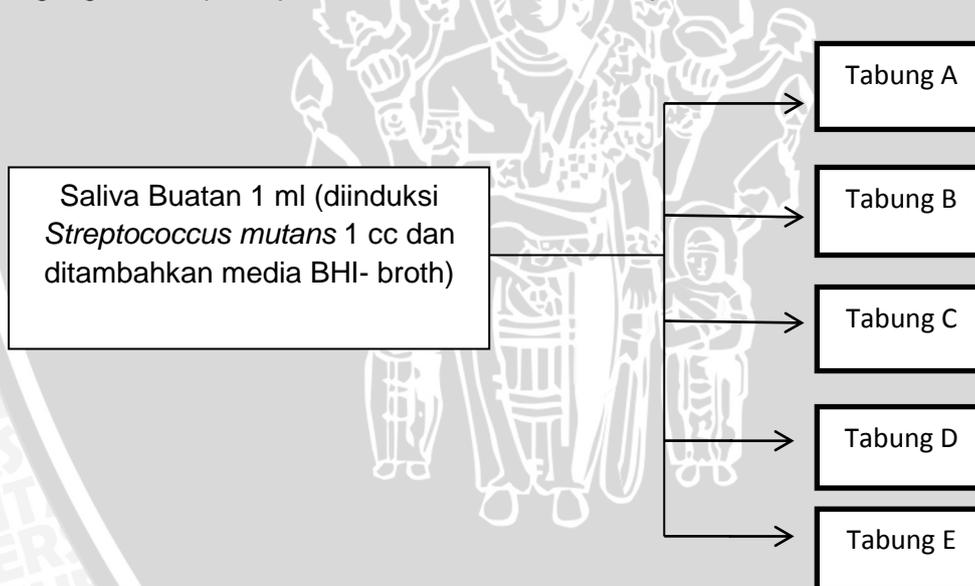


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium. Desain penelitian adalah *True Experimental Design*, yaitu *Post Test Control Group Design*. Dalam penelitian ini, peneliti ingin mengetahui perubahan pH saliva buatan yang telah diinduksi *Streptococcus mutans* dengan ditambah media BHI-broth lalu ditetaskan larutan ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dengan beberapa konsentrasi secara *in vitro*. Kelompok perlakuan yang digunakan pada penelitian ini adalah 5 kelompok :



Gambar 4.1 Skema Kelompok Perlakuan

Keterangan:

1. Tabung A kelompok kontrol tanpa penambahan larutan ekstrak bunga cengkeh
2. Tabung B ditambahkan larutan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 5% 1ml
3. Tabung C ditambahkan larutan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 10% 1ml
4. Tabung D ditambahkan larutan ekstrak cengkeh konsentrasi 15% 1ml
5. Tabung E ditambahkan larutan ekstrak cengkeh konsentrasi 20% 1ml

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Sampel Penelitian

Sampel	Jenis Perlakuan
Kontrol	Saliva buatan ditambah dengan <i>Streptococcus mutans</i> dalam media <i>BHI-broth</i>
Perlakuan 1	Saliva buatan ditambah dengan <i>Streptococcus mutans</i> dalam media <i>BHI-broth</i> dan larutan ekstrak cengkeh konsentrasi 5% 1ml
Perlakuan 2	Saliva buatan ditambah dengan <i>Streptococcus mutans</i> dalam media <i>BHI-broth</i> dan larutan ekstrak cengkeh konsentrasi 10% 1ml
Perlakuan 3	Saliva buatan ditambah dengan <i>Streptococcus mutans</i> dalam media <i>BHI-broth</i> dan larutan ekstrak cengkeh konsentrasi 15% 1ml
Perlakuan 4	Saliva buatan ditambah dengan <i>Streptococcus mutans</i> dalam media <i>BHI-broth</i> dan larutan ekstrak cengkeh konsentrasi 20% 1ml

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

4.2.2 Jumlah Sampel

Dalam penelitian ini, banyaknya pengulangan ditentukan dengan menggunakan rumus estimasi besar pengulangan sebagai berikut:

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

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

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

keterangan:

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan

Sesuai perhitungan diatas, pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini sebanyak 4 kali (Setyawan, 2012).

4.3 Variabel Penelitian

Penelitian ini terdiri dua variabel, yaitu:

Variabel bebas : -larutan ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*).

Variabel tak bebas : -pH saliva buatan (diinduksi *Streptococcus mutans* dan media BHI- broth).

-Nilai absorbansi saliva buatan pada masing-masing perlakuan

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan September 2014.

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

1. Larutan ekstrak bunga cengkeh berbagai konsentrasi
2. Akuades steril
3. Saliva buatan
4. Sukrosa
5. Isolat bakteri *Streptococcus mutans*
6. Kertas penghisap, minyak emersi
7. Kapas
8. *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB)
9. *Syringe*

4.5.2 Alat Penelitian

1. pH meter
2. Tabung reaksi steril
3. Pipet tetes steril
4. Tabung enlemeyer steril
5. Bunsen
6. Timbangan
7. *Stopwatch*
8. Inkubator
9. *Autoclaf*
10. *Rotary Evaporator*
11. Ose
12. Gelas obyek
13. Rak tabung reaksi
14. Spidol marker
15. Spektrofotometer

4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak bunga cengkeh adalah bunga cengkeh kering yang berasal dari suku *Myrtaceae* yang didapat dan telah diidentifikasi dari Materia Medika kota Batu, dikumpulkan, dicuci bersih lalu dikeringkan dan dihaluskan setelah itu dilakukan ekstraksi panas (dekok) dengan pelarut air. Konsentrasi ekstrak bunga cengkeh yang digunakan pada penelitian ini adalah 5%,10%,15%,20%.

2. Bakteri *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 telah diidentifikasi.
3. Sukrosa adalah suatu disakarida yang dibentuk dari monomer-monomernya yang berupa unit dan dengan rumus molekul $C_{12}H_{22}O_{11}$. Sukrosa yang digunakan dalam penelitian ini adalah produksi pabrik dan berupa serbuk berwarna putih.
4. *BHI-Broth* adalah suatu media perkembangan mikroorganisme dengan kandungan Brain Heart Infusion, Sodium Klorida, Disodium Fosfat, dan karbohidrat.
5. Saliva buatan adalah (buffer) McDougall dengan komposisi campuran 58,80 g $NaHCO_3$; 48 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$; 3,42 g KCl; 2,82 g NaCl; 0,72 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,24 g $CaCl_2$ dalam 6 liter akuades (Sugianitri, 2011).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Tahap Persiapan Saliva Buatan

Larutan saliva buatan (buffer) McDougall dengan komposisi campuran 58,80 g $NaHCO_3$; 48 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$; 3,42 g KCl; 2,82 g NaCl; 0,72 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,24 g $CaCl_2$ dalam 6 liter akuades yang sebelumnya sudah dipesan dari Fakultas Sains Dan Teknologi , Universitas Airlangga.

4.7.2 Tahap Persiapan Larutan Ekstrak Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*).

Persiapan pembuatan larutan ekstrak bunga cengkeh didapat dari bunga cengkeh yang telah kering ditimbang sebanyak 100 gram, kemudian diblender sehingga menjadi serbuk (*simplisia*). Serbuk dimasukan ke dalam *beaker glass* dan diisi akuades sebanyak 1000 ml (perbandingan 1:1). *Beaker glass* kemudian ditutup *alumunium foil*. Selanjutnya *beaker glass* dimasukan ke dalam pemanas air dengan suhu mendidih 100°C, didihkan hingga volume akhir 100ml. Lalu hasil ekstrak kemudian disaring menggunakan *Whitmann No.1 filter paper*, yang diambil adalah air hasil saringannya dan didapatkan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 100%. Setelah itu gelas ukur dikeluarkan dan didinginkan di suhu mencapai suhu ruangan ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) agar terjadi penguapan air.

Ekstrak bunga cengkeh 100% lalu dilakukan pengenceran konsentrasi dengan melakukan pengenceran awal dari konsentrasi 100% menjadi 5%,10%,15%,20% .

1. Larutan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 5 % dibuat dengan mengambil 0,05 ml ekstrak konsentrasi 100% ditambah 0,95 ml akuades.
2. Larutan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 10 % dibuat dengan mengambil 0,1 ml ekstrak konsentrasi 100% ditambah 0,9 ml akuades.

3. Larutan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 15 % dibuat dengan mengambil 0,15 ml ekstrak konsentrasi 100% ditambah 0,85 ml akuades.
4. Larutan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 20 % dibuat dengan mengambil 0,2 ml ekstrak konsentrasi 100% ditambah 0,8 ml akuades (Begum H,2006).

4.7.3 Tahap Persiapan *Streptococcus mutans*

1. Dipersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* dari media BHI yang telah diuji konfirmasi.
2. 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).
3. 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 Tahap Uji Pengaruh Konsentrasi Larutan Ekstrak Bunga Cengkeh Terhadap pH Saliva Buatan dan Absorbansi Saliva Buatan

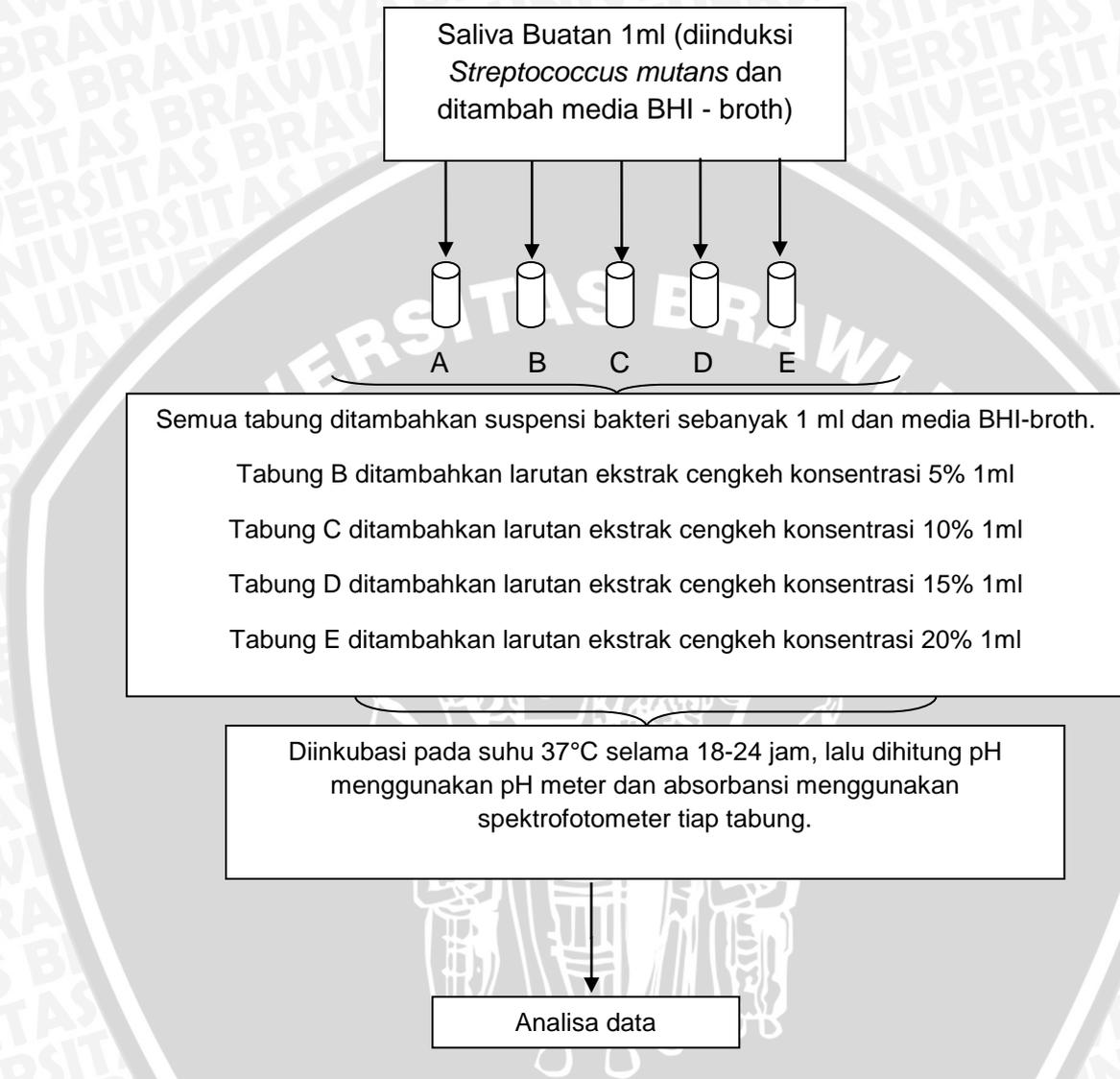
Rangkaian uji pengaruh konsentrasi larutan ekstrak bunga cengkeh terhadap pH saliva buatan dan absorbansi saliva buatan adalah sebagai berikut:

- a. Disediakan 5 tabung reaksi steril, kemudian pada masing-masing tabung dimasukkan 1 ml saliva buatan.
- b. Ditambahkan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* sebanyak 1 ml pada semua tabung reaksi (A, B, C, D dan E).
- c. Pada tabung perlakuan 1 (A) tanpa penambahan larutan ekstrak bunga cengkeh.
- d. Pada tabung perlakuan 2 (B) dengan penambahan larutan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 5% .
- e. Pada tabung perlakuan 3 (C) dengan penambahan larutan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 10% .
- f. Pada tabung perlakuan 4 (D) dengan penambahan larutan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 15% .
- g. Pada tabung perlakuan 5 (E) dengan penambahan larutan ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 20% .
- h. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37° selama 18-24 jam.
- i. Dilakukan pengukuran pH saliva buatan pada masing-masing tabung reaksi.
- j. Kemudian dari masing-masing tabung reaksi dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui

kepadatan optis yang menandakan banyaknya koloni bakteri *Streptococcus mutans*.



4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

4.9 Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

4.9.1 Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan meliputi data primer dan data sekunder. Yang termasuk data primer dari penelitian ini adalah pH saliva buatan yang telah diinduksi oleh *Streptococcus mutans* dalam media *BHI-broth* sebagai kelompok kontrol dan yang telah diberikan perlakuan berupa penambahan larutan ekstrak bunga cengkeh dengan konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20%.. Yang termasuk data sekunder dari penelitian ini adalah konsentrasi larutan ekstrak bunga cengkeh.

4.9.2 Teknik Pengumpulan Data

Untuk pengumpulan data primer dilakukan dengan cara:

- Data pH saliva buatan diperoleh dengan cara mengukur menggunakan pH indikator.
- Data nilai absorbansi saliva buatan diperoleh dengan cara mengukur menggunakan spektrofotometer.

Untuk pengumpulan data sekunder dilakukan dengan cara:

- Data konsentrasi larutan ekstrak bunga cengkeh diperoleh dari literatur.

4.10 Analisis Data

Pengolahan data dilakukan dengan bantuan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) 15.0 for *Windows*. Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi normalitas dan homogenitas varian menggunakan *kolmogorov smirnov* dan *levene homogeneity test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one way ANOVA* dan Korelasi Pearson.

Hipotesis Statistik:

H₀: tidak ada perbedaan nilai pH dan absorbansi saliva buatan yang telah diinduksi *Streptococcus mutans* dengan ditetaskan larutan ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) antara konsentrasi 5%, 10%, 15%, dan 20% secara *in vitro*.

H₁: ada perbedaan nilai pH dan absorbansi saliva buatan yang telah diinduksi *Streptococcus mutans* dan ditetaskan larutan ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) antara konsentrasi 5%, 10%, 15%, dan 20% secara *in vitro*.

Apabila $p \text{ value} \geq \alpha = 0,05$ maka H₀ diterima dan H₁ ditolak, apabila $p \text{ value} < \alpha = 0,05$ maka H₀ ditolak dan H₁ diterima.

