

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

**4.1. Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post-test only control group design* dengan metode tes difusi sumuran untuk mengetahui daya antimikroba ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) terhadap *Porphyromonas gingivalis* secara *in vitro*.

**4.2. Populasi dan Sampel****4.2.1. Populasi Penelitian**

Populasi penelitian adalah sediaan bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang didapatkan dari BLK Yogyakarta.

**4.2.2. Sampel Penelitian**

Untuk menghitung jumlah pengulangan digunakan rumus Federer (Savitri 2014), yaitu :

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

Keterangan :

N : jumlah pengulangan

t: jumlah perlakuan 100%, 80%, 60%, 40%, 20% konsentrasi ekstrak etanol kulit apel manalagi

Karena jumlah perlakuan (t) adalah 7, maka :

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

$$7n-n-7+1 \geq 15$$

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5 \approx 4 \text{ kali pengulangan}$$

jadi pada penelitian ini dibutuhkan 4 kali jumlah pengulangan

**Tabel 4.1 : Pembagian Kelompok Perlakuan (Hafidata dkk.,2014)**

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Negatif	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + akuades steril
Kontrol Pembeding	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + <i>chlorhexidine</i> 0,2%
Kelompok A	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan konsentrasi 100%
Kelompok B	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan konsentrasi 80%
Kelompok C	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan konsentrasi 60%
Kelompok D	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan konsentrasi 40%
Kelompok E	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan konsentrasi 20%

### 4.3. Variabel Penelitian

#### 4.3.1. Variabel Bebas

Ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20%.

#### 4.3.2. Variabel Terikat

Pertumbuhan *P.gingivalis* setelah pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi.

#### 4.3.3. Variabel Kendali

- a. Kriteria alat dan bahan
- b. Alat dan bahan
- c. Konsentrasi ekstrak etanol kulit apel manalagi
- d. Sterilisasi alat dan bahan

#### 4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 4.4.1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

##### 4.4.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus- Oktober 2015.

#### 4.5. Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

##### 4.5.1. Alat

##### 4.5.1.1 Alat untuk Ekstraksi Kulit Apel Manalagi

1. Spidol
2. Oven
3. Timbangan
4. Elenmeyer
5. Kertas saring
6. Evaporator
7. Kertas label

#### 4.5.1.2 Alat untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. Gelas objek
2. Ose
3. Bunsen
4. Kertas penghisap
5. Mikroskop pembesaran objektif 1000x
6. Tabung reaksi

#### 4.5.1.3 Alat untuk Tes Oksidase

1. Ose
2. *Oxidase Test Strip*

#### 4.5.1.4 Alat untuk Uji Daya Antimikroba Ekstrak etanol kulit apel manalagi terhadap *Porphyromonas gingivalis*

1. Tabung reaksi
2. *Candle jar/ Anaerobic jar*
3. Cawan petri
4. Ose
5. Mikropipet
6. Pelubang
7. Inkubator
8. Jangka sorong

#### 4.5.2 Bahan

##### 4.5.2.1 Bahan untuk Ekstraksi Kulit Apel Manalagi

1. Ekstrak etanol kulit apel manalagi
2. Etanol 70%
3. Akuades steril

4. Bakteri yang dianalisis *Porphyromonas gingivalis*
5. Kultur : *Brain Heart Infusion Broth (BHI-B)*, *Brain Heart Infusion Agar (BHI-A)*

#### 4.5.2.2 Bahan untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. Isolat *Porphyromonas gingivalis*
2. Pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol 70%, safranin)
3. Akuades

#### 4.5.2.2 Bahan untuk Tes Oksidase

1. Isolat *Porphyromonas gingivalis*

#### 4.5.2.3 Bahan untuk Uji Daya Antimikroba ekstrak etanol kulit apel manalagi terhadap *Porphyromonas gingivalis*

- a. BHI-A
- b. Isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis*
- c. Ekstrak etanol kulit apel manalagi
- d. Akuades
- e. *Chlorhexidine gluconate 0,2%*

#### 4.6. Definisi Istilah/Operasional

1. Ekstrak etanol kulit apel manalagi adalah ekstrak dari kulit apel manalagi yang didapatkan dari Batu Materia Medika,
2. Metode pengekstrakan ekstrak etanol kulit apel manalagi menggunakan metode maserasi, yaitu metode untuk mengekstrak dengan cara perendaman sediaan dengan pelarut etanol 70%.
3. Isolat *Porphyromonas gingivalis* adalah bakteri anaerob gram negatif, melanogenik dan nonsakarolitik, yang terlihat dengan warna merah pada pewarnaan gram. Penelitian ini memakai *Porphyromonas gingivalis* jenis ATCC 33277 yang didapat dari BLK Yogyakarta.
4. Daya antimikroba adalah suatu bahan yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme dan ditandai dengan besarnya diameter zona hambatan *Porphyromonas gingivalis* yang terbentuk di daerah sekeliling sumuran yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* dengan menggunakan metode difusi sumuran dan diukur menggunakan kaliper dalam satuan mm.
5. Metode difusi sumuran adalah metode yang dibuat dengan cara melubangi agar padat yang telah di inokulasi dengan bakteri. Lubang sumuran diisi dengan larutan yang akan diuji. Setelah diinkubasi, dilakukan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Daerah zona hambat diukur dengan mengukur diameter keseluruhan daerah transparan.
6. Kontrol negatif adalah BHI-A dengan suspensi *P.gingivalis* + aquades (0%).

7. Kontrol pembanding adalah BHI-A dengan suspensi *P.gingivalis* + *chlorheksidine gluconate* 0,2%.
8. Kelompok perlakuan adalah BHI-A dengan suspensi *P.gingivalis* + ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan konsentrasi 100%; 80%; 60%; 40%; 20%.

#### 4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

Prosedur penelitian terdiri dari pembuatan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan metode maserasi, prosedur identifikasi *Porphyromonas gingivalis*, yaitu pewarnaan gram, tes oksidase, pembuatan suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis*, uji daya antimikroba ekstrak etanol kulit apel manalagi terhadap *Porphyromonas gingivalis*.

##### 4.7.1. Persiapan Ekstrak etanol kulit apel manalagi

Pembuatan ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) diawali dengan menimbang serbuk kulit apel sebanyak 150 g, lalu melakukan pembasahan dengan pelarut etanol 70% sebanyak 200 ml. Setelah itu memasukkan bahan yang telah dibasahi dengan pelarut ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut etanol 70% sampai bahan terendam, total yang digunakan sebanyak 250 ml. Tutup toples dengan rapat selama 24 jam dan dishaker di atas shaker digital 50 rpm. Saring ekstrak dengan penyaring kain. Tampung dalam erlenmeyer. Lalu melakukan remaserasi pada ampas dengan cara memasukkan kembali dalam toples dan ditambahkan pelarut sampai terendam (minimal 5 cm di atas permukaan serbuk). Kemudian biarkan semalam atau 24 jam dan dishaker. Remaserasi menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 250 ml. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir, dijadikan

satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Diperlukan waktu 1,5 jam untuk evaporasi. Ekstrak cair yang dihasilkan dievaporasi/ diuapkan diatas water bath selama 1 jam. Dari serbuk kulit apel 200 gram dian diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 700 ml dihasilkan ekstrak cair sebanyak 20 ml.

- a. Pembuatan sediaan ekstrak etanol kulit apel manalagi didahului dengan uji pendahuluan sehingga ditetapkan untuk menggunakan konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, 20% dengan diencerkan menggunakan akuades dan dicampur hingga homogen dengan *evaporator*.

Menurut Afrilia (2011) cara perhitungan dan pembuatan konsentrasi ekstrak sebagai berikut :

- Ekstrak etanol kulit apel manalagi konsentrasi 100% : 2 ml ekstrak etanol kulit apel manalagi 100%.
- Ekstrak etanol kulit apel manalagi konsentrasi 80% : 1,6 ml ekstrak etanol kulit apel manalagi 100% + 0,4 ml akuades.
- Ekstrak etanol kulit apel manalagi konsentrasi 60% : 1,2 ml ekstrak etanol kulit apel manalagi 100% + 0,8 ml akuades.
- Ekstrak etanol kulit apel manalagi konsentrasi 40% : 0,8 ml ekstrak etanol kulit apel manalagi 100% + 1,2 ml akuades.
- Ekstrak etanol kulit apel manalagi konsentrasi 20% : 0,4 ml ekstrak etanol kulit apel manalagi 100% + 1,6 ml akuades.

#### 4.7.2 Tes Identifikasi Bakteri

Tes yang dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri *Porphyromonas gingivalis* antara lain adalah tes pewarnaan gram untuk menentukan bakteri gram positif atau negatif, dan tes oksidase.

##### 4.7.2.1 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
2. 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.
3. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
4. Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
5. Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
6. Sediaan ditetesi dengan alkohol 70% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan ditetesi safranin selama 0,5 menit. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.

8. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
9. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 1000x.
10. Hasil positif : *Porphyromonas gingivalis* tercat merah ( Gram negatif).

#### 4.7.2.2 Tes Oksidase

1. Siapkan *oxidase test strip*
2. Ambil 1 ose bakteri *Porphyromonas gingivalis*
3. Goreskan 1 ose *Porphyromonas gingivalis* pada oksidase test strip
4. Tunggu 10 detik, amati perubahan warna
5. Hasil positif : *Porphyromonas gingivalis* tercat ungu ( menghasilkan enzim sitokrom oksidase).

#### 4.7.3 Persiapan Suspensi Uji *Porphyromonas Gingivalis*

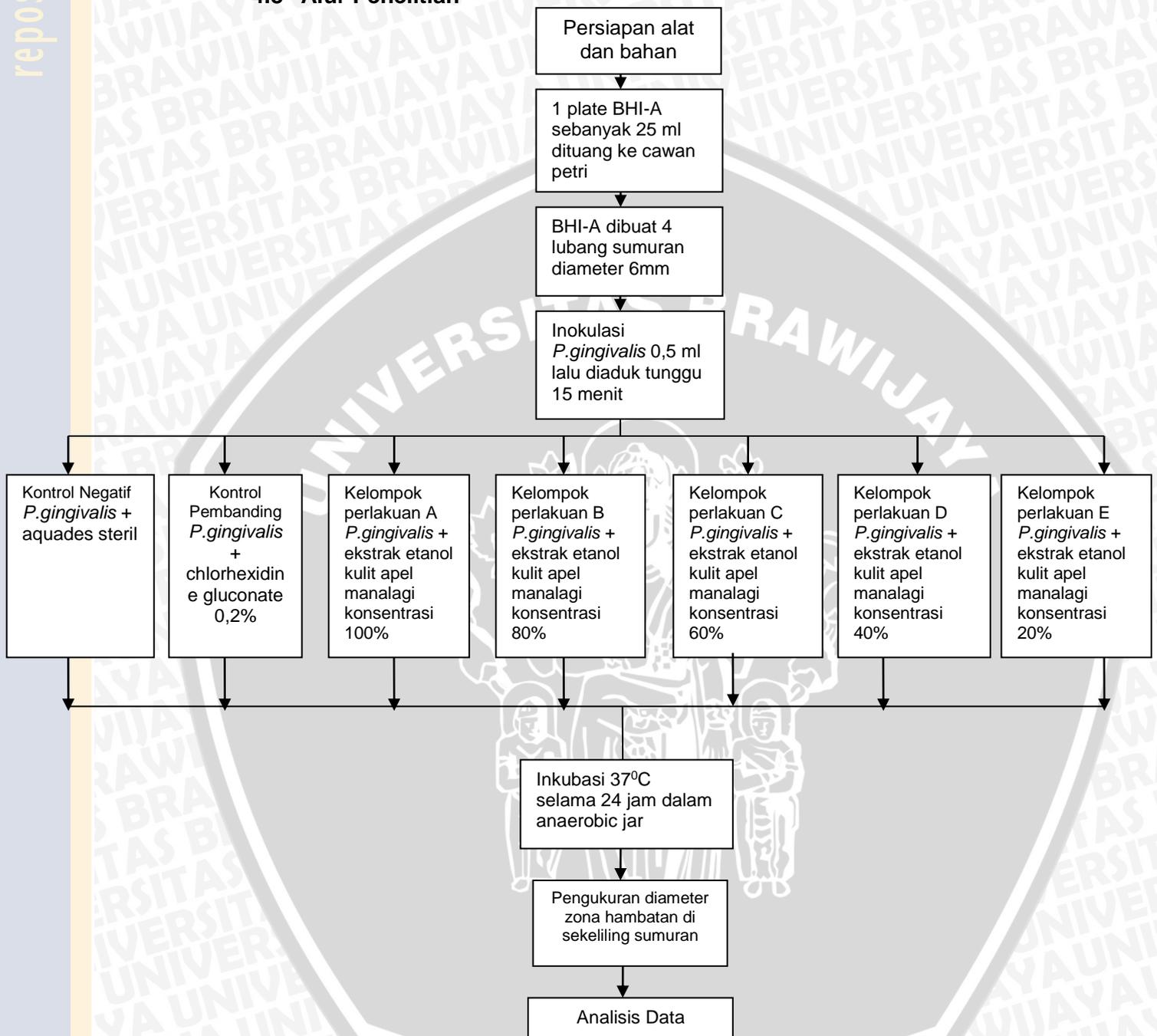
1. Dipersiapkan bakteri *Porphyromonas gingivalis* dari media BHIB yang telah diuji konfirmasi.
2. Suspensi bakteri pada BHIB dispektrofotometri dengan  $\lambda = 625$  sehingga didapatkan Optical Density 0,1 (setara  $10^8$  CFU/ml). Kemudian dengan rumus pengenceran  $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$  kepadatan bakteri tersebut diencerkan dengan NaCl hingga menjadi  $10^6$  CFU/ml.

#### 4.7.4 Uji daya antimikroba Ekstrak etanol kulit apel manalagi terhadap

##### *Porphyromonas gingivalis* secara *in vitro* (Hafidatadkk., 2014)

1. Bagian bawah *petridish* yang berisi media BHI-A dibagi menjadi 4 daerah
2. Tiap daerah diberi identitas masing-masing menggunakan kertas label dan spidol
3. Media BHI-A sebanyak 25 ml dituang ke dalam masing-masing *petridish* steril dan ditunggu sampai hangat sekitar 37°C
4. Inokulasi 0,5 ml suspensi *Porphyromonas gingivalis* pada media BHI-A hangat lalu diaduk, tunggu hingga padat sekitar 15 menit
5. Pada setiap bagian tersebut dibuat 1 lubang sumuran menggunakan perforator steril berdiameter 6 mm dengan kedalaman lubang sumuran 4 mm
6. Lalu dilakukan pemberian 50 µl ekstrak etanol kulit apel manalagi konsentrasi 100%, 60%, 80%, 40%, 20%, kontrol pembanding, dan negatif pada setiap lubang sumuran
7. Media BHI-A yang telah diinokulasi *Porphyromonas gingivalis* dan diberi perlakuan, selanjutnya dimasukkan ke dalam *candle jar*, lalu *candle jar* dimasukkan ke inkubator, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
8. Lakukan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Daerah zona hambat diukur dengan mengukur diameter keseluruhan daerah transparan.
9. Hasil pengukuran dianalisis

### 4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian



#### 4.9 Analisis Data

Berdasarkan penelitian ini dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut :

$H_0$  : ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) memiliki daya sebagai antimikroba terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* secara *in vitro*.

$H_1$  : ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) tidak memiliki daya sebagai antimikroba terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* secara *in vitro*.

Analisis awal yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji homogenitas dengan program SPSS 16.00 for Windows dengan signifikansi 0,05 ( $p=0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ). Jika sebaran data normal dan homogen ( $p>0,05$ ) maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun, jika sebaran data tidak normal dan tidak homogen ( $p<0,05$ ) digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji Uji Post hoc Multiple Comparison Equal Variance by Tukey sebagai lanjutan *one way anova* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis* untuk menentukan perbedaan yang bermakna dalam tiap kelompok. Uji berikutnya adalah uji korelasi Pearson apabila didapatkan data normal dan homogen, apabila didapatkan data tidak normal dan tidak homogen menggunakan uji korelasi Spearman, lalu dilanjutkan dengan uji regresi.