

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah metode *true experimental design* dengan *post test only control group design*. Metode yang digunakan adalah metode difusi sumuran. Perbedaan pemberian daun jambu biji putih dan daun jambu biji merah dapat diketahui dengan membandingkan diameter zona hambatan daun jambu biji putih dan daun jambu biji merah. Kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol, selanjutnya dilakukan observasi dan analisis.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Bahan yang diuji adalah daun jambu biji putih dan daun jambu biji merah 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*.

4.2.1 Estimasi Jumlah Pengulangan

Jumlah pengulangan penelitian yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Solimun, 2001):

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan 7 macam perlakuan yaitu 5 macam perlakuan dengan konsentrasi berbeda yang nantinya akan ditentukan berdasarkan penelitian pendahuluan, kontrol negatif (aquades), dan kontrol positif (*chlorhexidine gluconate* 0,2%), maka :

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

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

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

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Ekstrak daun jambu biji putih dan ekstrak daun jambu biji merah dengan konsentrasi masing-masing 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 0% (kontrol negatif).

4.3.2 Variabel Terikat

Pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang diukur dengan berbagai diameter zona hambatan yang terbentuk dalam milimeter dengan menggunakan kaliper.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2014 – Maret 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 *Hemolisa Optochin*

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

4.5.1.4 Bahan Pembuatan Ekstrak Jambu

1. Daun jambu biji putih
2. Daun jambu biji merah
3. Etanol 96%

4.5.1.5 Bahan Tes Difusi Sumuran

1. Nutrient Agar
2. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*
3. Ekstrak daun jambu biji merah dengan 5 konsentrasi yang berbeda

4. Ekstrak daun jambu biji putih dengan 5 konsentrasi yang berbeda
5. Aquades
6. *Clorhexidine Gluconate* 0,2%

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

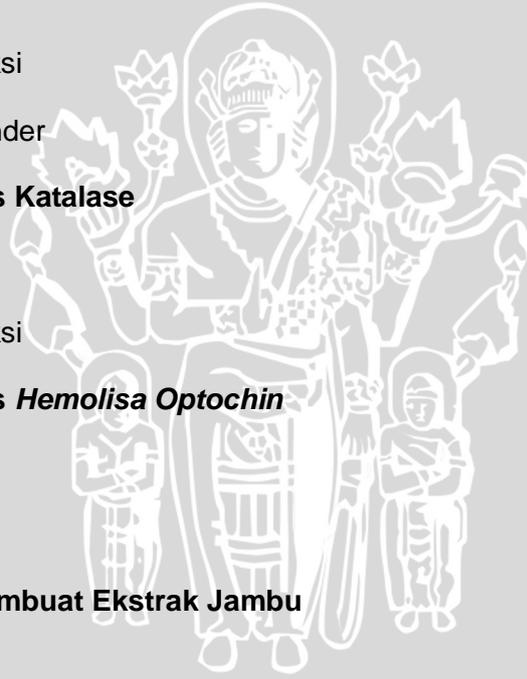
1. Pipet
2. Tabung reaksi

4.5.2.3 Alat untuk Tes *Hemolisa Optochin*

1. Ose
2. Inkubator

4.5.2.4 Alat untuk Membuat Ekstrak Jambu

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

- 4.6.1 *Streptococcus mutans* adalah bakteri kokus Gram positif anaerob fakultatif, bakteri *Streptococcus mutans* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang
- 4.6.2 Daun jambu biji putih dan daun jambu biji merah yang dipakai dalam penelitian ini adalah daun jambu biji putih dan daun jambu biji merah yang dibeli secara langsung dari Materia Medika, Batu.
- 4.6.3 Ekstrak daun jambu biji putih merupakan daun jambu biji putih yang telah diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

- 4.6.4 Ekstrak daun jambu biji merah merupakan daun jambu biji merah yang telah diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.
- 4.6.5 Larutan kontrol terdiri dari larutan kontrol negatif yang berisi air (aquades) dan larutan kontrol positif merupakan larutan yang berisi *chlorhexidine gluconate* 0,2%.
- 4.6.6 Zona hambat *Streptococcus mutans* yaitu berupa zona bening yang terbentuk di daerah sekeliling lubang sumuran yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *S. mutans* dan diukur dengan menggunakan kaliper dalam satuan milimeter (mm). Interpretasi daerah hambatan pertumbuhan bakteri mengacu pada standar umum obat asal tanaman yakni diameter zona hambat di sekitar disk ekstrak berukuran 12-24 mm (Hermawan, 2007).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Identifikasi Bakteri

4.7.1.1 Pewarnaan Gram (Sulistyaningsih, 2008)

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. Selanjutnya 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 100 kali.

4.7.1.2 Tes Katalase (Ardiani, 2011)

Tes katalase merupakan tes untuk mendeteksi adanya kaseinase, yaitu enzim yang dapat menghidrolisis protein susu kasein. Bakteri yang menggunakan kasein akan muncul sebagai koloni yang dikelilingi oleh zona clear. Tes ini digunakan untuk membedakan *Streptococcus* dari *Staphylococcus*.

Langkah-langkah tes katalase sebagai berikut:

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* (Richter *et al*, 2008)

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 mutan* menunjukkan hasil negatif dengan adanya zona hambat <14 mm di sekeliling *optochin* disk.

4.7.2 Pembuatan Sediaan Ekstrak Daun Jambu Biji (Hermawan, 2012)

4.7.2.1 Pembuatan Ekstrak Daun Jambu Biji Putih

1. Daun jambu biji putih kering dihaluskan dengan blender.
2. Daun jambu biji putih kering ditimbang dan diambil sebanyak 100 g.
3. Daun jambu biji 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 dengan ekstrak daun jambu biji putih menggunakan alat rotary evaporator pada temperatur 65°C (sesuai titik didih etanol) hingga semua pelarut

terpisah dan didapatkan cairan ekstrak yang kental (pasta) dengan konsentrasi 100%.

9. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak daun jambu biji putih konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol.

4.7.2.2 Pembuatan Ekstrak Daun Jambu Biji Merah

1. Daun jambu biji merah kering dihaluskan dengan blender.
2. Daun jambu biji merah kering ditimbang dan diambil sebanyak 100 g.
3. Daun jambu biji merah 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 dengan ekstrak daun jambu biji merah menggunakan alat rotary evaporator pada temperatur 65°C (sesuai titik didih etanol) hingga semua pelarut terpisah dan didapatkan cairan ekstrak yang kental (pasta) dengan konsentrasi 100%. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak daun jambu biji merah konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol 96%.

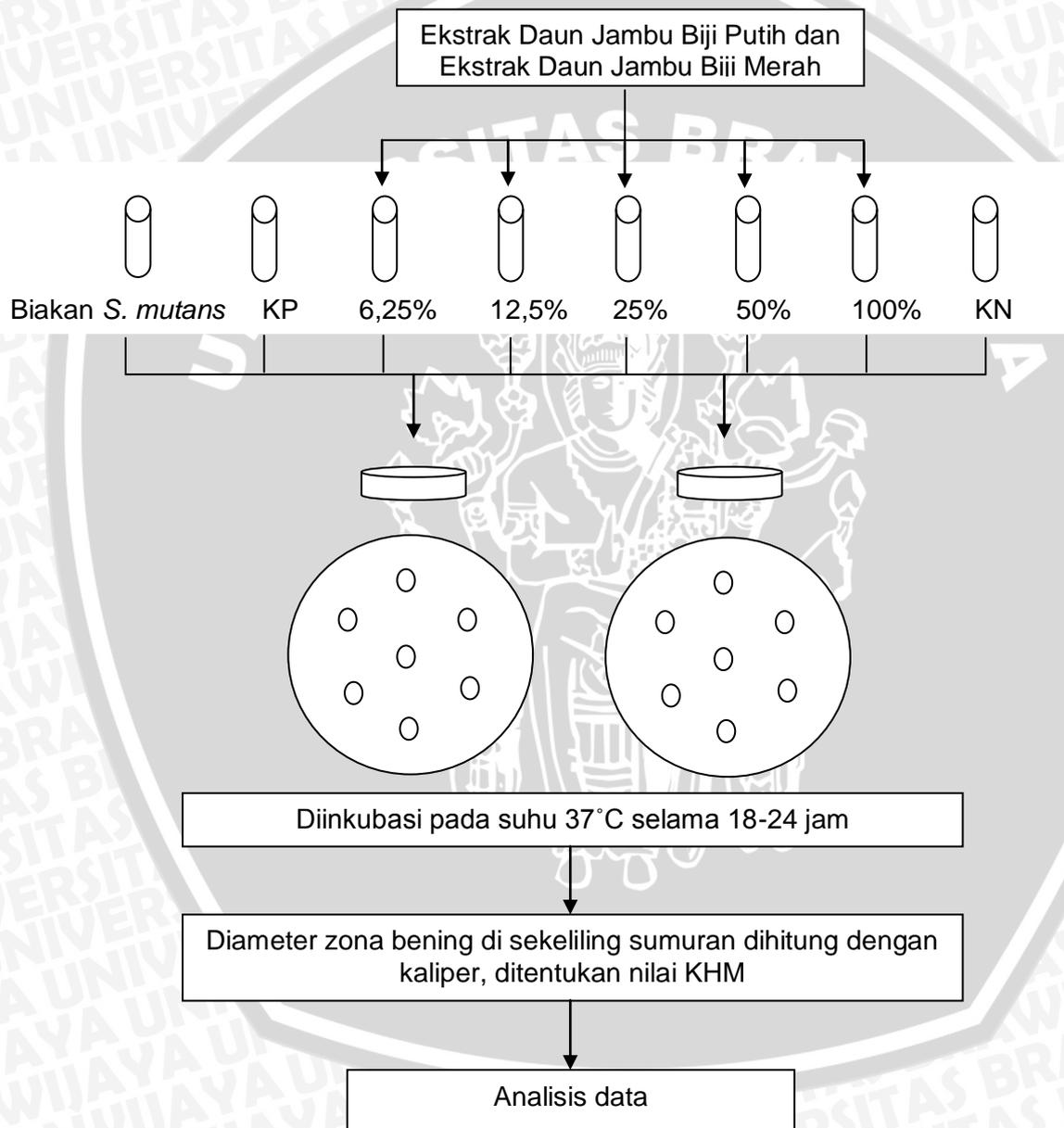
4.7.3 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Jambu Biji terhadap *Streptococcus mutans*

1. Menyiapkan BHI agar yang dibuat dari 28 gram nutrient agar dan 1 L air suling. Medium dilarutkan dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, menambahkan 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 daun jambu biji putih (Widianita, 2014).
 - Konsentrasi 100% : 1 ml ekstrak daun jambu biji putih 100%.
 - Konsentrasi 50% : 0,5 ml ekstrak daun jambu biji putih 100% ditambah 0,5 ml aquades.
 - Konsentrasi 25% : 0,25 ml ekstrak daun jambu biji putih 100% ditambah 0,75 ml aquades
 - Konsentrasi 12,5%: 0,125 ml ekstrak daun jambu biji putih 100% ditambah 0,875 ml aquades
 - Konsentrasi 6,25%: 0,0625 ml ekstrak daun jambu biji putih 100% ditambah 0,9375 ml aquades
 - Kontrol Negatif : aquades 5 ml
 - Kontrol Positif : *Clorhexidine Gluconate* 0,2%
3. Melakukan pengenceran seri ekstrak daun jambu biji merah.
 - Konsentrasi 100% : 1 ml ekstrak daun jambu biji merah 100%.
 - Konsentrasi 50% : 0,5 ml ekstrak daun jambu biji merah 100% ditambah 0,5 ml aquades.

- Konsentrasi 25% : 0,25 ml ekstrak daun jambu biji merah 100% ditambah 0,75 ml aquades
 - Konsentrasi 12,5%: 0,125 ml ekstrak daun jambu biji merah 100% ditambah 0,875 ml aquades
 - Konsentrasi 6,25%: 0,0625 ml ekstrak daun jambu biji merah 100% ditambah 0,9375 ml aquades
 - Kontrol Negatif : aquades 5 ml
 - Kontrol Positif : *Clorhexidine Gluconate* 0,2%
4. Dibuat lubang sumuran dengan perforator yang berdiameter 6 mm sebanyak 7 buah (sesuai 5 konsentrasi, kontrol negatif, dan kontrol positif) pada tempat yang telah ditentukan pada masing-masing *plate* yang berisi BHI agar dan bakteri.
 5. Memasukkan ekstrak daun jambu biji putih (dengan 5 konsentrasi yang berbeda), aquades (kontrol negatif), dan chlorhexidine gluconate 0,2% (kontrol positif) dengan mikropipet sebanyak 10 μ l ke dalam masing-masing lubang sumuran sesuai dengan nomer kodenya pada *plate* pertama.
 6. Memasukkan ekstrak daun jambu biji merah (dengan 5 konsentrasi berbeda), aquades (kontrol negatif), dan chlorhexidine gluconate 0,2% (kontrol positif) dengan mikropipet sebanyak 10 μ l ke dalam masing-masing lubang sumuran sesuai dengan nomer kodenya pada *plate* kedua.
 7. Inkubasi *plate* yang berisi BHI agar dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.

8. Setelah diinkubasi, menghitung diameter daerah hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* dengan menggunakan kaliper (Darsono dan Artemisia, 2003)

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

Keterangan: Alur penelitian ini menunjukkan tahap-tahap yang dikerjakan dalam penelitian dengan metode difusi sumuran

4.9 Analisis Data

Dari data yang diperoleh, maka dapat dibuat analisis 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 daun jambu biji putih dengan ekstrak daun jambu biji merah maka dilakukan uji komparasi menggunakan uji T tidak berpasangan.

