

BAB IV

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 kulit lemon (*Citrus limon*) terhadap *Porphyromonas gingivalis* secara in vitro.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah sediaan bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

4.2.2 Sampel Penelitian

Untuk menghitung jumlah pengulangan digunakan rumus dan sampel penelitian akan dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Kumboyono,2011) :

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

Keterangan :

N: jumlah pengulangan

P: jumlah perlakuan 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% konsentrasi ekstrak kulit lemon (Tanjung *dkk.*, 2008) untuk uji pendahuluan, aquades, chlorhexidine 0,2%

Karena jumlah perlakuan (p) adalah 7, maka:

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14$$

(dibulatkan maka menjadi 4 kali pengulangan)

jadi pada penelitian ini dibutuhkan 4 kali jumlah pengulangan

tabel 4.1 Pembagian Kelompok Perlakuan Uji Pendahuluan (Jannata, 2014)

Nama kelompok	Perlakuan yang diberikan
Kontrol negatif	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + aquades steril
Kontrol positif	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + chlorhexidine 0,2%
Kelompok A	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + ekstrak kulit lemon dengan konsentrasi 100%
Kelompok B	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + ekstrak kulit lemon dengan konsentrasi 50%
Kelompok C	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + ekstrak kulit lemon dengan konsentrasi 25%
Kelompok D	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + ekstrak kulit lemon dengan konsentrasi 12,5%
Kelompok E	BHI-A dengan suspens <i>P.gingivalis</i> + ekstrak kulit lemon dengan konsentrasi 6,25%

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Ekstrak kulit lemon untuk uji pendahuluan dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%, aquades, chlorhexidine 0,2%.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah kemampuan ekstrak kulit lemon dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang dilihat dari lubang pada media pertumbuhan untuk mengetahui dosis efektif.

4.3.3 Variabel Kendali

- Kriteria alat dan bahan
- Alat dan bahan
- Konsetrasi ekstrak kulit lemon
- Sterilisasi alat dan bahan

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboraturium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan September – November 2016

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Penyediaan Kulit Buah Lemon

Bahan yang digunakan adalah buah lemon yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Junrejo, Batu, Jawa Timur (65301).

4.5.2 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi Kulit Lemon

- Alat :
 1. Multi purpose knife
 2. Spidol
 3. Oven
 4. Timbangan
 5. Elenmeyer
 6. Kertas saring
 7. Evaporator
 8. Kertas label
- Bahan :
 1. Kulit lemon
 2. Etanol 96%
 3. Aquades steril



4.5.3 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri Dengan Pewarnaan Gram

- Alat :

1. gelas objek
2. ose
3. bunsen
4. kertas penghisap
5. mikroskop
6. tabung reaksi

- Bahan :

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

4.5.4 Alat dan Bahan Tes Oksidase (Gardenia, 2010)

- Alat :

1. Ose
2. Oxidase Test Strip

- Bahan :

1. Isolat *Porphyromonas gingivalis*

4.5.5 Alat dan Bahan Uji Daya Antimikroba Ekstrak Kulit Lemon Terhadap

Porphyromonas gingivalis

- Alat :
 1. Tabung reaksi
 2. Candle jar / anaerobic jar
 3. Cawan petri
 4. Ose
 5. Mikropipet
 6. Pelubang
 7. Inkubator
 8. Jangka sorong
- Bahan :
 - a. BHI-A
 - b. Isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis*
 - c. Ekstrak kulit lemon
 - d. Aquades
 - e. Chlorhexidine gluconate 0,2%

4.5.6 Alat dan Bahan untuk Uji MacConkey (Acumedia. 2011)

1. Isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis*

2. Anaerobic jar
3. Medium *MacConkey* agar
4. Inkubator

4.5.7 Alat dan Bahan untuk Metode Difusi Sumuran

- Alat dan bahan untuk pembuatan media pertumbuhan bakteri:

Alat :

1. Erlenmeyer
2. *Stirer*
3. *Aluminium foil*
4. Tabung reaksi
5. Autoklaf
6. Timbangan

Bahan :

1. Aquades

4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak kulit lemon adalah ekstrak yang didapatkan dari *Materia Medika*, yang kemudian direndam dengan pelarut etanol 96%.
2. Isolat *Porphyromonas gingivalis* adalah bakteri anaerob gram negatif, melanogenik dan non sakarolitik, yang terlihat dengan warna merah pada gram.
3. Pada penelitian ini memakai *Porphyromonas gingivalis* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

4. Metode sumuran (*Well Difussion*) merupakan metode berdasarkan kemampuan senyawa antibakteri yang diuji untuk menghasilkan jari-jari zona penghambatan di sekeliling sumur uji terhadap bakteri yang digunakan sebagai penguji.
5. Daya antimikroba adalah besarnya diameter zona hambatan *Porphyromonas gingivalis* yang terbentuk didaerah sekeliling sumuran dengan tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* menggunakan metode difusi sumuran dan diukur menggunakan kaliper dalam satuan mm.
6. Metode difusi sumuran dilakukan dengan cara membuat sumuran pada agar padat yang telah diinokulasi 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 atau bentukan lingkaran jernih di sekitar agar (Mpila,2012)
7. Kontrol negatif adalah BHI-A dengan suspens *Porphyromonas gingivalis* + aquades (0%).
8. Kontrol positif adalah BHI-A dengan suspens *Porphyromonas gingivalis* + chlorhexidine gluconate 0,2%.
9. Kelompok perlakuan adalah BHI-A dengan *Porphyromonas gingivalis* + ekstrak kulit lemon dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% yang digunakan untuk uji pendahuluan daya antibakteri.

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari pembuatan ekstrak kulit lemon dengan metode maserasi, Identifikasi bakteri *Porphyromonas gingivalis* yaitu pewarnaan gram, tes oksidase, uji mac conkey, pembuatan kultur bakteri, pembuatan suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis*, dan uji daya antimikroba ekstrak kulit lemon terhadap *Porphyromonas gingivalis*

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Kulit Lemon

A. Proses ekstraksi dengan metode maserasi

1. Buah lemon seberat 6 kg dibersihkan dan dicuci dengan air
2. Kulit buah lemon diambil dengan menggunakan multi purpose knife dan dilakukan pengerokan menggunakan pisau agar kulit dan daging buahnya terpisah.
3. Kulit lemon seberat 2kg dipotong kecil-kecil, dianginkan pada suhu kamar selama dua hari dan dioven pada suhu 40-60 °C selama 48 jam hingga diperoleh kulit lemon kering 560 g.
4. Setelah kulit lemon kering diblender dan diayak sampai menjadi bubuk halus sebanyak 500 g. Serbuk kulit lemon digunakan sebanyak 250g yang kemudian dimasukkan dalam tabung erlenmeyer.
5. Maserasi bubuk halus dengan menggunakan etanol 96%, perbandingan antara serbuk kulit lemon dan etanol adalah 1:10 (w/v) selama 48 jam dan disaring dengan menggunakan kertas saring.
6. Tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu kocok perlahan-lahan. Pengocokan dilakukan 1-2 kali sehari . Disimpan pada suhu kamar selama 24 jam

7. Setelah 24 jam, disaring dengan kertas filter dan menghasilkan ampas dan filtrat

B. Proses Evaporasi

1. Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan $30-40^{\circ}$ terhadap meja percobaan.
2. Hasil rendaman etanol (filtrat) dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi. Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah evaporator, pendingin spiral dihubungkan pada bagian atas evaporator, lalu penampung etanol dihubungkan pada bagian atas evaporator, pendingin spiral dihubungkan dengan vakum dan selang plastik, pendingin spiral juga dihubungkan dengan *waterpump* dengan selang plastik.
- d. *Waterpump* ditempatkan dalam bak yang berisi aquades, *waterpump* dihubungkan dengan sumber listrik sehingga aquades akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan merata).
- e. Satu set alat evaporator diletakkan sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *waterbath*.
- f. Vakum dan *waterbath* dihubungkan dengan sumber listrik dan suhu pada *waterbath* diatur sekitar 65°C (sesuai dengan titik didih etanol).
- g. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama $\pm 2-3$ jam.
- h. Dioven kembali pada suhu 40°C selama 12 jam sehingga didapatkan ekstrak konsentrasi 100% sebanyak 42 g konsistensi semi solid

Pembuatan sediaan ekstrak kulit lemon untuk uji pendahuluan pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% , 6,25% dengan diencerkan menggunakan aquades dan dicampur hingga homogen dengan evaporator

- Ekstrak kulit lemon konsentrasi 100% : 2 ml ekstrak kulit lemon 100%.
- Ekstrak kulit lemon konsentrasi 50% : 1 ml ekstrak kulit lemon 100% + 1ml aquades.
- Ekstrak kulit lemon konsentrasi 25% : 0,5 ml ekstrak kulit lemon 100% + 1,5 ml aquades.
- Ekstrak kulit lemon konsentrasi 12,5% : 0,25 ml ekstrak kulit lemon 100% + 1,75 ml aquades
- Ekstrak kulit lemon konsentrasi 6,25% : 0,125 ml ekstrak kulit lemon 100% + 1,875 ml aquades

4.7.2 Uji Identifikasi Bakteri

Tes yang dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri *Porphyromonas gingivalis* antara lain adalah tes pewarnaan gram untuk menemukan bakteri gram positif atau negatif , tes oksidase untuk menentukan ada tidaknya enzim oksidase yang dimiliki bakteri, dan uji agar mac conkey untuk membedakan kemampuan fermentasi laktosa.

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dapat dilakukan dengan cara (Lestari, 2013) :

1. Buat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan di udara. Untuk sediaan cair tidak disuspensikan dengan aquades

2. Sediaan yang telah kering difiksasi diatas api bunsen
3. Sediaan diberi larutan kristal violet selama satu menit, kemudian dibilas dengan air mengalir
4. Sediaan diberi larutan lugol selama satu menit, kemudian dibilas dengan air mengalir
5. Sediaan ditetesi alkohol 70% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air mengalir.
6. Sediaan diberi *safranin*, lalu didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.
8. Hasil positif : *Porphyromonas gingivalis* tercat merah (gram negatif).

4.7.2.2 Tes Oksidase (Gardenia, 2010)

1. Siapkan oksidase 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 : tercat ungu (menghasilkan enzim sitokrom oksidase)

4.7.2.3 Uji Agar MacConkey

Uji agar *Mac Conkey* dilakukan untuk mengisolasi dan membedakan bakteri gram-negatif. Mekanisme dari uji ini dengan melihat fermentasi laktosa bakteri. Fermentasi laktosa pada bakteri pH sekitar koloni turun dan menyebabkan perubahan warna pada indikator pH. Inokulasi bakteri

Porphyromonas gingivalis dilakukan dengan metode streaking pada medium agar prosedur uji agar *Mac Conkey* (Acumedia, 2011) .

Prosedur uji agar *Mac Conkey* antara lain (Acumedia, 2011) :

1. Inkubasikan bakteri pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam lalu amati hasilnya
2. Bila warna media berubah menjadi merah, maka bakteri memfermentasi laktosa. Bila bakteri tidak menunjukkan perubahan warna pada media, bakteri tidak memfermentasi laktosa.

4.7.3 Persiapan Kultur Bakteri Uji

Kultur bakteri uji yang akan digunakan disiapkan dengan cara mengambil satu ose bakteri dari BHI-A. Kemudian diinokulasikan ke dalam 10 ml BHI-B steril. Selanjutnya divortek untuk meratakan bakteri di dalam BHI-B, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam didapatkan inokulum yang langsung dapat digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri (Nurainy, 2010).

4.7.4 Persiapan Suspensi Uji *Porphyromonas gingivalis* (Murray et al. 1999)

1. Persiapkan bakteri *Porphyromonas gingivalis* dari media BHIB yang telah diuji konfirmasi
2. Ambil 5 koloni ($d \geq 1$ mm) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Ukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya 0,1 setara dengan standar 0,5 *Mc Farland*. Hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung 1×10^8 hingga 5×10^8 CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$

3. Ambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^8 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril, untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml. Proses ini akan menghasilkan suspensi sel dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml. Proses dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml

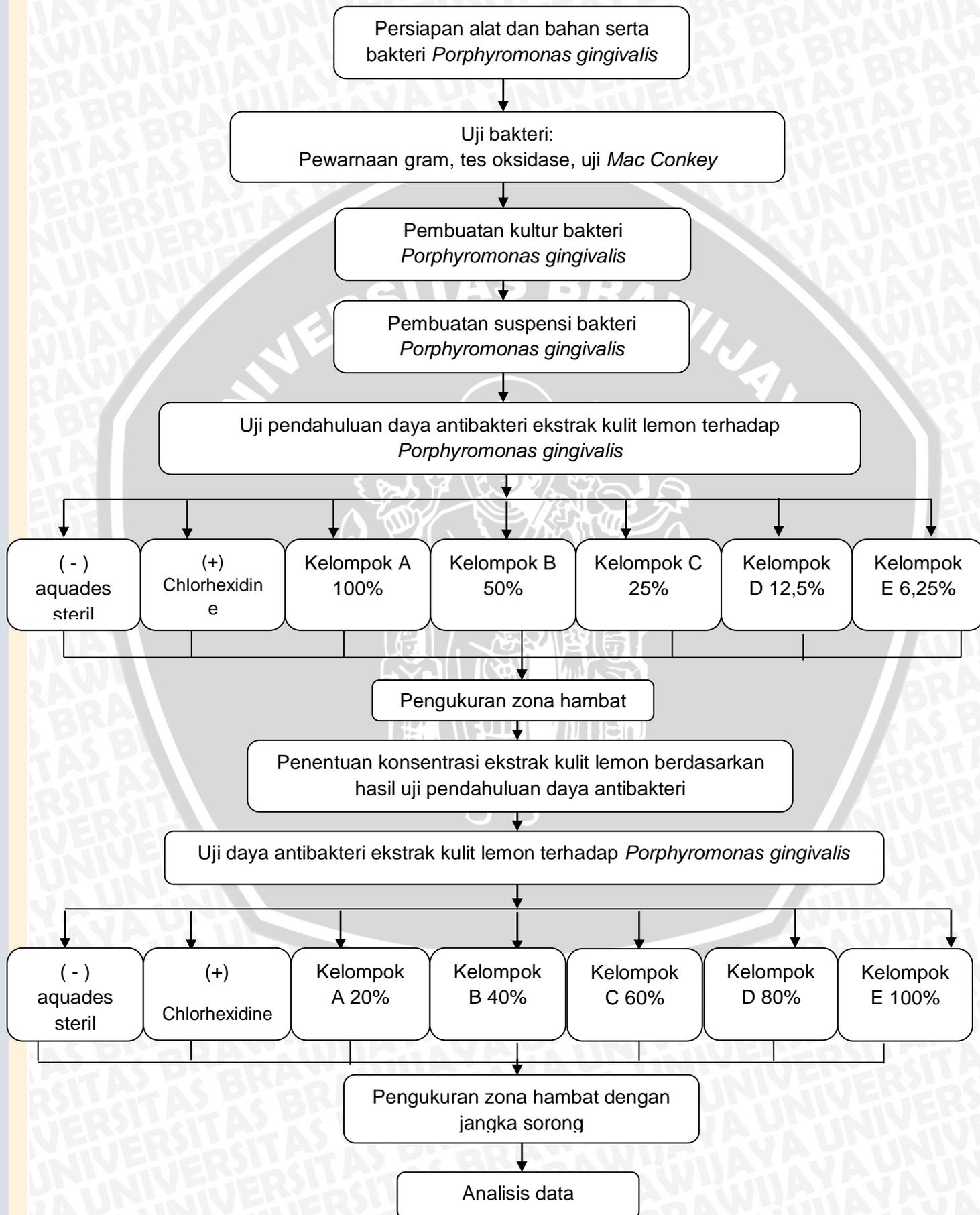
1.7.5 Uji daya antimikroba ekstrak kulit lemon (*Citrus limon*) terhadap *Porphyromonas gingivalis* secara in vitro (Jannata, 2014)

1. Bagian bawah petridish yang berisi media BHI-A dibagi menjadi 7 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 0,5ml 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 6mm dengan kedalaman lubang sumuran 4 mm
6. Lalu dilakukan pemberian 50 μl ekstrak kulit lemon konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% sebagai uji pendahuluan, kontrol positif, dan kontrol negatif pada setiap sumuran
7. Media BHI-A yang telah diinokulasi *Porphyromonas gingivalis* dan diberi perlakuan, selanjutnya dimasukkan kedalam candle jar, lalu candle jar dimasukkan ke dalam inkubator, 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. Dilakukan penentuan konsentrasi ekstrak kulit lemon berdasarkan hasil uji pendahuluan, kemudian dilakukan uji daya antibakteri dengan menggunakan konsentrasi ekstrak kulit lemon yang telah ditentukan.
10. Konsentrasi yang digunakan dan diberi pengulangan 4 kali adalah 20%, 40% 60%, 80%, 100%, kontrol positif chlorhexidine 0,2%, kontrol negatif.
11. Lakukan pengukuran zona hambat, dan hasil dari pengukuran kemudian dianalisis.



4.8 Alur Penelitian



4.9 Analisis Data

Data yang didapat dari hasil penelitian, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas varian. Uji ini menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene*. Bila data normal dan homogen ($p > 0,05$), maka akan menggunakan uji statistik *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Uji ini ini digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak kulit lemon (*Citrus limon*) sebagai antimikroba terhadap *Porphyromonas gingivalis* dengan melihat zona hambatnya. Uji korelasi *Pearson* dilakukan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak kulit lemon (*Citrus limon*) terhadap jari-jari zona hambat bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Uji regresi berfungsi untuk mengetahui seberapa besar hubungan tersebut. Analisa data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 16.0 untuk *Windows*.

