

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 , yaitu dengan melihat hasil pengukuran variabel setelah diberi perlakuan, dengan menggunakan kelompok kontrol sebagai pembanding. Metode yang digunakan adalah tes difusi sumuran untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) 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, sampel penelitian akan dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian (Solimun, 2001 dalam Kumboyono, 2011) . Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan :

N: jumlah pengulangan

P: jumlah perlakuan 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% konsentrasi ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) (Hombing, 2015).

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 (Jannata dkk., 2014)

Nama kelompok	Perlakuan yang diberikan
Kontrol negatif	BHI-A dengan suspensi <i>P.gingivalis</i>
Kontrol positif	BHI-A dengan suspensi <i>P.gingivalis</i> + <i>chlorhexidine</i> 0,2%
Kelompok A	BHI-A dengan suspensi <i>P.gingivalis</i> + ekstrak daun salam dengan konsentrasi 100%
Kelompok B	BHI-A dengan suspensi <i>P.gingivalis</i> + ekstrak daun salam dengan konsentrasi 50%
Kelompok C	BHI-A dengan suspensi <i>P.gingivalis</i> + ekstrak daun salam dengan konsentrasi 25%
Kelompok D	BHI-A dengan suspensi <i>P.gingivalis</i> + ekstrak daun salam dengan konsentrasi 12.5%
Kelompok E	BHI-A dengan suspensi <i>P.gingivalis</i> + ekstrak daun salam dengan konsentrasi 6.25%

Pada penelitian ini, kontrol positif menggunakan obat kumur yang mengandung *chlorhexidine* 0,2%. Karena *Chlorhexidin* termasuk kedalam kelompok ikatan kimia yang dikenal dengan bisguanida yang bersifat fungisid, bakterostatik atau bakterisid baik pada bakteri Gram positif dan Gram negatif (Marsh dan Martin, 1999:98 dalam Sendy, 2014).

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Ekstrak daun salam dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% (Hombing, 2015).

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang dilihat dari lubang sumuran pada media pertumbuhan untuk mengetahui dosis efektif.

4.3.3 Variabel Kendali

- Kriteria alat dan bahan
- Alat dan bahan
- Konsentrasi ekstrak daun salam
- 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 akan dilakukan pada bulan Agustus – Oktober tahun 2016

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Penyediaan Daun Salam (*Eugenia polyantha*)

Bahan yang digunakan adalah daun salam diperoleh dari tanaman salam di Balai Materia Medika, Batu.

4.5.2 Alat

4.5.2.1 Alat untuk Ekstraksi Daun Salam

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

4.5.2.2 Alat Untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

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



4.5.2.3 Alat untuk Tes Oksidase

1. Ose
2. Oksidase Test Strip

4.5.2.4 Alat untuk Uji Daya Antibakteri Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha*) 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

4.5.3 Bahan

4.5.3.1 Bahan untuk Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha*)

1. Daun salam
2. Etanol 96%
3. Aquades steril

4.5.3.2 Bahan untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

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

4.5.3.3 Bahan untuk Tes Oksidase

1. Isolat *Porphyromonas gingivalis*

4.5.3.4 Bahan untuk Uji Daya Antibakteri Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha*) terhadap *Porphyromonas gingivalis*

1. Kultur : Brain Heart Infusion Broth (BHI-B) adalah media cair dan tidak mengandung agar, Brain Heart Infusion Agar (BHI-A) adalah media agar padat.

2. Isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis*
3. Ekstrak daun salam
4. Aquades
5. *Chlorhexidine gluconate* 0,2%

4.5.3.5 Alat dan Bahan untuk Uji MacConkey

1. Isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis*

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

4.5.3.6 Alat dan Bahan untuk Metode Difusi Sumuran

Alat dan bahan untuk pembuatan media pertumbuhan bakteri

(Mpila, 2012):

Alat :

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

Bahan :

1. Aquades
2. Media BHI

4.6 Definisi Operasional (Sari, 2015) :

1. Periodontitis adalah penyakit inflamasi pada jaringan penyangga gigi yang disebabkan oleh satu maupun sekelompok mikroorganisme spesifik seperti bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Ditandai dengan pembentukan plak yang melekat pada permukaan gigi dan migrasi epitel jungsional ke apikal, kehilangan perlekatan serta puncak tulang alveolar yang dapat menyebabkan resesi gingival.
2. Isolat *Porphyromonas gingivalis* adalah bakteri anaerob gram negatif, melanogenik dan non sakarolitik, yang terlihat dengan warna merah pada gram.
3. Daun salam mengandung saponin, flavonoid, tannin, terpenoid, dan alkaloid. Kandungan flavonoid mempunyai aktivitas antibakteri karena

memiliki kemampuan berinteraksi dengan DNA bakteri dan menghambat fungsi membran sitoplasma bakteri dengan mengurangi fluiditas dari membran dalam dan membran luar sel bakteri. Ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) yang didapatkan kemudian direndam dengan pelarut etanol 96%.

4. Pada penelitian ini memakai *Porphyromonas gingivalis* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi FKUB.
5. Metode sumuran (*Well Diffusion*) merupakan metode berdasarkan kemampuan senyawa-senyawa antibakteri yang diuji untuk menghasilkan jari-jari zona penghambatan di sekeliling sumur uji terhadap bakteri yang digunakan sebagai penguji.
6. Daya antibakteri adalah besarnya diameter zona hambatan *Porphyromonas gingivalis* yang terbentuk didaerah sekeliling sumuran yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* dengan menggunakan metode difusi sumuran dan diukur menggunakan kaliper atau jangka sorong dalam satuan mm.
7. Metode difusi sumuran dilakukan dengan cara membuat sumuran pada 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 atau bentukan lingkaran jernih di sekitar sterile paper disc pada agar.
8. Kontrol negatif adalah BHI-A dengan suspens *Porphyromonas gingivalis*.
9. Kontrol positif adalah BHI-A dengan suspens *Porphyromonas gingivalis* + *chlorhexidine gluconate* 0,2%.

10. Kelompok perlakuan adalah BHI-A dengan *Porphyromonas gingivalis* + ekstrak daun salam dengan konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12.5%; 6,25%.

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari pembuatan ekstrak daun salam dengan metode maserasi, Prosedur identifikasi *Porphyromonas gingivalis* yaitu pewarnaan gram, tes oksidase, pembuatan suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis*, dan uji daya antibakteri ekstrak daun salam terhadap *Porphyromonas gingivalis*.

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Salam (Jannata, 2014)

1. Proses ekstraksi dengan metode maserasi :

1. Daun salam segar sebanyak 5 kg yang akan digunakan dipilih terlebih dahulu dilanjutkan pencucian di air mengalir.
2. Daun salam yang telah bersih dikeringkan, dioven pada suhu 40-60 °C selama 17 jam.
3. Setelah daun salam kering sekitar 500 gram, diblender dan diayak sampai menjadi bubuk halus. Serbuk daun salam sebanyak 220 gram kemudian dimasukkan dalam tabung erlenmeyer.
4. Maserasi bubuk halus dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 636 ml, perbandingan antara serbuk daun salam dan etanol adalah 1:10 (w/v) selama 48 jam dan disaring dengan menggunakan kertas saring (Khudry, 2014).
5. Tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu kocok perlahan-lahan. Pengocokan dilakukan 1-2 kali sehari . Disimpan pada suhu kamar selama 24 jam (Gafur, 2014).

6. Setelah 24 jam, disaring dengan kertas filter dan menghasilkan ampas dan filtrat.
7. Maserat kemudian diuapkan sampai bebas dari pelarut etanol menggunakan rotary evaporator pada suhu 45-50°C.
8. Dioven kembali pada suhu 40°C selama 12 jam sehingga didapatkan ekstrak konsentrasi 100% sekitar 42,64 gram pasta (konsistensi semi solid).

2. Proses Evaporasi

1. *Evaporator* dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30-40° 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 dengan selang plastik, pendingin spiral dihubungkan dengan *waterpump* dengan selang plastik.
3. *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).
4. Satu set alat *evaporator* diletakkan sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *waterbath*.
5. Vakum dan *waterbath* dihubungkan dengan sumber listrik dan suhu pada *waterbath* diatur sekitar 65°C (sesuai dengan titik didih etanol).
6. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama ± 2-3 jam.

7. Dioven kembali pada suhu 40°C selama 12 jam sehingga didapatkan ekstrak konsentrasi 100% sekitar 42,64 gram pasta (konsistensi semi solid).

Pembuatan sediaan ekstrak daun salam pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% dengan diencerkan menggunakan aquades dan dicampur hingga homogen dengan evaporator (Budiarti, 2011):

1. Ekstrak daun salam konsentrasi 100% : 2 ml ekstrak daun salam 100%.
2. Ekstrak daun salam konsentrasi 50% : 1 ml ekstrak daun salam 100% + 1ml aquades.
3. Ekstra daun salam konsentrasi 25% : 0,5 ml ekstrak daun salam 100% + 1,5 ml aquades.
4. Ekstrak daun salam konsentrasi 12.5% : 0,25 ml daun salam 100% + 1,75 ml aquades.
5. Ekstrak daun salam konsentrasi 6.25% : 0,125 ml daun salam 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 dan tes oksidase.

4.7.2.1 Pewarnaan Gram (Chaskes *dkk.*, 2015)

Pewarnaan Gram menurut penelitian Chaskes *dkk.*, pada tahun 2015 dapat dilakukan dengan cara :

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 di fiksasi 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) (Chaskes dkk., 2015).

4.7.2.2 Tes Oksidase (Gardenia dkk., 2010)

Tes Oksidase menurut penelitian Gardenia dkk., pada tahun 2010 dapat dilakukan dengan cara :

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 : *Porphyromonas gingivalis* tercat ungu (menghasilkan enzim sitokrom oksidase)

4.7.2.3 Uji Agar *Mac Conkey* (Acumedia, 2011)

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* . 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 bakteri menjadi merah, maka bakteri memfermentasi laktosa. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* tidak menunjukkan perubahan warna pada media, bakteri tidak memfermentasi laktosa.

4.7.3 Persiapan Kultur Bakteri Uji (Nurainy, 2008)

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, 2008).

4.7.4 Persiapan Suspensi Uji *Porphyromonas gingivalis* (Murray dkk., 1999)

1. Persiapkan bakteri *Porphyromonas gingivalis* dari media BHI-B yang telah diuji konfirmasi.
2. Suspensi bakteri pada BHI-B dispektrofotometri dengan $\lambda = 625$ sehingga diketahui *Optical Density* (OD) yang setara dengan 10^8 CFU/ml.

Kemudian dengan rumus pengenceran $N1XV1 = N2XV2$, kepadatan bakteri tersebut diencerkan 2x dengan NaCl menjadi 10^6 CFU/ml.

4.7.5 Uji Daya Antibakteri Ekstrak Daun Salam Terhadap *Porphyromonas gingivalis* secara *in vitro* (Jannata dkk., 2014)

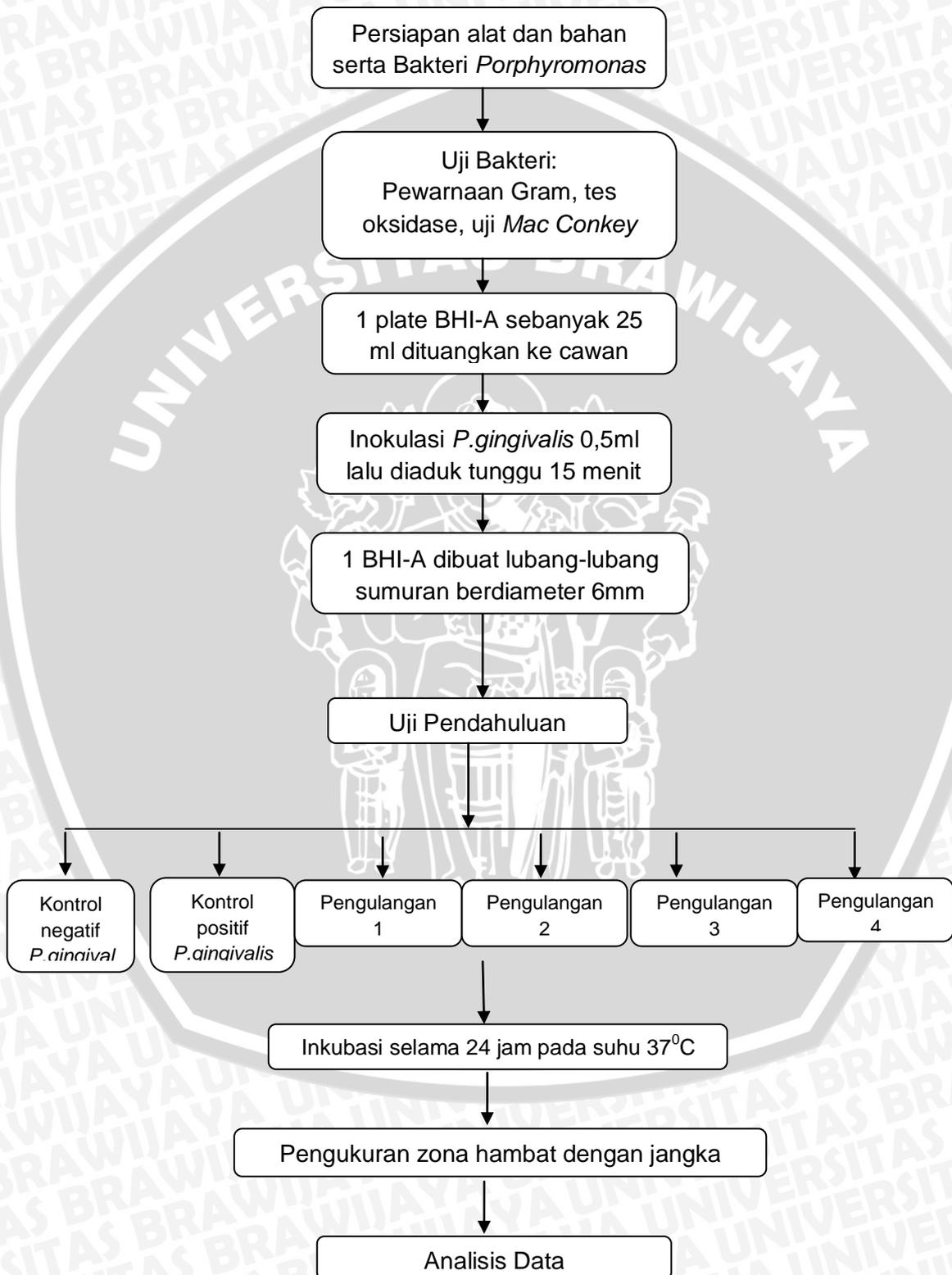
1. Bagian bawah petridish yang berisi media BHI-A dibagi menjadi 5 bagian untuk pengulangan sehingga dibutuhkan 4 petridish (4 pengulangan perlakuan) dan 2 petridish yang masing-masing dibagi 4 bagian (1 kontrol negatif, 1 kontrol positif).
2. Tiap bagian diberi identitas masing-masing menggunakan kertas 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 6 mm dengan kedalaman lubang sumuran 4 mm.
6. Lalu dilakukan pemberian 50 μl ekstrak daun salam konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 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 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 kemudian dianalisis (Jannata *dkk.*, 2014).



4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian dengan Metode Difusi Sumuran

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 Daun Salam (*Eugenia polyantha*) sebagai antibakteri terhadap *Porphyromonas gingivalis* dengan melihat zona hambatnya. Uji korelasi *Pearson* dilakukan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi Daun Salam (*Eugenia polyantha*) terhadap jari-jari zona hambat bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

Bila data hasil uji normalitas dan homogenitas varian ternyata tidak normal ($p < 0,05$), maka analisis data yang akan digunakan adalah uji statistik *Kruskal- Wallis* dan uji statistik korelasi *Spearman*. Analisa data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 16.0 untuk *Windows*.