

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian dengan desain eksperimental laboratoris dengan menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun kumis kucing sebagai antimikroba terhadap *Porphyromonas gingivalis*. Metode dilusi tabung meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada media *broth* untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimum) dan tahap penanaman pada medium BHI (Brain Heart Infussion) dengan metode *streaking* (penggoresan) untuk mengetahui KBM (Kadar Bunuh Minimum) (Jennifer, 2006).

#### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang diperoleh dari stok bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi FKUB.

#### 4.3 Variabel Penelitian

##### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kumis kucing dengan berbagai macam konsentrasi yang didapatkan melalui eksplorasi.

##### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Porphyromonas gingivalis* setelah pemberian ekstrak etanol daun kumis kucing.

#### 4.4 Tempat dan waktu penelitian

##### 4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.4.2 Waktu Penelitian

Juli– November 2016

#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.5.1 Bahan dan Alat Pewarnaan Gram

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk identifikasi bakteri adalah *isolat* bakteri *Porphyromonas gingivalis* pewarna Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), minyak emersi, ose, kertas penghisap, mikroskop, tabung reaksi, *bunsen brander*, dan *object glass*.

##### 4.5.2 Bahan dan Alat Uji MacConkey

Bahan dan alat yang dibutuhkan isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis*, anaerobic jar, medium MacConkey agar dan inkubator.

##### 4.5.3 Bahan dan alat untuk Tes Oksidase

Bahan yang dibutuhkan adalah ose, oksidase test strip dan isolate bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

##### 4.5.4 Bahan dan Alat untuk Pembuatan Ekstrak Daun Kumis Kucing

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk pembuatan ekstrak daun kumis kucing adalah seperangkat ekstraktor soxhlet, daun kumis kucing yang telah dikeringkan dan menjadi serbuk halus sebanyak 400 g, pelarut *Porphyromonas gingivalis* dan diklorometana (masing-masing 250 ml).

##### 4.5.5 Bahan dan Alat Pembiakan cair

Bahan dan alat yang dibutuhkan untuk pembuatan biakan cair bakteri adalah *isolat Porphyromonas gingivalis*, ose, tabung reaksi, *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), dan inkubator.

##### 4.5.6 Bahan dan Alat Tes *Dilusi* Tabung

Bahan dan alat yang digunakan dalam metode *dilusi* tabung adalah hasil ekstraksi daun kumis kucing, *isolat Porphyromonas gingivalis*, *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA), akuades, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet, ose, inkubator, *bunsen brander*, spidol, kertas label, dan *vortex*.

#### 4.6 Estimasi Pengulangan Ekstrak

Banyaknya pengulangan yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus Federer tahun 1996:

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

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi dari ekstrak etanol daun kumis kucing dan dua kontrol bakteri ( $p = 5+2 = 7$ ) maka didapatkan jumlah pengulangan:

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

$$7n - 11 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

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

Jadi jumlah pengulangan pada penelitian ini adalah 4 kali.

#### 4.7 Definisi Operasional

a. Daun kumis kucing yang digunakan sebagai ekstrak adalah daun kumis kucing yang berasal dari tumbuhan kumis kucing yang berbunga putih. Tumbuhan kumis kucing diperoleh dari Laboratorium Materia Medika, Batu.

- b. Ekstrak etanol daun kumis kucing selanjutnya didapatkan dengan mengeringkan daun kumis kucing lalu dihaluskan dan dilakukan ekstraksi dengan pelarut etanol 96%.
- c. Ekstrak daun kumis kucing menggunakan pelarut air dan etanol 96% dengan perbandingan 1:1 yang diproses dengan cara ekstraksi maserasi.
- d. Konsentrasi pendahuluan dengan metode dilusi tabung adalah 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 0% (Andrews, 2006) dari ekstrak etanol daun kumis kucing.
- e. *Porphyromonas gingivalis* yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang dimiliki oleh Laboratorium mikrobiologi FKUB.
- f. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* dikembangkan biakkan dan ditinjau pertumbuhannya melalui proses inkubasi dengan incubator selama 24 jam.
- g. Efektivitas ekstrak etanol daun kumis kucing yaitu dengan menilai kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunum minimum (KBM). KHM merupakan konsentrasi terendah dari ekstrak daun kumis kucing yang dapat menghambat pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis*. Indikator KHM berdasarkan tingkat kekeruhan yang ditampilkan pada tabung reaksi (Dzen, *et al.*, 2003). Kadar Bunuh Minimum (KBM) merupakan konsentrasi terendah dari ekstrak daun kumis kucing yang mampu membunuh *Porphyromonas gingivalis*. Jumlah koloni pada setiap konsentrasi dihitung secara kuantitatif menggunakan *colony counter*. KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri atau kurang dari 0,1% *Original Inoculum* (OI).
- h. *Original Inoculum* adalah inokulasi bakteri dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml yang diinokulasikan pada media BHIA/ agar padat.

#### 4.8 Prosedur Penelitian/ Pengumpulan Data

#### 4.8.1 Persiapan

Tabung reaksi, petri disk dan alat-alat lainnya (yang dapat disterilisasi) disiapkan dalam kondisi steril dengan menggunakan teknik *autoclave*. Kemudian diberi label pada masing-masing tabung reaksi dan petri disk. Sterilisasi juga dilakukan pada daun kumis kucing. Prosedur sterilisasi ini yaitu dimulai dari pengambilan daun kumis kucing dengan handscoon lalu dipilih dicuci bersih dengan air kemudian dikeringkan dengan oven suhu 50<sup>0</sup>C selama sekitar 2 hari. Sterilisasi yang dilakukan pada penelitian ini bertujuan untuk menghindari kontaminasi dari berbagai mikroorganisme yaitu bakteri, virus dan jamur.

#### 4.8.2 Identifikasi Bakteri

##### 4.8.2.1 Pewarnaan Gram

Dibuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada gelas objek dan dikeringkan di udara, sesudah kering difiksasi di atas api bunsen. Ambil sediaan lalu dituangi kristal violet selama 1 menit, sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air. Ambil sediaan lalu dituangi lugol selama 1 menit, sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air lanjutkan dengan sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik, sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dituangi safranin selama 0,5 menit, sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air, dikeringkan dengan kertas penghisap. Selanjutnya diamati dengan mikroskop pembesaran 100-400x dengan intensitas sinar rendah. Hasil untuk *Porphyromonas gingivalis* adalah berbentuk batang dan Gram negatif.

##### 4.8.2.2 Uji MacConkey

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 MacConkey (Darmawanti, 2010). Sediakan isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis*, anaerobic jar, medium MacConkey agar dan inkubator. Inkubasikan bakteri pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam lalu amati hasilnya

Bila warna media berubah menjadi merah, maka bakteri memfermentasi laktosa. Bila bakteri tidak menunjukkan perubahan warna pada media, bakteri tidak memfermentasi laktosa (Darmawanti, 2010).

#### **4.8.2.3 Tes Oksidase**

Uji oksidase ditujukan untuk menentukan bakteri tersebut menghasilkan enzim sitokrom oksidase. Tahapan yang dilakukan yaitu dengan mengambil satu ose bakteri *Porphyromonas gingivalis* lalu goreskan pada oksidase test strip, selanjutnya tunggu selama 10 detik dan amati perubahan warna. Jika hasilnya positif maka berwarna ungu yang berarti menghasilkan enzim sitokrom oksidase (Gardenia, 2010).

#### **4.8.3 Pembuatan Ekstrak Daun Kumis Kucing**

Pembuatan ekstrak daun kumis kucing dilakukan dengan metode maserasi. Daun kumis kucing dicuci bersih dengan air kemudian dikeringkan dengan oven suhu 40-50°C selama sekitar 2 hari untuk memperoleh 400 g serbuk daun kumis kucing kering, setelah itu dilakukan proses ekstraksi menggunakan alat maserasi.

Pembuatan ekstrak etanol daun kumis kucing dilakukan dengan cara daun kumis kucing diolah dengan cara dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk kering sebanyak 400 g, kemudian serbuk daun kumis kucing dicampurkan dengan 500 ml etanol 96% dan dimasukkan ke dalam maserator berpengaduk elektrik.

Maserasi dilakukan dengan pengadukan sebanyak 12 kali selama 15 menit dengan tenggang waktu 5 menit antar pengadukan lalu disimpan dalam ruang gelap selama 120 jam, setelah itu campuran tersebut disaring menggunakan kertas saring berlapis untuk memisahkan filtrat dan ampas, diperoleh larutan ekstrak etanol daun kumis kucing dengan konsentration 100%, hasil selanjutnya kemudian dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak dengan menggunakan evaporator. Hasilnya dioven ( $40^{\circ}\text{C}$ ) untuk menghilangkan sisa pelarut yang mungkin belum menguap. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak daun kumis kucing dengan konsentration 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol.

#### 4.8.4 Pemiakan Bakteri

Untuk menumbuhkan bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada media *blood agar* dilakukan tahap sebagai berikut, Strain bakteri *Porphyromonas gingivalis* dimasukkan ke dalam tabung yang berisi *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB). *Porphyromonas gingivalis* yang telah diidentifikasi, dibiakkan pada medium cair dengan menggunakan *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dan disimpan dalam *anaerobic jar* selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) berisi bakteri dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer kemudian diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada  $\lambda = 625\text{ nm}$ . Dari hasil yang diperoleh (OD = 0,1) sebanding dengan  $1 \times 10^8$  CFU/ml, kemudian dilakukan pengenceran hingga  $1 \times 10^6$  CFU/ml dengan rumus  $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$  (Murray, 1999).

Untuk mendapatkan suspensi bakteri yang mengandung  $1 \times 10^6$  dapat dilakukan dengan cara pengenceran dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung  $1 \times 10^8$  CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,9% steril. Maka

akan didapatkan suspensi bakteri dengan konsentrasi  $10^7$  CFU/ml. Proses dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu  $1 \times 10^6$  CFU/ml (Murray, 1999). Pada hasil pengenceran itu, bakteri diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 1 cc dan diteteskan ke dalam cawan petri yang telah berisi media *blood agar* dan diratakan dengan ose.

#### **4.8.5 Prosedur Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kumis Kucing Menggunakan Metode *Dilusi* Tabung**

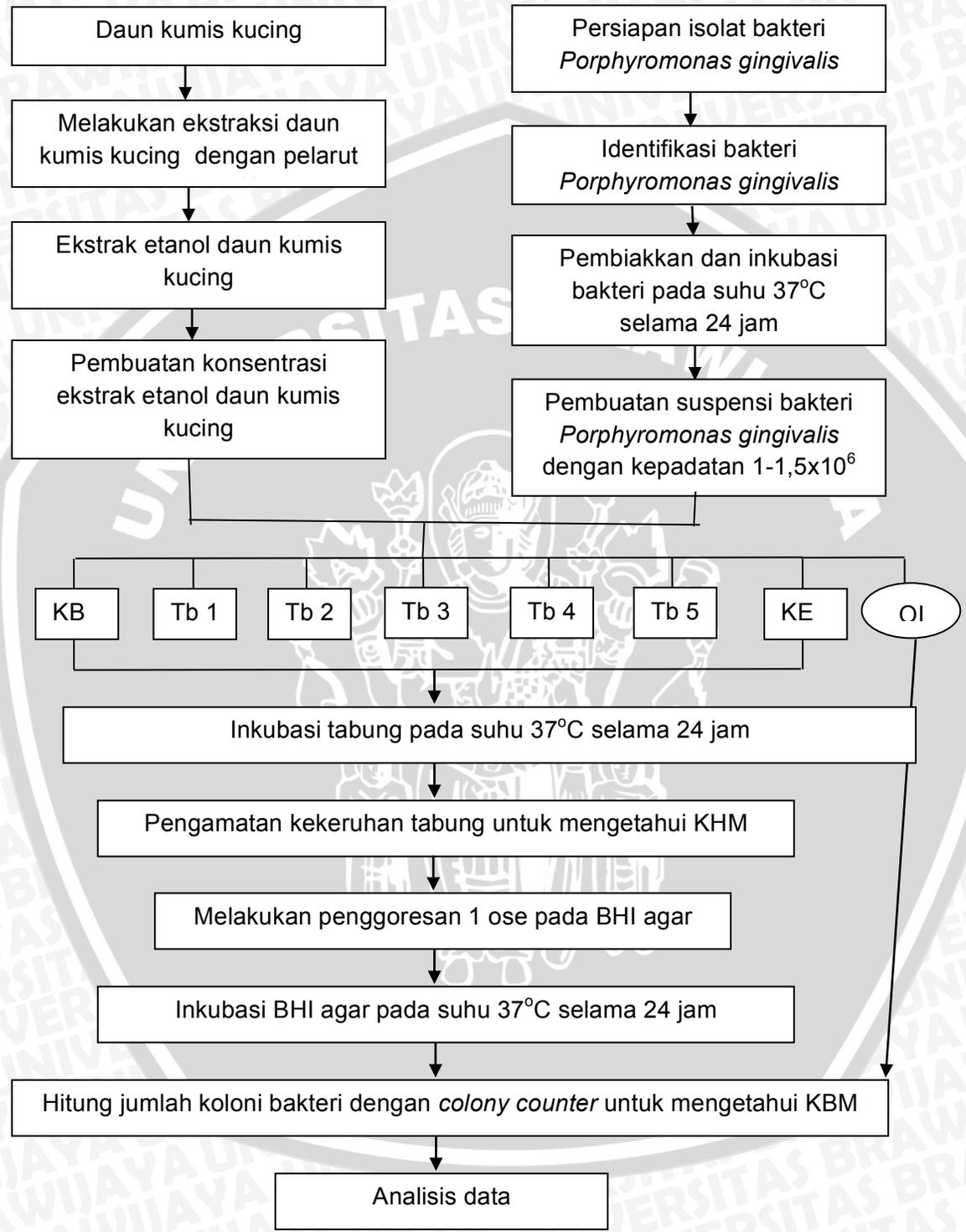
Penentuan konsentrasi hambat minimum dan konsentrasi bunuh minimum bahan ekstrak etanol daun kumis kucing terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* dilakukan dengan metode dilusi. Rangkaian uji antibakteri ekstrak etanol daun kumis kucing adalah sebagai berikut, siapkan 7 buah tabung reaksi untuk koloni *Porphyromonas gingivalis* yang telah dibiakkan dalam BHI dan telah disetarakan kekeruhannya dengan spektrofotometer. 5 tabung untuk konsentrasi uji dan 1 tabung sebagai kontrol bakteri (kontrol bakteri, disingkat KB), serta 1 tabung sebagai kontrol bahan (kontrol ekstrak, disingkat KE). Serta sediakan 8 plate steril, 7 plate untuk perlakuan yang tersebut di atas, 1 plate sebagai original inoculum (OI). Dilakukan penelitian pendahuluan digunakan untuk pencarian konsentrasi. Diawali dengan konsentrasi ekstrak 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; dan 0%. Setelah itu dilakukan perapatan konsentrasi berdasarkan hasil dari penelitian tersebut hingga dicapai rentang konsentrasi tertentu, lalu menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi  $1 - 1,5 \times 10^6$  CFU/ml. Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung, masing-masing sebanyak 1 ml. Sehingga konsentrasi akhir ekstrak etanol daun kumis kucing adalah : Tabung 1 : 100% (KE), Tabung 2 : 50%, Tabung 3 : 25%, Tabung 4 : 12,5%, Tabung 5 : 6,25%, Tabung 6 :

3,125%, Tabung 7 : 0% (KB), masing-masing tabung di-vortex sebentar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C, lalu membuat original inoculum (OI). OI dibuat untuk menentukan KBM, inkubasi tabung dalam inkubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam kemudian nilai KHM didapatkan dengan melihat tingkat kekeruhan tabung. Tingkat kekeruhan tabung diamati secara visual dibantu dengan kertas bergaris-garis hitam yang diletakkan di belakang tabung, selanjutnya dari masing-masing tabung pada no. 7 diambil satu ose lalu dilakukan penggoresan pada BHI agar. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Nilai KBM dilihat dari jumlah koloni yang terbentuk dengan menggunakan colony counter.

#### 4.9 Analisis Data

Dilakukan tiga kali pengulangan percobaan, kemudian hasil data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji statistik *one way ANOVA* dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun kumis kucing terhadap jumlah koloni *Porphyromonas gingivalis*. Uji korelasi untuk menunjukkan apakah ada hubungan konsentrasi ekstrak etanol daun kumis kucing dengan jumlah pertumbuhan koloni *Porphyromonas gingivalis*. Uji ini untuk mengetahui arah hubungan tersebut, apakah dengan peningkatan konsentrasi akan menjadikan penurunan jumlah koloni, dan sebaliknya, atau tidak berhubungan. Uji regresi berfungsi untuk mengetahui seberapa besar hubungan tersebut. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program *Statistical Product of Service Solution* (SPSS) (Budiarto, 2001).

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian dengan Metode Dilusi Tabung

**Keterangan:**

**Tb** = tabung

**KE** = kontrol ekstrak/kontrol bahan

**KB** = kontrol bakteri

**OI** = *Original Inoculum*

