

BAB 5

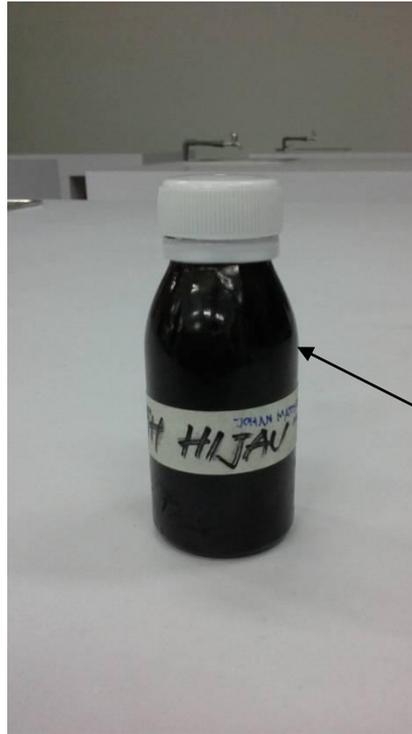
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang didapat dari *swab* beku BBLK Yogyakarta. Tiap isolat *A.actinomycetemcomitans* diinokulasi di medium hemolisis selama 24 jam dan diidentifikasi. Setelah itu dilakukan uji deteksi pembentukan biofilm dengan dilusi tabung. Lalu dilakukan pemilihan isolat bakteri *A.actinomycetemcomitans* strain pembentuk biofilm yang kemudian diberi ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi berbeda sebanyak 4 kali pengulangan pada uji dilusi tabung.

5.1.1 Hasil Ekstraksi Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis var. assamica*)

Teh hijau yang awalnya berupa daun kering telah dihaluskan menjadi bentuk bubuk diletakkan dalam *thimble* atau tempat sampel yang digunakan pada alat sokhlet. Selanjutnya etanol 96% dididihkan sehingga uapnya akan naik melewati sokhlet menuju pipa pendingin dan kembali ke fase cair dan menetes ke *thimble* lalu lemak dalam teh hijau terlarut dan didapatkan larutan ekstraknya. Proses ini akan berlangsung selama 6 jam hingga akhirnya senyawa aktif benar-benar telah terpisah dari bahan asalnya. Setelah proses ekstraksi selesai, sisa pelarut pada ekstrak dihilangkan dengan cara dioven pada suhu 70⁰-80⁰C hingga diperoleh hasil bobot konstan ekstrak.

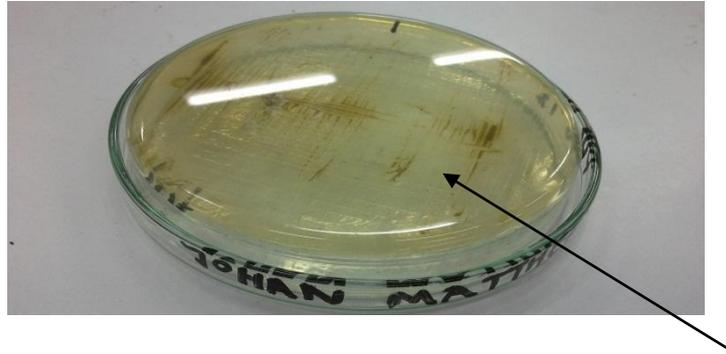


Gambar 5.1 Hasil Ekstraksi Daun Teh Hijau pada Botol

Keterangan: tanda panah menunjukkan cairan ekstrak teh hijau berwarna hijau tua kehitaman dan pekat

5.1.2 Uji Sterilitas Ekstrak DaunTeh Hijau (*Camellia sinensis var. assamica*)

Metode cawan gores untuk uji sterilitas teh hijau bertujuan untuk melihat apakah ekstrak teh hijau yang akan digunakan terkontaminasi atau tidak terkontaminasi. Media agar pada cawan di gores ekstrak teh hijau lalu di inkubasi selama 24 jam. Selanjutnya dilihat bahwa hasilnya tidak tampak gambaran noda berwarna putih. Hal ini menunjukkan bahwa teh hijau tidak terkontaminasi.



Gambar 5.2 Hasil Uji Sterilitas Ekstrak DaunTeh Hijau pada Cawan
Keterangan : tanda panah menunjukkan tidak tampak gambaran koloni mikroba berwarna putih, hal ini menandakan bahwa ekstrak teh hijau tidak terkontaminasi

5.1.3 Hasil Identifikasi Bakteri

5.1.3.1 Uji Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram menunjukkan bakteri *A. actinomycetemcomitans* merupakan gram negatif yang ditandai dengan warna merah pada sel bakteri dan berbentuk batang.

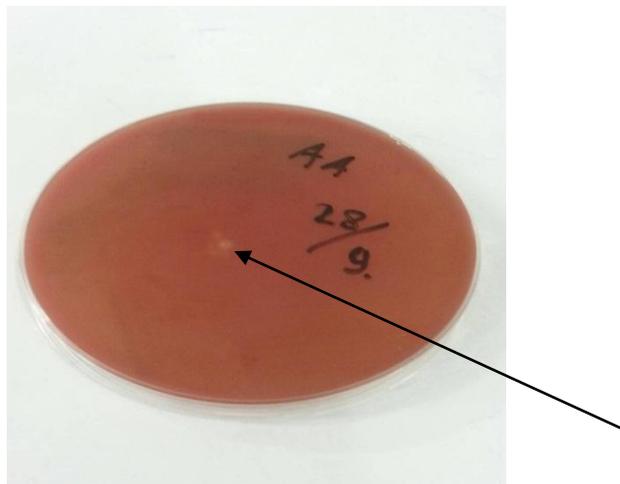


Gambar 5.3 Pewarnaan Gram Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
(Kokobasil, Gram negatif, perbesaran 1000x)

Keterangan: tanda panah menunjukkan bentuk batang yang menandakan bahwa biakan ini merupakan koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

5.1.3.2 Uji Hemolisis

Pada pengembangan di medium hemolisis pada *BAP* sebagian, bakteri menunjukkan tidak ada reaksi. Hal ini menunjukkan koloni tampak berwarna coklat atau tidak menunjukkan perubahan warna seperti tampak pada Gambar 5.4. Dari hasil biakan pada hemolisis ini dapat diambil kesimpulan bahwa biakan tersebut tidak ada hemolisis dan merupakan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

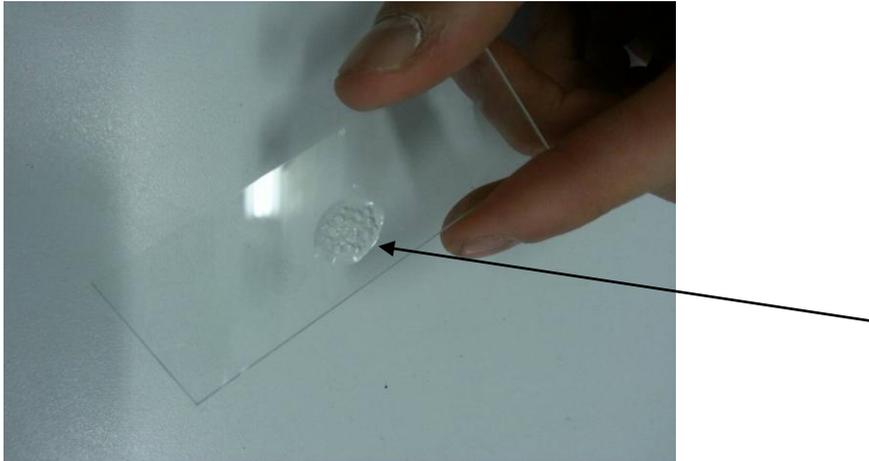


Gambar 5.4 Lingkaran Putih dikelilingi Koloni Berwarna Coklat pada Medium Agar Darah yang Menunjukkan Koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Keterangan: tanda panah menunjukkan koloni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bulat putih tanpa terbentuk zona inhibisi disekitar koloni. Hal ini menandakan tidak ada hemolisis

5.1.3.2 Uji katalase

Pada pengembangan di medium katalase, bakteri menunjukkan hasil positif melalui munculnya gelembung - gelembung udara ketika bakteri ditetesi dengan larutan H₂O₂ konsentrasi 3 % seperti tampak pada Gambar 5.5. Dari hasil uji katalase ini dapat diambil kesimpulan bahwa biakan tersebut merupakan bakteri *A.actinomycetemcomitans*.

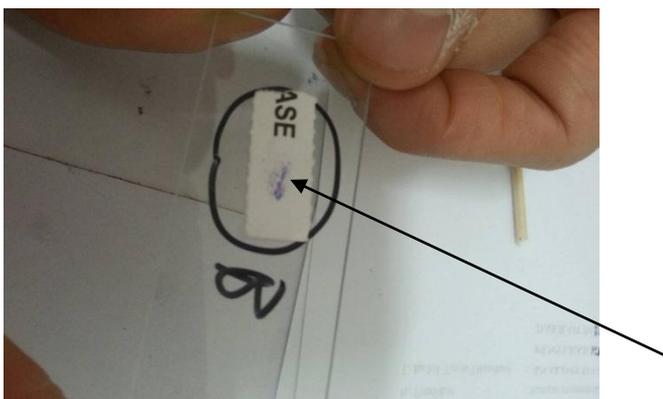


Gambar 5.5 Uji Katalase Bakteri pada Gelas Objek

Keterangan : tanda panah menunjukkan gelembung - gelembung udara yang tampak, maka dapat disimpulkan bahwa biakan ini merupakan koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

5.1.3.4 Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan melalui cara sampel koloni bakteri dimasukkan ke dalam dua buah tabung yang berisi media uji oksidase. Salah satu tabung ditambahkan dengan parafin, kemudian kedua tabung ditutup. Tabung uji oksidase diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam, hasil yang diperoleh dapat langsung diamati.



Gambar 5.6 Uji Oksidase pada Kertas Strip

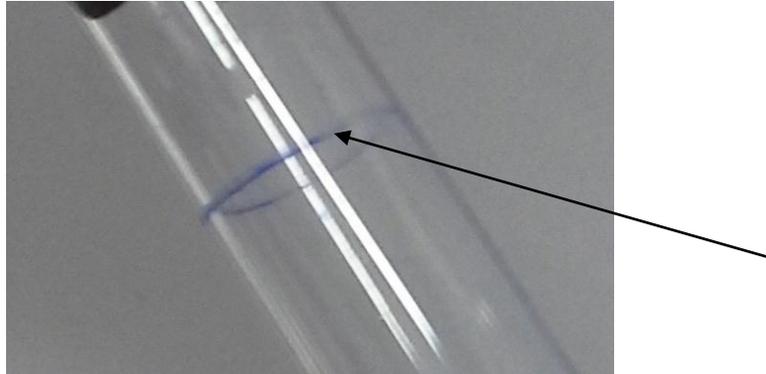
Keterangan: tanda panah menunjukkan warna keunguan pada kertas strip yang menandakan bahwa biakan ini hasil positif dan merupakan koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

5.1.3.5 Uji Reaksi Biokimia

Hasil uji reaksi biokimia menggunakan *Microbact Kit 24E* menunjukkan hasil uji indole, urease, citrate, lysine, ornithine dan arginine negatif, sementara fermentasi glukosa positif, fermentasi laktosa dan sukrosa menunjukkan hasil negatif. Selain itu, ONPG menunjukkan hasil positif dan sorbitol, arabinose, raffinose dan salicin menunjukkan hasil negatif dimana evaluasi hasil tersebut diperoleh dengan cara membandingkan dengan tabel warna. Dari hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa uji biokimia menunjukkan identifikasi dari *A. actinomycetemcomitans*. Hasil uji *Microbact Kit 24E* terdapat 14 indikator warna pada gambar 5.7 seperti tampak pada lampiran 1.

5.1.4 Hasil Uji Pembentukan Biofilm

Setelah dipastikan koloni pada medium hemolisis merupakan koloni *A. actinomycetemcomitans*, maka dilakukan uji pembentukan biofilm. Pada mulanya *A. actinomycetemcomitans* yang sudah teridentifikasi tersebut disimpan dalam media TSB + *glycerol* 10%. Sebelum dilakukan uji pembentukan biofilm, bakteri yang sudah tumbuh pada media tersebut perlu dikultur semalam. Selanjutnya hasil kultur bakteri (sebanyak 40 μ L) diinkubasi ulang pada tabung TSBglu (10 ml) pada suhu 37°C selama 24 jam untuk menampung pembentukan biofilm. Uji pembentukan biofilm ini dilakukan dengan cara menginokulasi koloni *A. actinomycetemcomitans* pada tabung TSBglu. Setelah 24 jam, lalu tabung dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Selanjutnya tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*. Bakteri dapat dipastikan membentuk biofilm jika menghasilkan bentukan cincin berwarna keunguan pada dinding di medium cair tersebut.

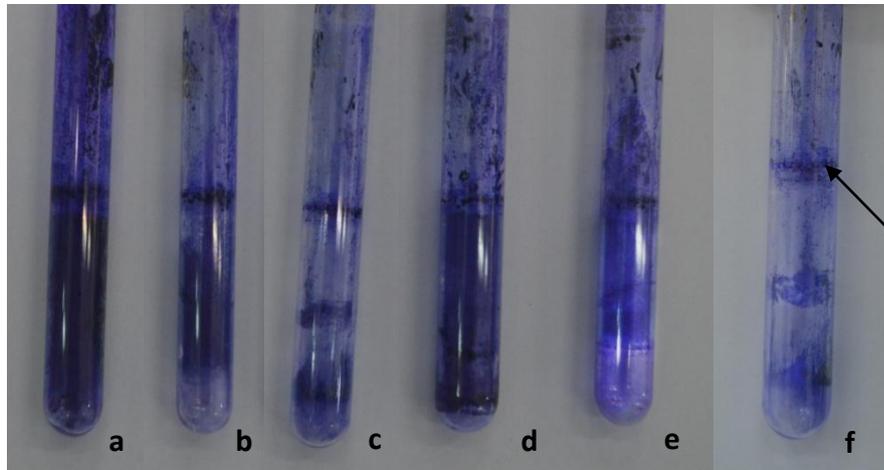


Gambar 5.8 Bentuk Cincin Biofilm pada Media Tabung

Keterangan: tanda panah menunjukkan bentuk cincin biofilm berwarna ungu dari *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada media tabung TSBglu setelah dicat dengan kristal violet 0,1%

5.1.5 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Sebelum ditentukan konsentrasi yang akan digunakan, dilakukan uji pendahuluan yakni koloni diberikan ekstrak dengan konsentrasi berbeda. Adapun konsentrasi tersebut 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 0% (kontrol). Kemudian dari hasil penelitian pendahuluan tersebut ditentukan konsentrasi terendah yang memiliki daya hambat terhadap konsentrasi ekstrak daun teh hijau yang mampu menghasilkan pembentukan biofilm yang selanjutnya akan dilakukan uji sesungguhnya. Pada penelitian pendahuluan ini, didapat konsentrasi yang paling rendah adalah dibawah 20 % (Gambar 5.9).

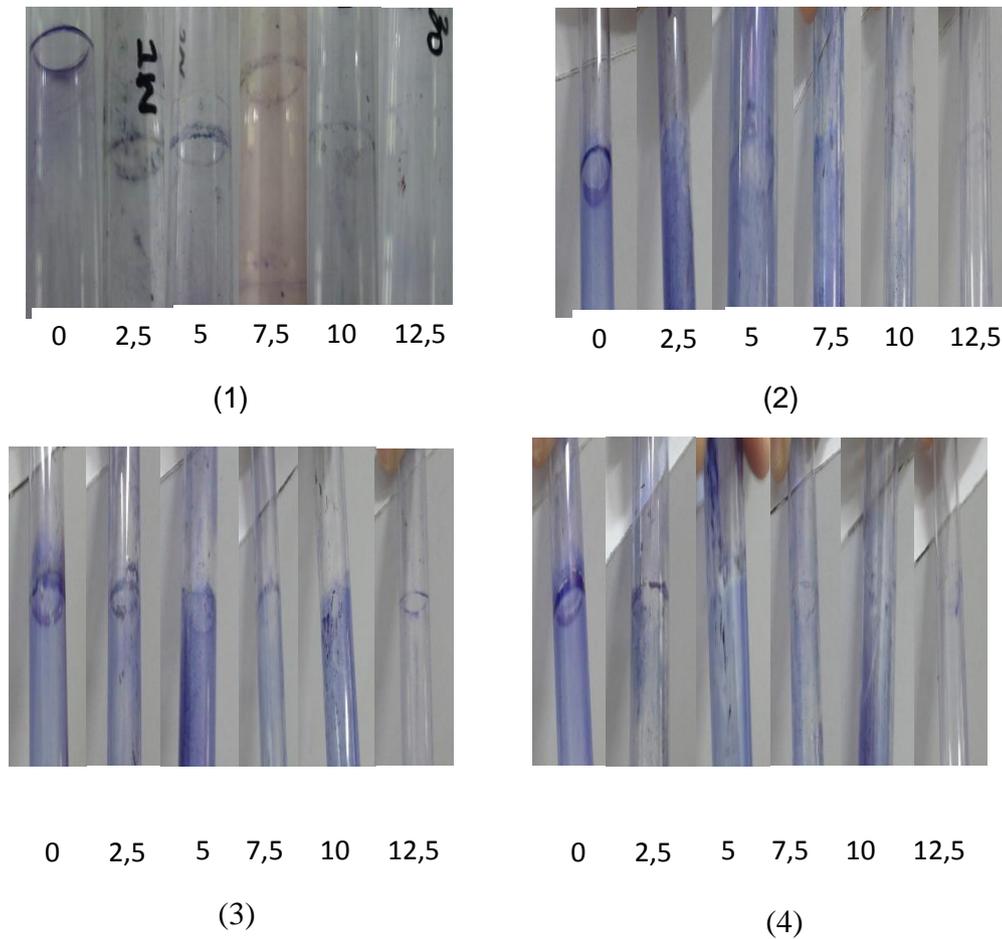


Gambar 5.9 Daya Hambat Berbagai Konsentrasi Ekstrak Teh Hijau terhadap Pembentukan Biofilm Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Keterangan : tanda panah menunjukkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi, maka ketebalan cincin semakin tipis. Biofilm ditandai dengan cincin berwarna biru pada tabung. Pada penelitian I-IV, didapatkan tabung dengan pemberian konsentrasi 40 % menghasilkan cincin biofilm paling tipis.

a = konsentrasi ekstrak teh hijau 0%	—————>	tampak cincin sangat tebal
b = konsentrasi ekstrak teh hijau 20%	—————>	tampak cincin tebal
c = konsentrasi ekstrak teh hijau 25%	—————>	tampak cincin sedang
d = konsentrasi ekstrak teh hijau 30%	—————>	tampak cincin sedang
e = konsentrasi ekstrak teh hijau 35%	—————>	tampak cincin tipis
f = konsentrasi ekstrak teh hijau 40%	—————>	tampak cincin sangat tipis

Penelitian sesungguhnya dilakukan berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang mengarah ke angka dibawa 20%. Kemudian dilakukan uji hambat biofilm *A.actinomycetemcomitans* dengan 7,5% sebagai mediannya, dan 2,5% sebagai intervalnya. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5% serta konsentrasi 0% sebagai kontrol. Pengamatan hasil penelitian ditandai dengan tebal tipisnya biofilm yang akan terbentuk pada dinding tabung. Dalam penelitian ini biofilm ditunjukkan dengan cincin berwarna biru. Hasil uji hambat dapat dilihat pada Gambar 5.10



Gambar 5.10 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pengulangan 1-4 (Konsentrasi dalam Persen)

Keterangan: Biofilm ditandai dengan cincin berwarna biru pada tabung. Pada penelitian I-IV, didapatkan tabung dengan pemberian konsentrasi 12,5% menghasilkan cincin biofilm paling tipis.

Pemeriksaan ini bertujuan untuk melihat ketebalan biofilm secara kualitatif selanjutnya diperlukan pemeriksaan untuk melihat ketebalan biofilm secara kuantitatif, yakni menggunakan aplikasi *Adobe Photoshop CS5* melalui metode *Mean Gray Value*. Hasil pembentukan biofilm secara kualitatif pada penelitian I-IV dapat dilihat dalam Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Pengamatan Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Pengulangan	0%	2,5%	5%	7,5%	10%	12,5%
1	+++++	++++	+++	+++	++	+
2	+++++	++++	+++	+++	+++	+
3	+++++	++++	+++	++	++	+
4	+++++	+++++	++++	+++	++	+

Keterangan:

+ = ketebalan biofilm (metode kualitatif)

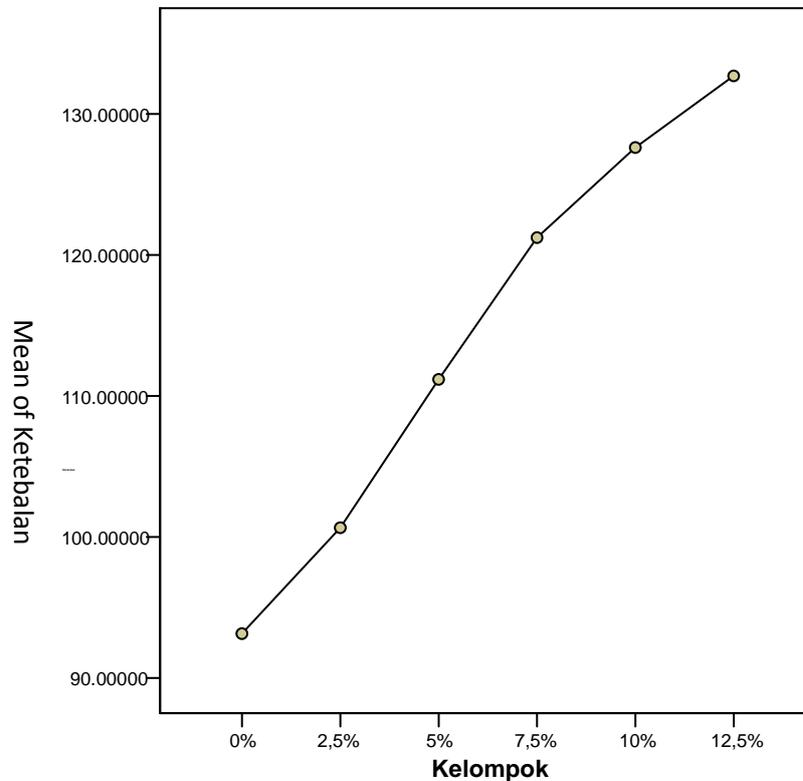
Kemudian dilakukan juga pengamatan secara kuantitatif untuk menilai intensitas warna pada masing-masing tabung yang terbentuk biofilm. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS5* dengan mencari *Mean Gray Value* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Hasil pengukuran selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.2 dan Gambar 5.11.

Tabel 5.2 Hasil Pengukuran Intensitas Warna Biofilm (*Mean Gray Value*)

Kon sentrasi	Replikasi				Rerata ± SD
	I	II	III	IV	
0%	87,573232	92,832389	9,287914	96,867316	92,139±1,0021
2,5%	95,176842	96,990810	102,63952 1	107,77646 2	98,544±2,1019
5%	122,18310 8	100,99420 3	104,36571 4	117,13913 8	108,170±3,000 5
7,5%	130,72590	117,18967 3	119,02482 8	117,96799 5	116,115±5,112 0
10%	139,21643 3	127,79485 0	122,94515 9	120,49960 0	120,402±7,212 0
12,5%	147,55300 1	130,85080 0	125,39796 4	126,97124	125,371±7,322 3

Keterangan: Semakin kecil nilai *Mean Gray Value* mencerminkan biofilm yang terbentuk masih tebal atau pekat. Sebaliknya, nilai *Mean Gray Value* yang tinggi mencerminkan biofilm yang terbentuk sudah tipis atau terhambat

Means Plots



Gambar 5.11 Grafik Pengukuran Mean Gray Value

5.2 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 *One Way ANOVA*. Uji *One Way ANOVA* ini digunakan untuk memastikan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok data. Kemudian analisis dilanjutkan dengan *Post-Hoc Multiple Comparison Test* metode *LSD* untuk mengetahui signifikansi suatu kelompok data terhadap masing-masing kelompok data lainnya. Setelah itu dilakukan pula uji Korelasi *Pearson* untuk mengetahui korelasi antara peningkatan konsentrasi ekstrak teh hijau terhadap ketebalan yang terdeteksi melalui *Mean Gray Value*.

5.2.1 Uji *One Way ANOVA*

Sebelum dilakukan uji *One Way ANOVA*, terdapat dua syarat yang harus terpenuhi untuk data > 2 kelompok tidak berpasangan. Yakni sebaran data harus normal dan varians data pun harus sama. Untuk memenuhi persyaratan pertama yaitu sebaran data yang normal, maka dilakukan uji normalitas. Sementara untuk memenuhi persyaratan kedua yaitu varians yang sama, maka dilakukan uji homogenitas. Dari uji normalitas yang telah dilakukan, didapatkan data memenuhi syarat dengan $p=0,2$ (uji Kolmogorov-Smirnov, $p > 0,05$) yang berarti sebaran data normal. Kemudian pada uji homogenitas, didapatkan data memenuhi syarat dengan $p= 4$ (syarat terpenuhi jika $p > 0,05$). Dari kedua uji tersebut maka didapatkan bahwa semua syarat uji *One Way ANOVA* terpenuhi.

Setelah semua syarat terpenuhi maka dilakukan uji *One Way ANOVA*. Dari hasil uji tersebut didapatkan $p = 0,000$. Hasil ini dapat diartikan terdapat sedikitnya dua kelompok data yang memiliki perbedaan *Mean Gray Value* secara signifikan (syarat $p < 0,05$). Rincian hasil terdapat dalam Lampiran 3.

5.2.2 Uji *Post Hoc Multiple Comparison Test (HSD)*

Uji *Post Hoc Multiple Comparison* digunakan untuk mengetahui signifikansi masing-masing kelompok data satu dengan lainnya. Metode *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Tukey HSD*. Perbedaan dianggap signifikan jika nilai $p < 0,05$ pada masing-masing kelompok data. Adapun penjabaran dari hasil yang terlampir pada Lampiran 3 adalah sebagai berikut.

Kelompok data pertama adalah perlakuan tanpa pemberian ekstrak teh hijau (konsentrasi 0%) yang dalam penelitian ini kelompok data tersebut berguna sebagai kontrol. Hasilnya adalah didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang signifikan terhadap konsentrasi 2,5 % ($p < 0,05$). Pada konsentrasi 5%, 7,5%,

10%, 12,5% tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ($p>0,05$). Kemudian hasil komparasi kelompok data kedua, yaitu perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 2,5%, didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang signifikan terhadap kelompok data dengan konsentrasi 0% (kontrol), 5%. Sementara terhadap kelompok data dengan konsentrasi 7,5%, 10%, dan 12,5% tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Sedangkan pada kelompok data ketiga, yaitu perlakuan dengan konsentrasi 5% signifikan didapat pada perbandingan dengan kelompok data konsentrasi 2,5%, 7,5%, dan 10%. Sedangkan terhadap kelompok dengan konsentrasi 0% (kontrol) dan 12,5% tidak terdapat perbedaan nilai *Mean Gray Value* bermakna. Pada kelompok data keempat, yaitu pemberian konsentrasi 7,5% didapat hasil yang signifikan terhadap konsentrasi 5%, 10%, dan 12,5%. Sedangkan terhadap konsentrasi terendah 0% (kontrol), dan 2,5% tidak terdapat signifikansi. Sedangkan pada kelompok data kelima yaitu konsentrasi 10% signifikansi hanya didapatkan terhadap kelompok data konsentrasi 5%, 7,5%, dan 12,5%. Sementara terhadap kelompok data konsentrasi lainnya, yakni konsentrasi 0% (kontrol) dan 2,5% tidak didapatkan perbedaan yang signifikan. Dan pada kelompok data terakhir yaitu konsentrasi ekstrak 12,5% didapat angka yang signifikan terhadap kelompok data konsentrasi 7,5% dan 10%. Sedangkan pada kelompok data konsentrasi 0% (kontrol), 2,5%, dan 5% tidak terdapat angka *Mean Gray Value* yang signifikan. Sehingga, dapat ditarik kesimpulan bahwa antar kelompok data yang berdekatan tidak terdapat signifikansi yang cukup. Namun pada kelompok data dengan rentang yang cukup jauh seperti dua konsentrasi terendah dan dua konsentrasi tertinggi memiliki perbedaan angka *Mean Gray Value* yang signifikan.

5.2.3 Uji Korelasi *Pearson*

Uji Korelasi *Pearson* dilakukan untuk menilai kekuatan hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun teh hijau dan *Mean Gray Value*. Adapun hasil analisisnya adalah sebagai berikut.

		Konsentrasi	Ketebalan
Konsentrasi	Pearson Correlation	1	.897**
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	24	24
Ketebalan	Pearson Correlation	.897**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Gambar 5.13 Uji Korelasi *Pearson*

Hasil analisis Uji Korelasi *Pearson* dapat dilihat dalam Lampiran 4. Adapun angka korelasi *Pearson* adalah 0,897 dengan nilai signifikansi 0,00. Untuk menilai korelasi yang tercermin dari angka tersebut, maka terdapat klasifikasi hasil. Adapun klasifikasinya adalah sebagai berikut

Nilai Korelasi 0	=	tidak ada korelasi antara dua variabel
Nilai Korelasi > 0 – 0,25	=	sangat lemah
Nilai Korelasi > 0,25 – 0,5	=	cukup
Nilai Korelasi > 0,5 – 0,75	=	kuat
Nilai Korelasi > 0,75 – 0,99	=	sangat kuat
Nilai Korelasi 1	=	sempurna

Korelasi dapat bertanda positif dan negatif. Korelasi positif menunjukkan arah yang sama hubungan antar variabel. Sebaliknya korelasi negatif menunjukkan arah yang berlawanan. Signifikansi hubungan dua variabel

ditentukan dengan premis jika $p < 0,05$ maka hubungan kedua variabel signifikan. Begitu pun sebaliknya, jika $p < 0,05$ maka hubungan kedua variabel tidak signifikan.

Dari hasil uji korelasi *Pearson*, didapatkan hasil sebagai berikut:

1. Nilai korelasi (r) = 0,897, yang berarti korelasi antara konsentrasi ekstrak daun teh hijau dengan *Mean Gray Value* atau ketebalan cincin biofilm yang terbentuk sangatlah kuat.
2. Arah korelasi positif, berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun teh hijau, semakin besar pula *Mean Gray Value* yang berarti biofilm sudah terhambat.
3. Nilai $p = 0,000$, yakni terdapat korelasi yang signifikan ($p < 0,05$) antara konsentrasi ekstrak daun teh hijau dengan *Mean Gray Value* atau ketebalan cincin biofilm yang terbentuk.

Perhitungan lengkap dapat dilihat di Lampiran 4.