

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratoris dengan *post test only control group design* dengan fokus penelitian pada keadaan koloni bakteri *Streptococcus mutans* yang ditunjukkan setelah perlakuan pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) secara *in vitro*. Pada penelitian ini digunakan metode sumuran dengan konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi 12,5%, 25%, 50%, 100%, *Chlorhexidine* 0,2% (Kontrol Positif) dan Aquades (Kontrol Negatif).

4.2 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dengan waktu penelitian pada bulan Mei 2016 sampai Agustus 2016.

4.3 Sampel

Bahan yang diuji dalam penelitian ini adalah daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) yang diperoleh dari UPT Materia Medika Kota Batu. Daun kemangi kemudian diekstrak dengan pelarut etanol di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.

Pada penelitian ini digunakan bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Penelitian ini menggunakan 6 macam perlakuan yaitu 4 macam perlakuan dengan konsentrasi berbeda (12,5%, 25%, 50%, 100%), *Chlorhexidine* 0,2 % (Kontrol Positif) dan Aquades (Kontrol Negatif) maka banyaknya pengulangan dalam penelitian ini diperoleh berdasarkan rumus (Notobroto, 2005) :

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

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5 \approx 4$$

keterangan : p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Jumlah sampel atau ulangan dalam penelitian ini paling sedikit empat kali untuk masing-masing perlakuan.

4.4. Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan 2 jenis variabel, yaitu variabel bebas dan variabel terikat, dimana variabel bebasnya adalah ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 50%, 100%, sedangkan variabel terikatnya adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* pada BHIA *plate* pada masing-masing perlakuan.

4.5 Definisi Operasional

Pada penelitian ini yang dimaksud dengan:

1. Bakteri *Streptococcus mutans* adalah bakteri Gram positif, anaerob, terlihat berwarna ungu pada pewarnaan Gram, tidak menunjukkan adanya gelembung dalam uji katalase, dan tidak menunjukkan adanya zona hambatan disekitar disk pada tes *optochin* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Daun kemangi yang digunakan merupakan daun kemangi jenis *Ocimum sanctum* L. Tanaman ini diperoleh dari UPT Materia Medika Kota Batu, dilakukan ekstraksi dingin (maserasi) dengan menggunakan etanol 70% di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.
3. Zona hambat adalah daerah pada metode sumuran yang ditandai dengan adanya daerah jernih di sekitar disk pada media padat *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) yang berisi *Streptococcus mutans* yang telah diberi cuka kurma pada sumurannya dan diameternya diukur dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan mm.
4. Kontrol positif adalah uji dengan menggunakan *Chlorhexidine* 0,2%.
5. Kontrol negatif adalah uji dengan menggunakan larutan aquades.

4.6 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan dengan tujuan untuk menetapkan kebenaran mengenai *Ocimum sanctum* L. Identifikasi atau determinasi dilakukan di UPT Materia Medika, Kota Batu, Malang.

1.7 Alat dan Bahan Penelitian

1.7.1 Untuk Ekstraksi Daun Kemangi

1.7.1.1 Alat

Alat pemanas air, bak penampung air dingin, gelas ukur, kertas saring, labu penampung hasil evaporasi, oven, penampung hasil penguapan, penggiling (*blender*), penimbang, pipa plastik, pompa sirkulasi air dingin, pompa vakum, *rotary evaporator*, *shaker* (pengaduk), tabung ekstraksi, tabung pendingin dan labu penampung hasil ekstraksi.

1.7.1.2 Bahan

Daun kemangi dan pelarut etanol 70%

1.7.2 Untuk Identifikasi Bakteri

1.7.2.1 Alat

Mikroskop, *object glass*, ose, pipet micrometer, bunsen dan korek api

1.7.2.2 Bahan

Bahan-bahan pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin), minyak immerse, *Chocolate Agar Plate* (CAP), H₂O₂ 3%

1.7.3 Untuk Difusi Sumuran

1.7.3.1 Alat

Inkubator, pipet steril, media BHI dengan label konsentrasi, media BHI untuk kontrol positif dan kontrol negatif, dan vortex.

1.7.3.2 Bahan

Aquades, *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), hasil ekstraksi dan pembenihan cair bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/ml.

4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari prosedur identifikasi *Streptococcus mutans* yaitu pewarnaan Gram, tes katalase dan optochin, pembuatan ekstrak daun kemangi, persiapan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*, pembuatan media, uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.), pengukuran diameter zona hambat.

4.8.1 Identifikasi Bakteri *Streptococcus mutans* (Baron et al, 1994)

Untuk membuktikan bahwa koloni yang tumbuh adalah bakteri *Streptococcus mutans* maka dilakukan serangkaian tes antara lain, tes pewarnaan Gram untuk menentukan bakteri tersebut termasuk bakteri Gram positif kokus dengan hasil positif berwarna ungu, tes katalase untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Staphylococcus aureus* dengan hasil negatif tidak terdapat gelembung dan tes optochin untuk membedakan *Streptococcus mutans* dengan *Streptococcus pneumonia* dengan hasil negatif dengan tidak adanya zona hambat di sekitar disk.

4.8.1.1 Pewarnaan Gram (Baron et al, 1994)

1. Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.

2. Satu ose aquades steril ditetaskan pada gelas objek ditambah sedikit biakan bakteri yang diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquades pada gelas objek dan diratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
3. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
4. Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet dan dibiarkan 1 menit.
5. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
6. Sediaan ditetesi larutan lugol dibiarkan selama 1 menit.
7. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
8. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% sebagai peluntur selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur.
9. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
10. Sediaan ditetesi safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik.
11. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
12. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 1000x.
13. Hasil positif: *Streptococcus mutans* tercat ungu (Gram positif).

4.8.1.2 Tes Katalase (Baron et al, 1994)

1. Sediakan perbenihan cair bakteri *Streptococcus mutans* pada gelas obyek
2. Sediaan tersebut ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3%
3. Perhatikan ada tidaknya gelembung yang terjadi

4. Tes Katalase negatif apabila tidak adanya gelembung yang menunjukkan tidak adanya enzim katalase

4.8.1.3 Tes Optochin (Baron et al, 1994)

1. Siapkan *Chocolate Agar Plate* dan bakteri murni
2. Letakkan optochin disk ditengah inokulum di *Chocolate Agar Plate* yang telah di streaking dengan penjepit steril
3. Mengatur posisi disk dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan disk dalam agar.
4. Lalu inkubasikan pada suhu 35-37°C selama 18-24 jam
5. Amati apakah terbentuk zona hambat (inhibisi) dan diidentifikasi sebagai *Streptococcus mutans*
6. Tes sensitif terhadap optochin apabila adanya zona inhibisi yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan *Streptococcus pneumonia*
7. Tes optochin negatif apabila tidak adanya zona inhibisi yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan *Streptococcus mutans group*

4.8.2 Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum L.*) (Nababan, 2015)

1. Daun kemangi segar sebanyak 4 kg dicuci bersih lalu dikeringkan dengan cara menjemur dibawah sinar matahari secara tidak langsung.
2. Setelah benar-benar kering, daun kemangi kemudian dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk halus (simplicia).

3. Serbuk daun kemangi sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer
4. Tambahkan dengan etanol 70%. Lalu tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu kocok perlahan-lahan. Pengocokan dilakukan setengah jam dan disimpan pada suhu kamar selama 24 jam pada temperatur kamar.
5. Setelah 24 jam campuran disaring dengan kertas filter hingga diperoleh cairan yang bebas dari partikel kasar.
6. Hasil selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak daun kemangi dengan alat *Rotary Vacuum Evaporator* pada temperatur 65°C hingga semua pelarut terpisah dan didapatkan cairan ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%, kemudian diuapkan pada cawan penguap dan disimpan dalam freezer.

1.8.3 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum L.*)

Ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum L.*) yang awal ditetapkan sebagai konsentrasi 100%

Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi 50% sebanyak 1 ml

$$50\% \quad V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 = 1 \times 50$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml (ekstrak 100\% + 0,5 ml aquades)}$$

$$25\% \quad V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 50 = 1 \times 25$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml (ekstrak 50\% + 0,5 ml aquades)}$$

$$12,5\% \quad V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 25 = 1 \times 12,5$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml (ekstrak 12,5\% + 0,5 ml aquades)}$$

4.8.4 Persiapan Suspensi Uji *Streptococcus mutans* (Murray et al, 1999)

1. Persiapkan bakteri *Streptococcus mutans* dari media BHI yang telah diuji konfirmasi
2. Ambil 5 koloni ($d \geq 1 \text{ mm}$) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml BHIA steril, diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{maks} = 625 \text{ nm}$. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung 1×10^8 hingga $5 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$.
3. Suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ didapatkan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^8 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan 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 $2,5 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$.

4.8.5 Pembuatan Media

1. Media *nutrien agar* (NA) sebanyak 23 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer lalu dilarutkan dengan menambahkan 1 L akuades. Panaskan hingga mendidih di atas *hot plate* sambil dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*.

2. Pembuatan media *nutrien broth* (NB) yaitu dengan melarutkan 8 gram NB dengan 1 L akuades ke dalam Erlenmeyer, dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan ditutup *aluminium foil*, dipanaskan hingga mendidih dengan menggunakan *hot plate*
3. Kedua media tersebut disterilisasikan dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit dan tekanan 2 atm (Irianto, 2006).

4.8.6 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L.) terhadap *Streptococcus mutans*

Pada penelitian ini digunakan metode sumuran sebagai berikut (Darsono dan Artemisia, 2003):

1. Bakteri *Streptococcus mutans* sebanyak 100 µl diambil dengan menggunakan mikropipet, dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi media agar.
2. Suspensi bakteri dihomogenkan dan diratakan dengan menggunakan spreader hingga memadat.
3. Media yang telah bercampur dengan bakteri dilubangi dengan menggunakan *cork borer* dengan diameter lubang 5 mm.
4. Ekstrak daun kemangi dimasukkan ke lubang sumuran menggunakan micropipet sebanyak 50 µl dengan berbagai konsentrasi.
5. Biarkan ekstrak daun kemangi meresap ke dalam media agar.
6. Media ditutup dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.
7. Lakukan pemeriksaan dan pengukuran diameter daerah/zona hambatan dengan menggunakan jangka sorong.

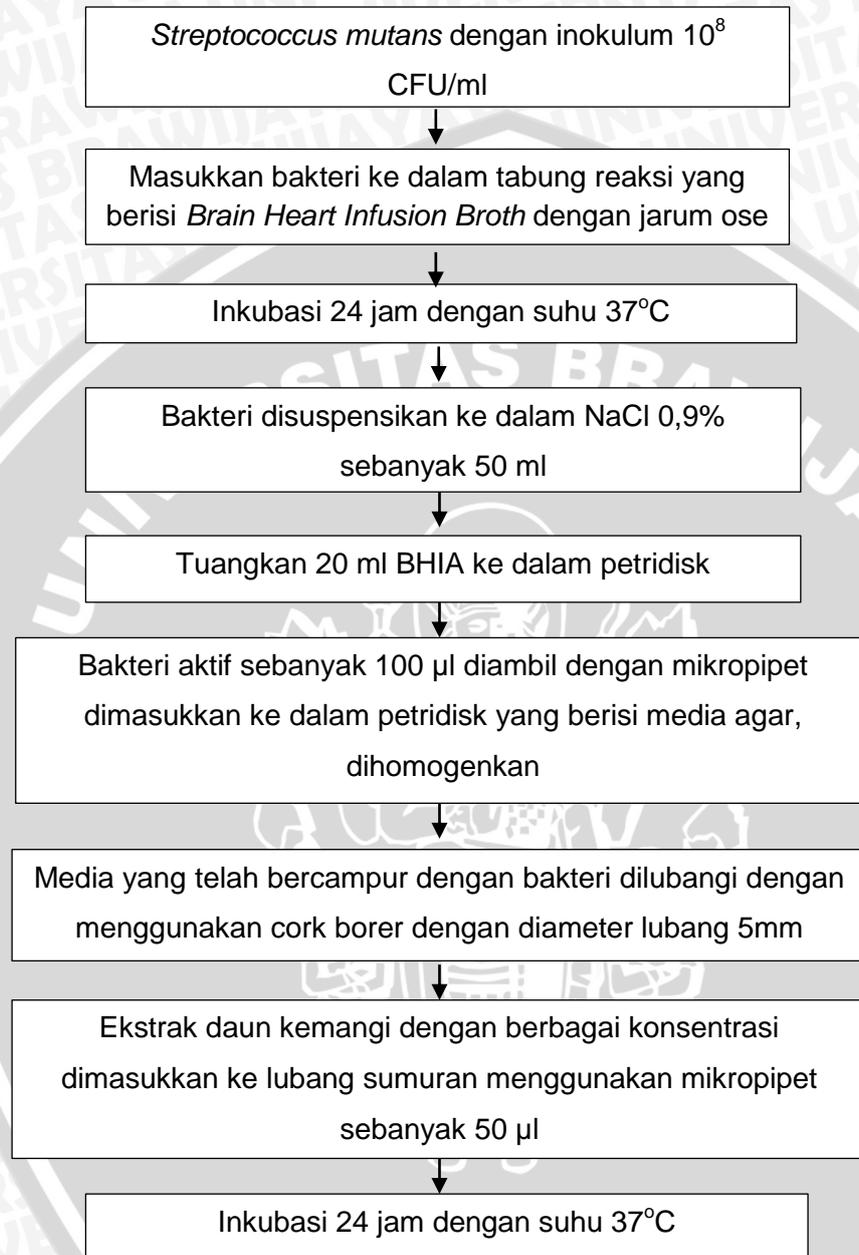
4.8.7 Pengukuran Diameter Zona Hambat

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah besarnya diameter zona hambat yang terbentuk akibat pengaruh ekstrak daun kemangi menggunakan pelarut etanol. Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur zona bening yang terbentuk menggunakan jangka sorong, sehingga dapat disebut dengan zona hambat. Susanto, Sudrajat dan Ruga (2012) menyebutkan kategori zona hambat dapat diketahui pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kategori Diameter Zona Hambat

Diameter	Kekuatan daya hambat
≤ 5 mm	Lemah
6-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
≥ 21 mm	Sangat kuat

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1. Alur Penelitian

Ket: Penjelasan lebih lanjut pada lampiran 3

4.10 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi normalitas dan homogenitas varian menggunakan *Kolmogorov Smirnov* dan *Homogeneity Test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *One Way ANOVA*, uji korelasi dan regresi. Uji statistik *One Way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun kemangi terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans*. Uji Korelasi *Pearson* digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara ekstrak daun kemangi terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Analisis statistik dilakukan menggunakan SPSS.

