

## **BAB IV**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *true experiment* dengan menggunakan metode dilusi tabung. Desain penelitian yang digunakan adalah *post test only control* yang merupakan desain penelitian yang tidak menggunakan ukuran yang diperoleh dari *pretest* untuk menetapkan sebuah patokan. Desain penelitian ini terdiri dari dua kelompok yaitu kelompok yang diberi perlakuan dan kelompok kontrol. Kedua kelompok tersebut, kelompok yang diberi perlakuan dan kelompok kontrol, dianggap terdistribusi secara merata (Marczyk et al., 2005).

#### **4.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang dilaksanakan dari bulan September 2013 sampai April 2014.

#### **4.3 Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Besar sampel yang diperlukan dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,1 \quad \approx 4 \quad (\text{Notobroto, 2005})$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan (7 perlakuan, yaitu 6 konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis, dan 1 kontrol bakteri)

n = jumlah pengulangan (4 kali pengulangan)

#### **4.4 Variabel Penelitian**

##### **4.4.1 Variabel Bebas**

Minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% dan 1,5625%. Konsentrasi tersebut didapatkan dengan metode pengenceran berseri.

##### **4.4.2 Variabel Tergantung**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang diobservasi dengan melihat tingkat kekeruhan pada media Brain Heart Infusion Broth sebagai parameter untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan jumlah koloni *Streptococcus mutans* yang tumbuh pada media Brain Heart Infusion Agar (BHIA) yang merupakan parameter untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari minyak atsiri kulit jeruk nipis.

#### 4.5 Definisi Operasional

- Minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) adalah minyak atsiri diambil dari kulit buah *C. aurantifolia* (Jeruk nipis) yang diperoleh dari Pasar Bunul Malang didestilasi dengan pelarut natrium sulfat anhidrat.
- *Streptococcus mutans* adalah bakteri yang terlihat berwarna ungu pada pewarnaan gram, pada tes katalase tidak menunjukkan adanya gelembung udara, dan pada tes *optochin* tidak menunjukkan adanya zona hambatan.
- KHM (kadar hambat minimum) atau MIC (*minimum inhibitory concentration*) adalah konsentrasi terendah dari minyak atsiri kulit jeruk nipis yang dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*. KHM didapatkan dengan metode pengenceran secara seri.
- KBM (kadar bunuh minimum) atau MBC (*minimum bactericidal concentration*) adalah konsentrasi terendah minyak atsiri kulit jeruk nipis yang mampu membunuh bakteri uji (*Streptococcus mutans*). KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri atau kurang dari 0,1% *Original Inoculum* (OI).
- Original Inoculum (OI) adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum inkubasi. Digunakan untuk mencari KBM setelah diinokulasikan 18-24 jam yang dibandingkan dengan bahan kontrol negatif.

#### 4.6 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk melakukan destilasi minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) :

- kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) kering
- penggiling
- alat destilasi Stahl
- timbangan analisis
- gelas ukur
- aquadest
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk identifikasi bakteri :

- isolat bakteri
- bahan pewarnaan gram (Kristal Violet, Lugol, Alkohol, dan Safranin)
- BHIA
- BAP
- *object glass*
- minyak emersi
- mikroskop

Alat dan bahan yang digunakan dalam metode dilusi tabung :

- tabung reaksi dengan label konsentrasi
- tabung reaksi untuk kontrol bakteri dan ekstrak
- pipet steril
- inkubator
- hasil ekstraksi

- perbenihan cair bakteri dengan kepadatan  $10^6$  CFU/ml
- aquades
- vortex

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk *streaking plate* :

- BHIA
- Ose
- Bunsen
- vortex

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan bahan cair bakteri dengan kepadatan  $10^6$  CFU/ml :

- tabung reaksi
- MH Broth
- pipet steril
- larutan NaCl
- vortex
- spektrofotometer.

#### **4.7 Prosedur Penelitian**

##### **4.7.1 Pembuatan Minyak Atsiri Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)**

Kulit buah *C. aurantifolia* (Jeruk nipis) sebanyak 1 kg disiapkan dalam keadaan segar, dibersihkan, dan dipotong-potong kemudian dimasukkan dalam labu distilasi. Aquades ditambahkan ke dalam labu distilasi sampai bahan terendam. Aquades berfungsi sebagai penyalur energi panas ke seluruh bagian bahan tanaman sehingga minyak atsiri dapat terkondensasi bersama uap air. Mantel pemanas dinyalakan dan distilasi dilakukan selama 7 jam yang dihitung

setelah distilat pertama turun. Minyak atsiri hasil distilasi dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer. Natrium sulfat anhidrat ditambahkan ke dalam erlenmeyer untuk menyerap aquades yang masih terdapat dalam minyak atsiri kemudian didekantasi. Hasil yang didapat berupa minyak atsiri bebas air.

#### **4.7.2 Identifikasi Bakteri**

Langkah-langkah yang dilakukan dalam pewarnaan gram untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif adalah pewarnaan gram, tes katalase, dan tes optochin. Pada tes pewarnaan gram yang dilakukan adalah :

- Satu ose akuades steril diteteskan pada gelas objek, lalu diambil sedikit bakteri untuk disuspensi dengan aquades yang telah diletakkan di atas gelas objek, lalu dibiarkan kering di udara.
- Suspensi bakteri yang sudah kering difiksasi dengan cara melewatkannya beberapa kali di atas api. Sediaan siap untuk diwarnai.
- Kristal violet diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama satu menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- Lugol diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama satu menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- Alkohol 96% diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 5-10 detik. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- Safranin diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.

- Sediaan dilihat di bawah mikroskop.
- Hasil positif : *Streptococcus mutans* berwarna ungu (Gram positif).

Pada tes katalase yang dilakukan adalah :

- Gelas objek dibersihkan dengan kapas, lalu dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak, kemudian dibiarkan dingin.
- Membuat sediaan pembedihan cair bakteri pada gelas objek.
- Sediaan ditetesi larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%.
- Mengamati ada tidaknya gelembung udara yang terjadi.
- Hasil tes katalase untuk *Streptococcus mutans* adalah negatif (tidak ada gelembung udara)

Pada tes optochin yang dilakukan adalah :

- Membagi *Chocolate Agar Plate* (CAP) atau *Blood Agar Plate* (BAP) menjadi empat kuadran.
- Melakukan streaking 1 atau 1½ kuadran pada CAP atau BAP.
- *Optochin disk* diletakkan di tengah inokulum dengan penjepit.
- Posisi *disk* diatur dengan menekan *disk* secara perlahan pada permukaan agar, tetapi *disk* tidak dibenamkan dalam agar.
- Diinkubasi dalam inkubator selama satu malam pada suhu 37°C.
- Mengamati zona hambatan pada sekeliling *disk*.
- Jika terdapat zona ≤14 mm yang mengelilingi disk dengan diameter 6 mm dan zona ≤16 mm yang mengelilingi disk dengan diameter 10mm, hasil tes adalah negatif dan diidentifikasi sebagai *Streptococcus mutans*.

#### 4.7.3 Persiapan Suspensi Bakteri Uji

Pada persiapan suspensi bakteri atau dibuat seperti diatas uji yang harus dilakukan adalah :

- 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  $1 \times 10^8$  hingga  $5 \times 10^8$  CFU/ml dengan rumus  $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$  (Murray et al, 1999).

Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung  $0,5 \times 10^6$  hingga  $2,5 \times 10^6$  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 hingga  $2,5 \times 10^6$  CFU/ml (Murray et al, 1999)

#### 4.7.4 Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap *Streptococcus mutans*

Pada uji aktivitas antibakteri minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang dilakukan adalah :

- Menyediakan 7 tabung steril yaitu, 5 tabung sebagai uji antibakteri dan 1 tabung sebagai kontrol positif (kontrol kuman), serta 1 tabung sebagai kontrol negatif (kontrol bahan).
- Pembuatan konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis didapatkan dari metode pengenceran seri dengan cara perbandingan antara volume minyak atsiri (ml) dengan *aquadest* (ml). Konsentrasi yang digunakan adalah 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% dan 1,5625%.
- Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi  $0,5 \times 10^6$  hingga  $2,5 \times 10^6$  CFU/ml.
- Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung konsentrasi, masing-masing sebanyak 1 ml, sehingga konsentrasi akhir minyak atsiri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) adalah :

Tabung 1 : 50%	Tabung 5 : 3,125%
Tabung 2 : 25%	Tabung 6 : 1,5625%
Tabung 3 : 12,5%	Tabung 7 : kontrol positif
Tabung 4 : 6,25%	Tabung 8 : kontrol negatif
- Pengenceran seri (Winna, 2008) :
  - Tabung 1 : minyak atsiri kulit jeruk nipis dengan konsentrasi 50% sejumlah 5 ml
  - Tabung 2 : konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis 50% sejumlah 5 ml ditambahkan 5 ml *aquadest*, dicampur sampai didapat konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis 25%

Tabung 3 : konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis 25% sejumlah 5 ml ditambahkan 5 ml *aquadest*, dicampur sampai didapat konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis 12,5%

Tabung 4 : konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis 12,5% sejumlah 5 ml ditambahkan 5 ml *aquadest*, dicampur sampai didapat konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis 6,25%

Tabung 5 : konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis 6,25% sejumlah 5 ml ditambahkan 5 ml *aquadest*, dicampur sampai didapat konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis 3,125%.

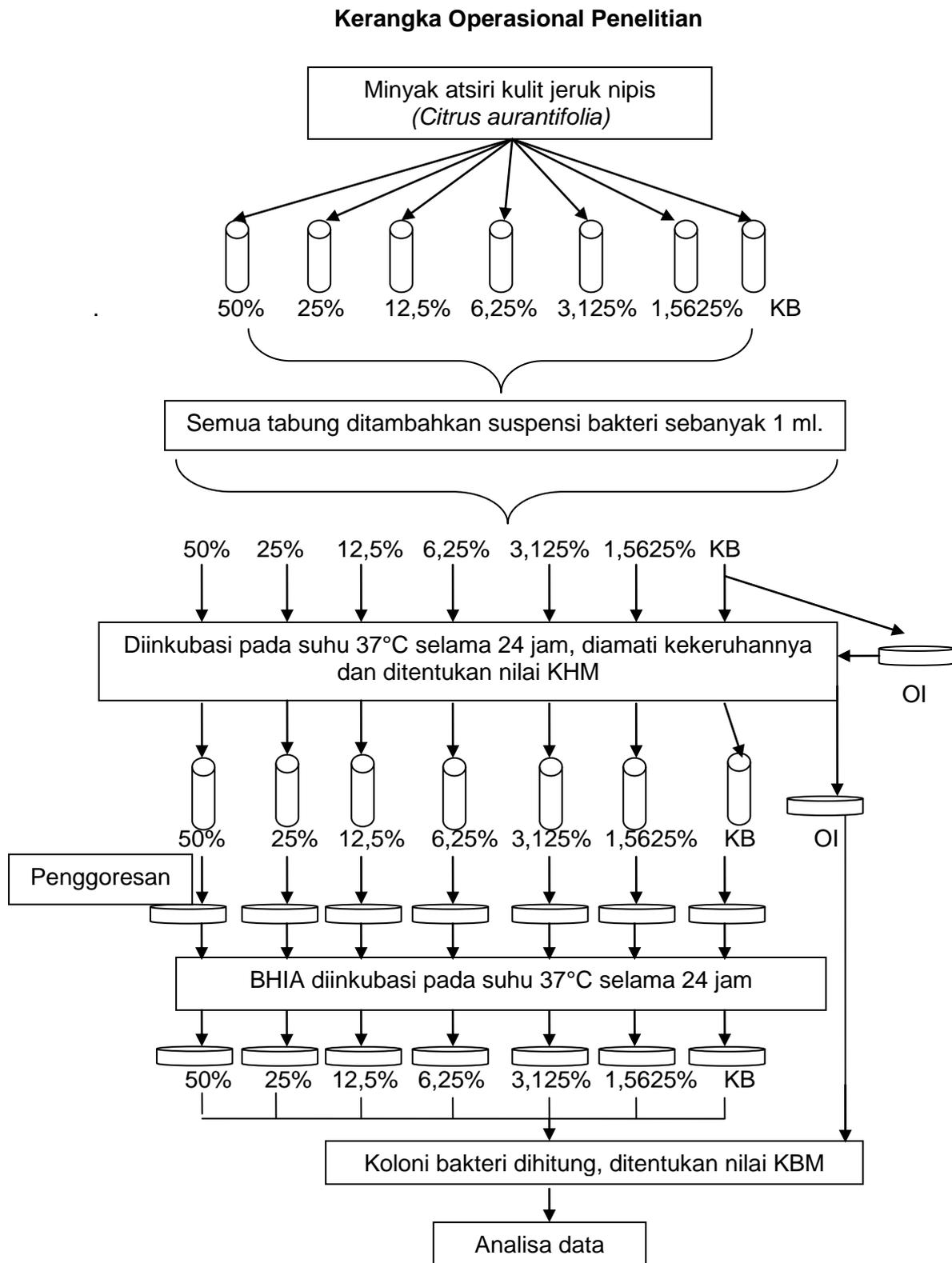
Tabung 6 : konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis 3,125% sejumlah 5 ml ditambahkan 5 ml *aquadest*, dicampur sampai didapat konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis 1,5625%.

Tabung 7 : bakteri *Streptococcus mutans* + medium + *aquadest*

Tabung 8 : minyak atsiri kulit jeruk nipis + medium

- Kontrol kuman (0%) digoreskan pada media BHIA 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*.



Gambar 4.7.4 Kerangka Operasional Penelitian

Keterangan :

CFU : Colony Forming Unit

KB : Kontrol bakteri *S. mutans*

OI : Original inoculum dengan kepadatan  $10^6$  CFU/ml dengan penggoresan 1 ose

#### 4.8 Pengumpulan Data

Data yang diperoleh berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif didapatkan dengan cara melihat tingkat kekeruhan. Data kuantitatif didapat dengan cara menghitung jumlah koloni *Streptococcus mutans* dengan menggunakan *colony counter*.

#### 4.9. Analisa Data

Dilakukan uji distribusi data terlebih dahulu yaitu, uji distribusi normalitas dan homogenitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk Test*. Bila data terdistribusi normal, analisa data yang digunakan adalah uji statistik *one-way Anova* dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one-way Anova* dengan derajat kepercayaan 95 % ( $\alpha = 0,05$ ) digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh berbagai konsentrasi minyak atsiri kulit jeruk nipis terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui besarnya pengaruh peningkatan konsentrasi minyak atsiri terhadap jumlah koloni *Streptococcus mutans*. Untuk memudahkan melakukan interpretasi mengenai kekuatan hubungan antara dua kriteria, koefisien korelasi dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Sarwono, 2006)

- 0 : tidak ada korelasi antara dua variabel
- >0-0.25 : korelasi sangat lemah
- >0.5-0.75 : korelasi kuat
- >0.75-0.99 : korelasi sangat kuat
- >1 : korelasi sempurna

Analisa data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 16.0.