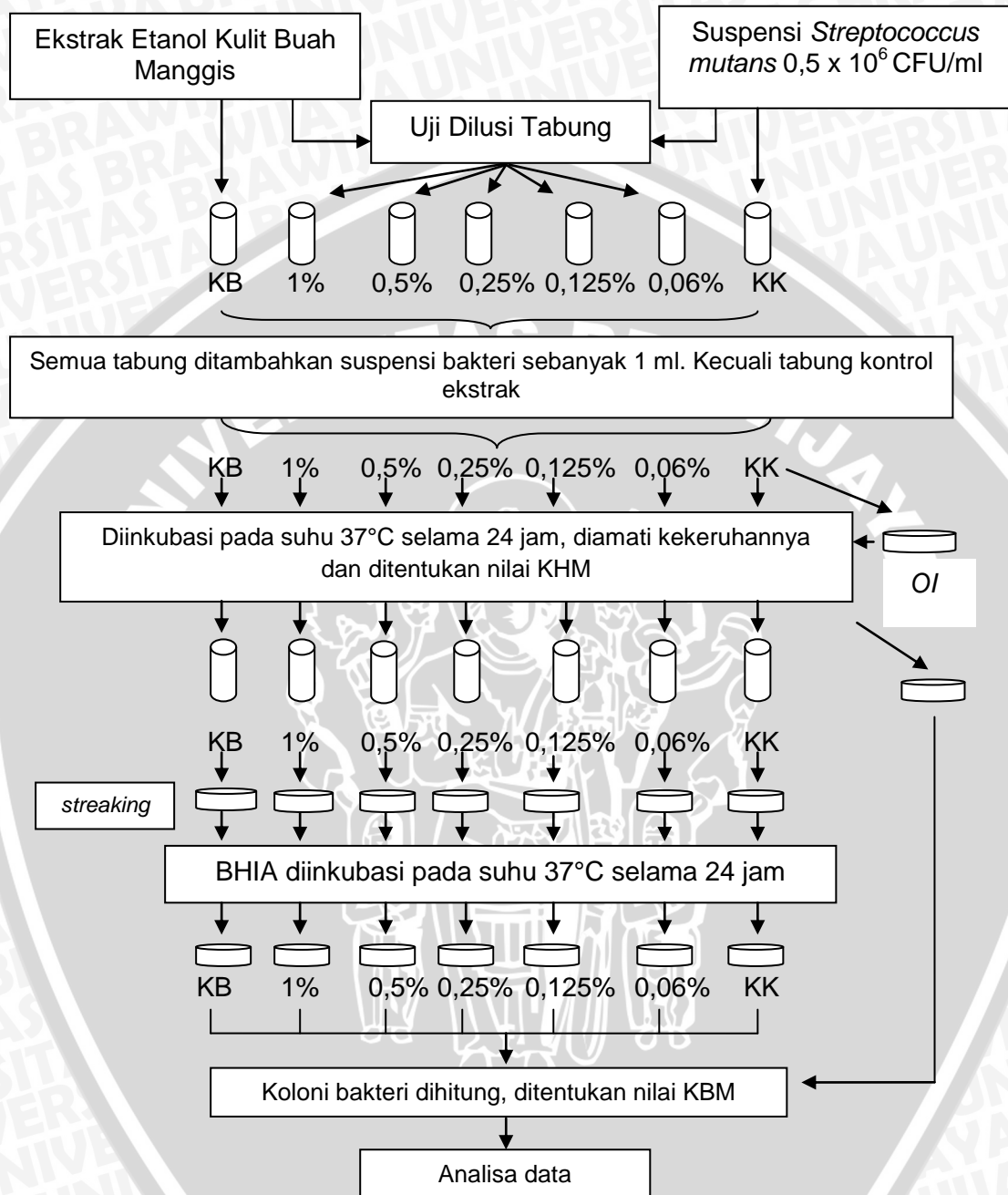
- Tabung 6 : diisi bakteri *Streptococcus mutans* ditambahkan aquades (kontrol kuman).
- Tabung 7 : diisi ekstrak etanol kulit buah manggis dengan konsentrasi 100% sebanyak 1 ml (kontrol bahan).

Kontrol bakteri (0%) digoreskan pada media BHIA sebanyak 1 ose sebagai *Original Inoculum*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Masing-masing tabung di-*vortex* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung dibantu dengan latar belakang berupa 5 garis hitam yang berbeda ketebalannya. Selanjutnya dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose, lalu diinokulasikan pada media BHIA. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pada hari ketiga, data KBM didapatkan dan pada masing-masing konsentrasi dilakukan pengamatan kuantitatif dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dengan tidak adanya jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media BHIA atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di *Original Inoculum*.

Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

Keterangan : KB: Kontrol Bahan, KK: Kontrol Kuman, Oi: Original Inoculum, BHIA: Brain Heart Infusion Agar

4.8 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi normalitas dan homogenitas varian menggunakan kolmogorov smirnov. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one way* ANOVA. Uji statistik *one way* ANOVA dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol kulit buah manggis terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*).

