

BAB 4**METODE PENELITIAN****4.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian dengan desain eksperimental laboratorium dengan menggunakan metode difusi sumuran untuk mengetahui aktivitas ekstrak kulit pisang ambon muda sebagai antimikroba terhadap *Streptococcus mutans*.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa kuman *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari stok bakteri *Streptococcus mutans* yang dimiliki laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang berasal dari Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian**4.3.1 Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Ekstrak kulit pisang ambon muda pada penelitian ini diperoleh dari UPT Materia Medica di Kota Batu.

4.3.2 Waktu Penelitian

Agustus – Oktober 2015.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit pisang dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% 3,125% dan 0%. Konsentrasi tersebut merupakan hasil konsentrasi dari penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* diukur dengan berbagai diameter zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong.

4.5 Estimasi Pengulangan Ekstrak

Banyaknya pengulangan yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Notobroto, 2005):

$$p(n - 1) > 15$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi dari ekstrak metanol kulit pisang ambon muda dan 2 kontrol bakteri ($p = 5+2 = 7$) maka didapatkan jumlah pengulangan:

$$7(n - 1) > 15$$

$$7n - 7 > 15$$

$$7n > 22$$

$$N > 3,5 \approx 4$$

Jadi jumlah pengulangan pada penelitian ini adalah 4 kali.

4.6 Definisi Operasional

- 1) Kulit pisang ambon muda yang digunakan adalah kulit dari pisang ambon berwarna hijau cerah dan belum matang. Pisang ambon diperoleh dari perkebunan pisang di Materia Medika Batu.
- 2) Ekstraksi kulit pisang ambon menggunakan pelarut metanol 90% dengan metode maserasi.
- 3) *Streptococcus mutans* yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang berasal dari Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dari isolat standar.
- 4) Standar kepadatan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 10^8 CFU/ml.

4.7 Bahan dan Alat Penelitian

4.7.1 Bahan dan Alat Pewarnaan Gram

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk identifikasi bakteri adalah *isolat* bakteri *Streptococcus mutans*, pewarna Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), minyak emersi, ose, kertas penghisap, mikroskop, tabung reaksi, *bunsen brander*, dan *object glass*.

4.7.2 Bahan dan Alat Tes *Katalase*

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk melakukan tes *katalase* adalah hasil pembiakan cair *Streptococcus mutans*, H_2O_2 , pipet, dan tabung reaksi.

4.7.3 Bahan dan Alat Tes *Optochin*

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk melakukan tes *optochin* adalah *Chocolate Agar Plate (CAP)*, *optochin disk*, ose, dan inkubator.

4.7.4 Bahan dan Alat untuk Pembuatan Ekstrak Kulit Pisang

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk pembuatan ekstrak kulit pisang adalah serbuk kulit pisang ambon, metanol 90%, kertas saring, toples bertutup, corong gelas, timbangan analitik, gelas ukur, botol, erlenmeyer, rotary evaporator, beaker glass, shaker digital, dan water bath.

4.7.5 Bahan dan Alat untuk Difusi Sumuran

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk difusi sumuran adalah aquades, *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), hasil ekstraksi dan perbenihan cair bakteri dengan kepadatan 10^8 CFU/ml, inkubator, pipet steril, media BHI dengan label konsentrasi, media BHI untuk kontrol bakteri dan kontrol bahan, serta vortex.

4.8 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.8.1 Persiapan

Tabung reaksi, petri disk dan alat-alat lainnya (yang dapat disterilisasi) disiapkan dalam kondisi steril dengan menggunakan teknik *autoclave*. Kemudian diberi label pada masing-masing tabung reaksi, petri disk. Sterilisasi juga dilakukan pada kulit pisang ambon muda. Prosedur sterilisasi ini yaitu dimulai dari pengambilan buah pisang ambon dengan handscoon lalu kulit pisang yang telah dipilih dicuci bersih dengan air kemudian dikeringkan dengan oven suhu 50°C selama sekitar 2 hari. Sterilisasi yang dilakukan pada penelitian ini bertujuan untuk menghindari kontaminasi dari mikroorganisme yaitu bakteri, virus dan jamur.

4.8.2 Identifikasi Bakteri

Untuk memastikan bahwa koloni bakteri yang tumbuh adalah *Streptococcus mutans*, maka perlu dilakukan serangkaian tes identifikasi, antara

lain; Tes pewarnaan gram, yang bertujuan untuk mengetahui bakteri tersebut merupakan bakteri gram positif atau bakteri gram negatif. Kemudian dilakukan tes katalase yang bertujuan untuk membedakan *Streptococcus* dengan *Staphylococcus*. Yang terakhir adalah tes optochin yang bertujuan untuk membedakan *Streptococcus mutans* yang merupakan bagian dari *Streptococcus viridans* dengan *Streptococcus pneumoniae*.

4.8.2.1 Pewarnaan Gram

- 1) Dibuat suspensi akuades dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan udara.
- 2) Sesudah kering difiksasi di atas api *bunsen*.
- 3) Sediaan dituangi kristal violet selama 1 menit.
- 4) Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- 5) Sediaan dituangi *lugol* selama 1 menit.
- 6) Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- 7) Sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik.
- 8) Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- 9) Sediaan dituangi *safranin* selama 0,5 menit.
- 10) Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- 11) Dikeringkan dengan kertas penghisap.
- 12) Diamati dengan mikroskop pembesaran 1000x dengan intensitas sinar rendah. *Streptococcus* menunjukkan adanya sel berbentuk kokus bersifat gram positif.

4.8.2.2 Tes Katalase

Tes ini bermaksud untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, yaitu dengan menambahkan larutan H₂O₂ 3% pada pembiakan

cair. *Streptococcus* akan memberikan hasil negatif yang ditunjukkan dengan tidak munculnya gelembung udara. Langkah-langkah tes *katalase* sebagai berikut:

- 1) Sediakan biakan cair *Streptococcus mutans* pada tabung reaksi.
- 2) Tetesi dengan 1 tetes H₂O₂ 3%.
- 3) Amati timbulnya gelembung-gelembung udara pada media pembiakan.

4.8.2.3 Tes *Optochin*

- 1) Menyiapkan *Chocolate Agar Plate* (CAP)
- 2) Melakukan *streaking Streptococcus mutans* pada CAP.
- 3) Letakkan *optochin disk* di tengah *inoculum* dengan penjepit steril.
- 4) Mengatur posisi *disk* dengan menekan *disk* pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan *disk* dalam agar.
- 5) Inkubasi selama 1 malam pada suhu 37⁰ C dalam inkubator.
- 6) Amati zona hambatan di sekeliling *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 positif dan diidentifikasi sebagai *Streptococcus pneumoniae*. *Streptococcus mutans* menunjukkan hasil reaksi negatif (resisten terhadap *optochin*).

4.8.3 Pembuatan Ekstrak Kulit Pisang

Pembuatan ekstrak metanol kulit pisang ambon sebagai berikut:

1. Timbang serbuk kulit pisang ambon sebanyak 600g.
2. Lakukan pembasahan serbuk dengan metanol 90% secukupnya
3. Masukkan serbuk yang telah dibasahi dengan pelarut ke dalam toples, diratakan dan sambil ditambahkan pelarut sampai bahan terendam, total

yang digunakan sebanyak 1500 ml. Tutup toples dengan rapat selama 24 jam dan diaduk di atas *shaker* digital 50 rpm.

4. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam *Erlenmeyer*.
5. Lakukan remaserasi dua kali pada ampas dengan cara dimasukkan kembali dalam toples dan ditambahkan pelarut sampai terendam (minimal 5 cm di atas permukaan serbuk). Kemudian biarkan semalam/ 24 jam dan diaduk di atas *shaker*. Masing-masing proses remaserasi menggunakan pelarut metanol 90% sebanyak 1000 ml.
6. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath*. Diperlukan waktu 5 jam untuk evaporasi.
7. Dari serbuk kulit pisang ambon 600 gr dan diekstraksi menggunakan pelarut metanol 90% sebanyak 3500 ml dihasilkan ekstrak sebanyak 55 ml.

4.8.4 Pemiakan Bakteri

Streptococcus mutans yang telah diidentifikasi dibiakan pada media cair dengan menggunakan *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) selama 1 x 24 jam pada suhu 37° C.

4.8.5 Pembuatan Suspensi Uji *Streptococcus mutans* 10⁸ cfu/ml

- 1) Ambil 5 koloni (diameter ≥ 1 mm) dengan ose.
- 2) Koloni tersebut dimasukan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril.

- 3) Dilakukan penyetaraan dengan mengukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optis dengan *spectrophotometer* pada $\lambda = 625 \text{ nm}$ (Murray *et al.*, 1999).
- 4) Apabila belum setara, dilakukan pengenceran menggunakan rumus

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan:

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_2 = *Optical density* ($0,1 = 10^8 \text{ CFU/ml}$)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

- 5) Dari hasil yang diperoleh dibuat pembiakan cair bakteri yang mengandung $1 - 5 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$.

4.8.6 Prosedur Uji Antibakteri Ekstrak Metanol Kulit Pisang Ambon Muda Menggunakan Metode *Difusi Sumuran*

Menyiapkan cawan petri yang berisi agar *Brain Heart Infusion* (BHI) yang sudah dicampurkan dengan biakan bakteri *Streptococcus mutans* yang telah disetarakan kekeruhannya dengan larutan standar *Mc Farland* 0,5 sebanyak 100 μl . Pada agar *Brain Heart Infusion* (BHI) dibuat 4 lubang sumuran dengan menggunakan perforator dengan masing-masing berdiameter 6 mm. Setelah itu dimasukkan 50 μl ekstrak kulit pisang ambon muda dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 100% sebagai kontrol bahan, aquades sebagai kontrol bakteri dengan tahapan sebagai berikut :

1. Ambil bakteri sebanyak 10 μl dengan menggunakan mikropipet kemudian dituangkan pada cawan petri yang berisi BHIA dan diratakan dengan menggunakan *spreader*.

2. Setelah suspensi bakteri diratakan dengan pada BHIA, pada setiap cawan petri dibuat 4 lubang sumuran dengan diameter 6 mm menggunakan perforator.
3. Masing-masing lubang sumuran pada *plate* dengan satu konsentrasi sehingga mewakili 4 pengulangan dan masing-masing diberi label. *Plate* pertama berisi 20-30 μ l akuades sebagai kontrol kuman, *plate* kedua berisi larutan ekstrak metanol kulit pisang ambon dengan konsentrasi 3,125%, *plate* ketiga berisi konsentrasi 6,25%, *plate* keempat berisi konsentrasi 12,5%, *plate* kelima berisi konsentrasi 25%, *plate* keenam berisi konsentrasi 50% dan *plate* ketujuh berisi konsentrasi 100%.
4. Setelah semua lubang berisi larutan, cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C suasana anaerob.
5. 24 jam setelah dilakukan inkubasi, zona inhibisi yang terbentuk dapat diukur dengan menggunakan jangka sorong.

4.8.7 Pengamatan dan Pengukuran

Larutan yang diletakkan di dalam sumuran akan memberikan suatu zona bebas bakteri mengelilingi daerah sumuran dimana luasnya zona berbanding lurus pada kekuatan sampel dalam menghambat bakteri. Zona inhibisi yang dihasilkan mempunyai bentuk lingkaran dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,01 satuan milimeter (mm). Pengukuran diameter zona inhibisi dilakukan sebanyak 4 kali (arah vertikal, horizontal, dan dua arah diagonal) dan dihitung rata-ratanya. Diameter diukur dari batas terluar dari zona inhibisi dari satu sisi ke sisi lainnya.

4.9 Analisis Data

Data hasil pengujian anti bakteri dianalisis dengan memakai uji statistik sebagai berikut (Nisbet *et al.*, 2009):

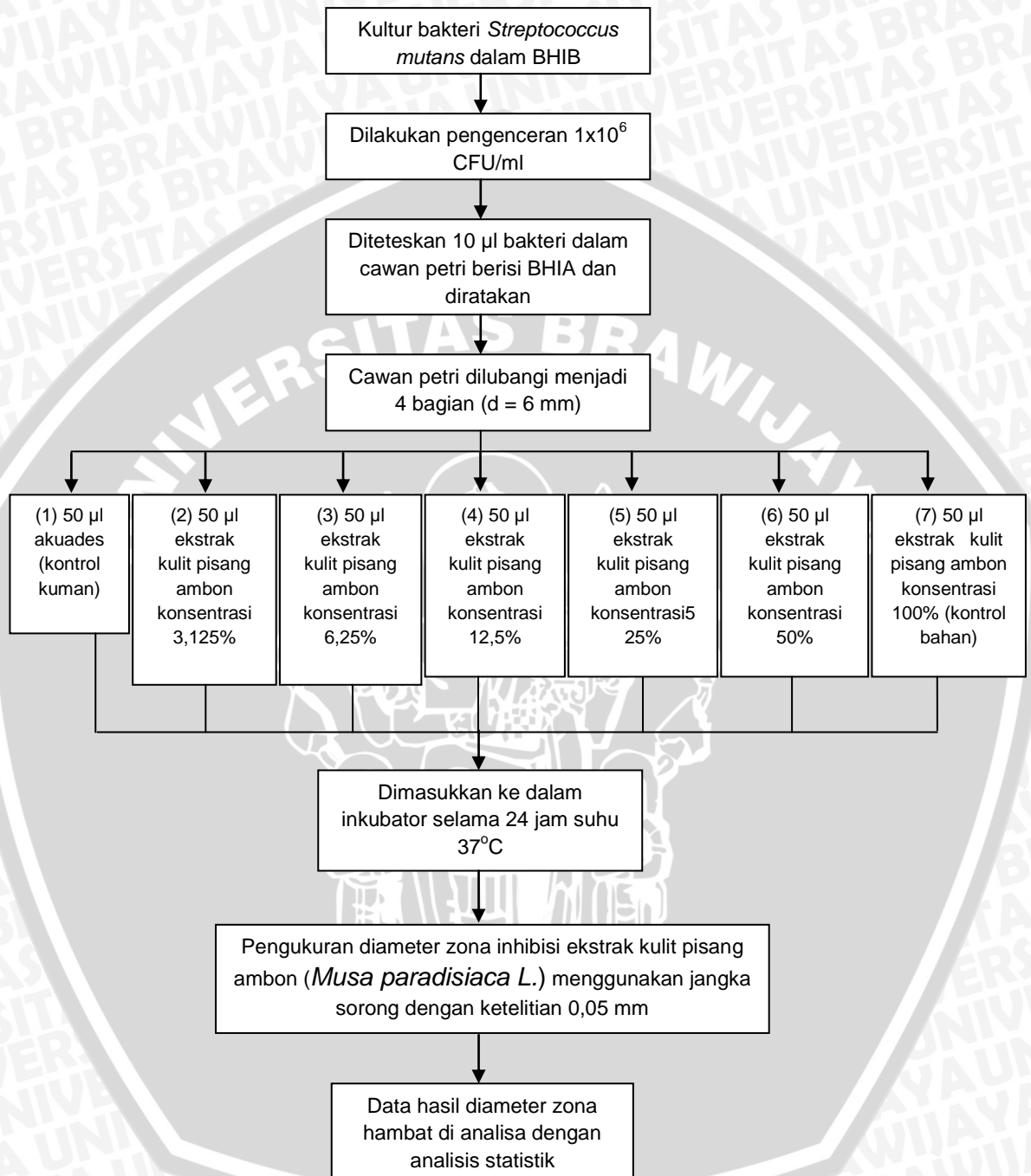
- 1) Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov (Uji K-S) untuk mendeteksi normalitas dari suatu data.
- 2) Uji Homogenitas (Levene) untuk mengetahui kesamaan atau homogenitas varian dari beberapa populasi.

Apabila hasil menunjukkan data berdistribusi normal dan homogen, maka dapat dilakukan uji komparasi, korelasi, dan regresi dengan menggunakan uji sebagai berikut:

- 1) Uji analisis varian satu arah (ANOVA), untuk melihat perbedaan efek antibakteri ekstrak metanol kulit pisang ambon terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*.
- 2) Uji korelasi (Pearson) untuk mengetahui hubungan jumlah konsentrasi ekstrak metanol kulit pisang ambon dengan pertumbuhan *Streptococcus mutans*.
- 3) Uji regresi untuk mengetahui besarnya hubungan dari efek antibakteri ekstrak metanol kulit pisang ambon dengan pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

Uji statistik dilakukan pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$)

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian

Keterangan:
d = diameter