

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan rancangan *true experimental* untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis var. assamica*) terhadap pembentukan biofilm pada bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *tube-test* (metode tabung).

4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm. Sampel ini diperoleh dari isolat *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm yang didapat dari swab beku BBLK Yogyakarta. Jumlah pengulangan penelitian dihitung dengan rumus sebagai berikut (Notobroto, 2005):

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

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \approx 4$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak teh hijau): 0 (kontrol), 20%, 25%, 30%, 35%, dan 40% = 6 perlakuan

Berdasarkan hasil penghitungan menggunakan rumus tersebut, minimal harus dilakukan 4 kali pengulangan pada penelitian ini.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak teh hijau. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 0 (kontrol), 20%, 25%, 30%, 35%, dan 40% (Andiyani, 2014).

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilmyang diukur dengan metode *tube-test*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September 2015 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan ekstrak daun teh hijau dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia ,Gedung AQ, Politeknik Negeri Malang, Malang Kota.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Teh hijau

1. Teh hijau (*Camelia sinensis* var. *assamica*)
2. Etanol 96%
3. Timbangan analitik
4. Gelas kimia 250 ml
5. Sokhet
6. Cawan petri
7. Penjepit cawan petri
8. Desikator
9. Spatula
10. Pemanas aquades
11. Kertas saring
12. Thimble
13. Oven

4.5.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Isolat *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
2. Bahan tes Katalase : H₂O₂ 3 %
3. Bahan pengecatan Gram : lugol, kristal violet, safranin, dan alkohol 96 %
4. Minyak imersi, mikroskop , dan ose
5. Medium Agar
6. Lampu spiritus
7. Tabung reaksi

4.5.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. TSB + *glycerol* 10%
2. Biakan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm
3. Tabung reaksi
4. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) PH 7,3
5. *Deionized water*
6. Kristal violet
7. Pipet
8. Ose
9. *Beaker glass*
10. Inkubator

4.6 Definisi Operasional

1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah bakteri gram negatif yang banyak ditemukan pada jaringan periodontal manusia dan merupakan penyebab utama periodontitis. Sampel ini diperoleh dari isolat *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm yang didapat dari swab beku BBLK Yogyakarta.
2. Biofilm adalah agregat multiseluler yang akan membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat atau medium. Pada penelitian ini biofilm dibentuk oleh *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan medium tabung.
3. Ekstrak teh hijau adalah hasil ekstraksi cair teh hijau dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Teh hijau berasal dari teh kemasan bernama "Teh Cap

Kepala Djenggot” produksi PT. Gunung Subur Sejahtera, Karanganyar, Solo, Jawa Tengah.

4. Metode tabung adalah metode deteksi biofilm dengan menggunakan tabung sebagai medium yang bersifat kualitatif.
5. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi ekstrak teh hijau terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm yang ditandai dengan terjadinya penipisan bentuk cincin dan lapisan ungu kebiruan yang terdapat pada dinding dan dasar tabung.
6. *Mean Gray Value* adalah acuan skala intensitas warna yang terdapat pada program *Adobe Photoshop CS3*. Skala berkisar antara 0-255. Angka mendekati 0 menunjukkan kepekatan warna yang tinggi. Sedangkan angka mendekati 255 menunjukkan kepekatan warna yang rendah (Andiyani, 2014).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Teh hijau (*Camellia sinensis var. assamica*)

4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi

1. Dilakukan penelitian pendahuluan digunakan untuk pencarian konsentrasi. Diawali dengan konsentrasi ekstrak 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, dan 0%. Setelah itu dilakukan perapatan konsentrasi berdasarkan hasil dari penelitian tersebut dan dilakukan pengulangan 4x pada rentang konsentrasi tertentu.
2. Teh hijau kering seberat 100 gram ditimbang dalam neraca analitik.
3. Teh hijau tersebut diletakkan dalam thimble atau selongsong tempat sampel dan dimasukkan dalam ekstraktor sokhlet.
4. Labu yang sudah berisi etanol 96% lalu dihubungkan dengan sokhlet.

5. Kondensor dihubungkan juga dengan sokhlet dan dipasang selang air
6. Buka aliran air sehingga selang air akan terisi dan berfungsi sebagai pendingin. Nyalakan alat pemanas listrik yang ditempatkan di bawah labu, dan proses ekstraksi dimulai.
7. Uap dari hasil didihan pelarut atau etanol 96% akan berjalan melalui sokhlet menuju kondensor, dan di sana akan kembali menjadi fase cair karena terdapat proses pendinginan yang disebabkan oleh adanya aliran air. Fase cair ini nantinya akan menetes ke thimble dan melarutkan lemak sampel sehingga sari atau tetesan ekstrak akan mengalir menuju labu. Proses ini berlangsung selama \pm 5 jam.
8. Pelarut atau etanol 96% dipisahkan dari ekstrak dengan cara melepas thimble dan dilanjutkan dengan proses destilasi dengan cara yang sama dengan ekstraksi sokhlet sehingga ekstrak yang diperoleh menjadi lebih pekat selanjutnya dengan memindahkan ekstrak ke dalam botol timbang.
9. Kemudian untuk memastikan bahwa hasil ekstrak sudah tidak terkandung pelarut atau etanol 96%, hasil ekstrak harus dioven dengan suhu 70^o-80^oC hingga aroma etanol tidak tercium dan diperoleh bobot konstan, sehingga didapatkan ekstrak kental (konsentrasi 100%) (Retno, 2012).

4.7.2 Persiapan Biofilm *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

4.7.2.1 Identifikasi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. Pemeriksaan Mikroskopis

Pembuatan sediaan slide

1. *Object glass* dibersihkan dahulu dengan kapas, dilanjutkan fiksasi dengan dilewatkan di atas api dan biarkan dingin sehingga *object glass* menjadi

steril dari bahan pencemar lain. Kemudian pembuatan sediaan yang tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis dengan cara:

2. Teteskan satu ose aquades steril pada gelas objek. Ambil sedikit biakan kuman menggunakan ose, kemudian suspensikan dengan aquades pada gelas objek dan ratakan. Khusus sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
3. Biarkan sediaan kering di udara, kemudian lakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api satu atau dua kali (Forbes *et al*, 2007).

B. Pewarnaan Gram

1. Tuang sediaan pada gelas objek dengan kristal violet dengan durasi 1 menit. Buang sisa kristal violet dan bilas dengan air.
2. Tuang sediaan dengan lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
3. Tuang sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas lagi dengan air.
4. Tuang sediaan dengan safranin selama ½ menit. Buang sisa safranin dan bilas lagi dengan air
5. Keringkan sediaan dengan kertas penghisap
6. Lihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x (Cahyani, 2013).

C. Tes Katalase

1. Tuangkan 0,2 mL H₂O₂ 3 % ke dalam tabung reaksi.
2. Ambil sedikit biakan bakteri dengan ose.
3. Usapkan ose pada dinding tabung tepat di atas permukaan cairan.

4. Tutup tabung reaksi, lalu goyang -goyangkan agar cairan H₂O₂ 3 % dapat mengenai usapan biakan bakteri.
5. Amati pembentukan gelembung dalam waktu 10 detik.
6. Hasil positif bila ada gelembung.
7. Hasil negatif bila tidak ada gelembung (Santoso, 2013).

D. Tes Urease

- a. Bakteri yang akan diuji diambil dengan menggunakan ose.
- b. 1 ose koloni bakteri kemudian digoreskan secara zig zag pada media urea.
- c. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian lakukanlah pengamatan.
- d. Interpretasi: hasil negatif yaitu warna media tidak berubah menjadi merah muda (Aneja, 2003).

E. Perbenihan Pada Agar MacConkey

Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diinokulasi pada medium agar MacConkey dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam kemudian dilanjutkan pengamatan pada hasilnya. Bila warna media telah berubah menjadi merah artinya bakteri uji menfermentasi laktosa (Sudjatmoko, 2014).

F. Uji Biokimia

Suatu koloni terpisah yang terdapat pada biakan agar Mac Conkey diambil dengan ose lurus kemudian ditanamkan dengan cara menusuk sampai dekat dasar tabung. Kemudian ose digoreskan secara zigzag pada permukaan media agar TSI (*Triple Sugar Iron*) lalu diinkubasi pada suhu 37°C. Setelah 18-24 jam amati hasilnya. Hasilnya *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* hanya

dapat menfermentasi glukosa sehingga media bagian *slant* bewarna merah dan bagian *butt* akan bewarna kuning (Aneja, 2003).

4.7.2.2 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

Aggregatibacter actinomycetemcomitans yang sudah diidentifikasi kemudian dikultur dalam media TSB + *glycerol* 10%. selama 24 jam dalam inkubator 37°C. Suspensi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada media TSB + *glycerol* 10%. akan dilakukan pengukuran spektrofotometri dengan panjang gelombang (λ) 610nm sehingga diketahui kepadatan bakterinya (OD = *Optical density*) yang setara dengan kepadatan bakteri 10^8 bakteri/mL. Kemudian dengan rumus pengenceran $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$, kepadatan bakteri tersebut dicampur dengan TSBglu (Andiyani, 2014).

4.7.2.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (Metode *Tube-test*)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans yang sudah teridentifikasi disimpan dalam media TSB + *glycerol* 10%. dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Mikroba kultur semalam selanjutnya dimasukkan ke tabung TSBglu (10 ml) dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam. Selanjutnya tabung di cuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*. Hingga akhirnya tabung dikeringkan dan dilihat formasi biofilmnya. Formasi biofilm ini ditandai dengan adanya cincin berwarna ungu kebiruan yang melekat pada dinding tabung (Christensen *et al.*, 2000).

4.7.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pada *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

1. Menyiapkan perbenihan cair perbenihan bakteri dengan konsentrasi bakteri 1×10^8 CFU/ml.

2. Membuat suspensi bakteri dalam medium *TSB + glycerol* 10 %. berdasarkan perhitungan OD dari spektrofotometri.
3. Mengisi tabung reaksi 1-6 dengan suspensi bakteri dalam medium *TSB + glycerol* 10 % 2 ml, dan satu tabung lainnya (kontrol) diisi 4ml.
4. Kemudian 2 ml larutan ekstrak dalam tiap tabung kecil dicampurkan dalam tabung reaksi 1-6 sehingga didapatkan larutan sebanyak 4 ml dengan konsentrasi ekstrak daun teh hijau pada masing-masing tabung sebagai berikut:

Tabung 1: 0% (kontrol)

Tabung 4: 30%

Tabung 2: 20%

Tabung 5: 35%

Tabung 3: 25%

Tabung 6: 40%

5. Seluruh tabung diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C.
6. Setelah 24 jam, tabung dikeluarkan dari inkubator dan dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya.
7. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) 0,5 ml lalu kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*.
8. Tabung dikeringkan.

Biofilm yang terbentuk segera diamati dan dicatat (Cahyani, 2013). Dapat terlihat sebuah film melapisi sisi dan dasar tabung. Hal ini diyakini sebagai indikasi pembentukan biofilm. Jumlah biofilm dinilai sebagai 0 = tidak ada, 1 = lemah, 2 = sedang atau 3 = kuat (Praharaj *et al.*, 2013).

4.7.4 Pengukuran *Mean Gray Value*

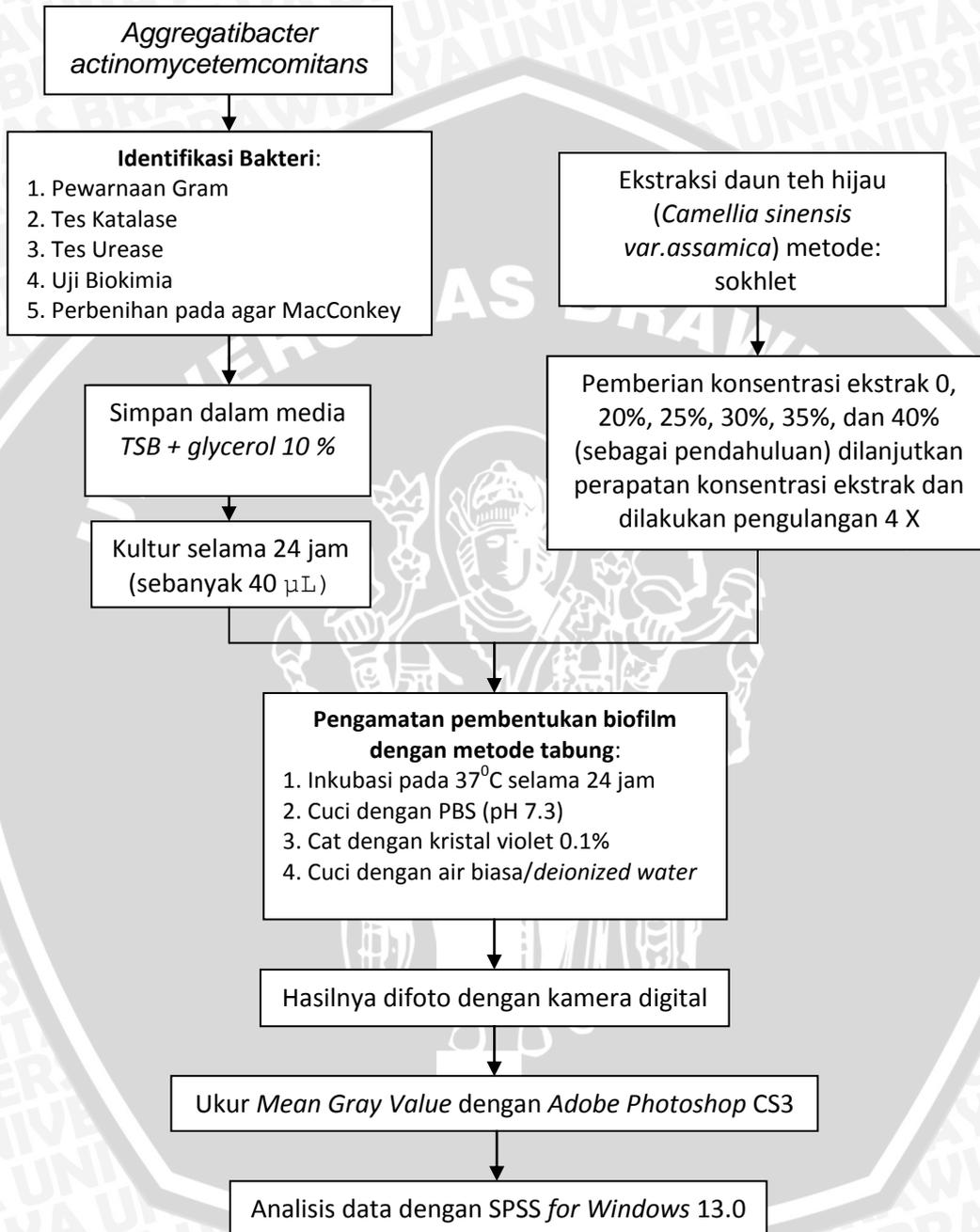
Hasil pembentukan biofilm pada tabung kemudian difoto dengan menggunakan kamera digital. Untuk mengetahui intensitas warna pada area cincin dan dinding tabung pada masing-masing kelompok maka digunakan

program aplikasi *Adobe Photoshop CS3*. *Mean Gray Value* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Semakin rendah nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tebal, sementara semakin tinggi nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tipis. Langkah-langkah dimulai dengan membuka *Photoshop CS3*, pilih *File* dan masukkan hasil fotonya. Selanjutnya pilih *tab Window* dan pilih *Measurement Log*, blok area yang akan dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool*, lalu klik *Record Measurements* maka akan didapatkan nilai *Mean Gray Value* yang merupakan rata-rata dari intensitas warna pengecatan tabung (Andiyani, 2014).

4.8 Analisis Data

Analisis hasil penelitian menggunakan analisis statistik SPSS versi 15.0 untuk *Windows*. Langkah pertama, hasil *Mean Gray Value* yang didapat seperti pada Tabel 5.2. dianalisis dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Uji ini merupakan bagian dari teknik pengujian normalitas suatu distribusi data. Uji normalitas data adalah hal yang lazim dilakukan sebelum sebuah metode statistik. Uji normalitas ini merupakan salah satu bagian dari uji persyaratan analisis data atau biasa disebut asumsi klasik. Tujuan uji normalitas adalah untuk mengetahui apakah distribusi sebuah data mengikuti atau mendekati distribusi normal, yakni distribusi data yang mempunyai pola seperti distribusi normal. Pada aplikasinya, uji ini guna mengetahui korelasi antara peningkatan konsentrasi ekstrak teh hijau terhadap ketebalan yang terdeteksi melalui *Mean Gray Value*. Kemudian analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 13.0 (Dahlan, 2009).

4.9 Rancangan Operasional Penelitian



Bagan 4.1 Rancangan Operasional Penelitian