

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *true eksperimental post control design* secara *in vitro*. Metode dilusi tabung digunakan untuk menentukan KHM dan KBM. Ekstrak kulit apel malang dan apel washington didapat dengan cara ekstraksi metode maserasi dengan pelarut etanol.

4.2 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, pada bulan November 2016 - Januari 2017 dan proses ekstraksi dilakukan di Matera Medika, Batu, Malang.

4.3 Sample dan Besar Sample

Sample yang digunakan adalah isolat bakteri *Streptococcus mutans* dengan kepadatan 10^6 CFU/mL yang dikultur di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini menggunakan lima konsentrasi dari ekstrak kulit apel malang dan apel washington (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%) yang ditentukan berdasarkan penelitian pendahuluan dan satu kelompok kontrol tanpa diberi ekstrak etanol kulit apel malang dan apel washington.

Banyaknya sampel dihitung dengan rumus (Notobroto, 2005):

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

keterangan :
n = jumlah pengulangan
p = jumlah perlakuan

karena jumlah perlakuan adalah enam maka :

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

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

Dengan demikian, didapatkan empat sampel penelitian untuk memenuhi persyaratan uji statistik.

4.4 Variable Penelitian

4.4.1 Variable Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi dari ekstrak kulit apel malang dan washington, dimana masing-masing terdapat lima konsentrasi (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, dan 0% sebagai kontrol) yang ditentukan berdasarkan penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variable Terikat

Variable terikat dari penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan KHM (Kadar Hambat Minimum) dilihat dari tingkat kekeruhan yang dihasilkan pada media cair dan KBM (Kadar Bunuh Minimal) dilihat dari jumlah koloni pada media padat.

4.5 Definisi Operasional

- a. Kulit apel malang dan washington yang digunakan berasal dari apel segar dengan karakteristik tingkat kematangan matang. Warna kulit apel malang hijau kemerahan dan washington berwarna merah. Masing-masing apel didapat di Istana Buah, Malang.

- b. Ekstrak etanol kulit apel malang dan washington didapat dengan mengeringkan kulit apel lalu dihaluskan dan dilakukan ekstraksi dingin (maserasi) dengan menggunakan etanol 96%.
- c. Konsentrasi ekstrak kulit apel malang dan washington yang digunakan pada penelitian ini adalah (0%,1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%) diperoleh berdasarkan penelitian pendahuluan sebelumnya.
- d. Isolat bakteri *Streptococcus mutans* didapat dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.
- e. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi ekstrak etanol kulit apel malang dan apel washington terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *Streptococcus mutans*. Hal ini ditandai dengan pertumbuhan koloni pada medium agar tidak ada.
- f. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi ekstrak kulit apel malang dan apel washington terendah yang dapat membunuh koloni *Streptococcus mutans*, hal ini ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni dari *Streptococcus mutans* sama sekali.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Ekstraksi Kulit Apel Malang dan Apel Washington Sebagai Bahan Uji

Alat dan bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak kulit apel malang dan apel washington adalah sebagai berikut:

1. Kulit apel malang dan apel washington (180 gram sediaan kering)
2. Kulit apel malang dan apel washington (190 gram sediaan kering)
3. Kertas saring
4. Alkoholmeter
5. Etanol 96%
6. Toples bertutup

7. Corong gelas
8. Timbangan analitik
9. Gelas ukur
10. Botol
11. Erlenmeyer
12. *Rotary evaporator*
13. *Beaker glass*
14. *Shaker digital*
15. *Waterbath*

4.6.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

Alat dan bahan yang akan digunakan untuk mengidentifikasi bakteri yaitu isolat bakteri *Streptococcus mutans*, BHI agar, *blood agar plate*, ose, cakram basitrasin, bahan-bahan pengecatan gram (lugol, alkohol, kristal violet, dan safranin), minyak emersi, bunsen, mikroskop, dan *object glass*, H₂O₂ 3%.

4.6.3 Pembuatan Bahan Cair Bakteri

Alat dan bahan yang akan digunakan untuk pembuatan bahan cair bakteri adalah larutan NaCl, spirometri, vortex, pipet steril, media BHI *Broth*, dan tabung reaksi.

4.6.4 Dilusi Tabung

Alat yang digunakan untuk uji dilusi tabung yaitu pipet steril, inkubator, tabung reaksi dengan label konsentrasi, tabung reaksi untuk kontrol bakteri dan ekstrak kulit apel malang dan apel washington, hasil ekstraksi, aquadest, vortex, dan perbenihan cairan bakteri dengan kepadatan.

4.6.5 Perbenihan

Streptococcus mutans yang telah diidentifikasi dibiakkan pada medium cair BHI lalu disimpan dalam *anaerobic jar* selama 3x24 jam dalam suhu 37° C.

4.7 Alur Operasional

4.7.1 Pembuatan Bahan Uji

Bahan uji didapat melalui proses ekstraksi, sebagai berikut :

- 1) Timbang kulit buah apel malang (180 gram) dan apel washington (190 gram) lalu dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu rata-rata 50°C. Berat yang didapatkan dari kulit apel malang sebesar 39 gram dan kulit apel Washington 36 gram.
- 2) Kulit yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan
- 3) Masukkan kulit apel malang dan apel washington halus ke dalam toples yang berbeda. Ratakan dengan ditambahkan lagi pelarut etanol 96% sampai bahan terendam, total yang ditambahkan masing-masing sebanyak 500 mL Tutup toples dengan rapat selama 72 jam dan diaduk diatas *shaker digital* 50 rpm.
- 4) Saring ekstrak cair dengan menggunakan penyaring kain dan tampung ekstrak ke dalam erlenmeyer.
- 5) Hasil ekstrak cair diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Diperlukan waktu masing-masing 30 menit untuk evaporasi.
- 6) Hasil ekstrak cair kemudian di evaporasi/diuapkan kembali diatas *waterbath* selama 2 jam.
- 7) Dari kulit buah apel yang diekstraksi dengan pelarut etanol 96% dihasilkan ekstrak cair kulit apel malang sebanyak 15 mL dan kulit apel washington sebanyak 18 mL.

4.7.2 Identifikasi *Streptococcus mutans*

Identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* dilakukan melalui beberapa uji yaitu pengecatan Gram, tes optochin, dan tes katalase. Uji pengecatan gram dilakukan untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif. Uji optochin dilakukan untuk membedakan bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang peka terhadap optochin, sementara bakteri *Streptococcus mutans* resisten terhadap optochin. Tes katalase digunakan untuk membedakan bakteri *S. mutans* dengan *Staphylococcus* (katalase positif) dari koloni *Streptococcus sp.* (katalase negatif).

1) Pewarnaan Gram

- a. Bersihkan *object glass* dengan kapas lalu dilewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak dan biarkan menjadi dingin.
- b. Buatlah hapusan *Streptococcus mutans* pada *object glass* dengan menggunakan ose. Ketebalan hapusan tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis. Setelah hapusan mengering di udara, fiksasikan dengan melewati *object glass* sebanyak kurang lebih tiga kali diatas api pada bunsen.
- c. Hapusan bakteri digenangi dengan krista violet selama satu menit kemudian bilas dengan aquadest
- d. Hapusan digenangi dengan lugol selama satu menit dan bilas dengan aquadest.
- e. Hapusan digenangi dengan alkohol 96% selama lima sampai sepuluh detik lalu di bilas dengan aquadest.
- f. Genangi hapusan dengan safranin selama tiga puluh detik dan akan terlihat luntarnya cat. Selanjutnya bilas hapusan dengan aquadest.
- g. Setelah selesai dibilas, keringkan dengan menggunakan kertas penghisap secara perlahan-lahan

- h. Kemudian sediaan ditetesi minyak emersi dan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif dengan perbesaran 1000x
- i. *Streptococcus mutans* tercat berwarna ungu yang menunjukkan bahwa gram positif. Bakteri *Streptococcus mutans* berbentuk kokus dan berantai.

2) Tes Optochin

- a. Goreskan bakteri *Streptococcus mutans* secara merata pada permukaan media *Brain Heart Infusion* agar
- b. Letakkan optochin disk di tengah inokulum dengan menggunakan penjepit steril
- c. Aturilah posisi disk dengan menekan disk perlahan-lahan pada permukaan agar tetapi jangan membenamkan disk di dalam agar.
- d. Inkubasikan semalam pada suhu 37° C di dalam inkubator.
- e. Amatilah zona hambatan di sekeliling disk. Jika terdapat zona ≤ 14 mm yang mengelilingi disk dengan diameter 6 mm, maka didapatkan hasil tes negative dan diidentifikasi sebagai *Streptococcus mutans*.

3) Tes Katalase

Sediakan pembenihan cair bakteri *Streptococcus mutans* pada *object glass*. Tetesi sediaan dengan larutan H₂O₂ 3% dan perhatikan ada tidaknya gelembung udara yang terbentuk. Hasil untuk *Streptococcus mutans* adalah katalase negatif yang menunjukkan bahwa tidak adanya gelembung udara.

4.7.3 Pembuatan Pembenihan Cair Bakteri dengan Kepadatan 10⁶ bakteri/ml

Persiapkan bakteri *S. mutans* dari media BHI yang telah diuji identifikasi. Ambil 5 koloni (d > 1 mm) dengan menggunakan ose lalu masukkan ke dalam 5 mL NaCl 0,85% steril. Ukur *optical density* dengan spektrofotometer pada

panjang gelombang 540 nm. Setelah memperoleh hasil, dibuat suspensi sel yang mengandung 1×10^6 hingga 5×10^6 dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan :

N1 : Hasil spektometri

V1 : Volume Bakteri yang akan ditambah dengan pengencer

N2 : OD (0,1 yang setara dengan 10^6 bakteri/ml)

V2 : Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

Dengan menggunakan rumus diatas, didapatkan volume bakteri yang akan ditambahkan pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml. Kemudian dilakukan pengenceran sebanyak seratus kali, sehingga akan didapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml (Murray, 2005).

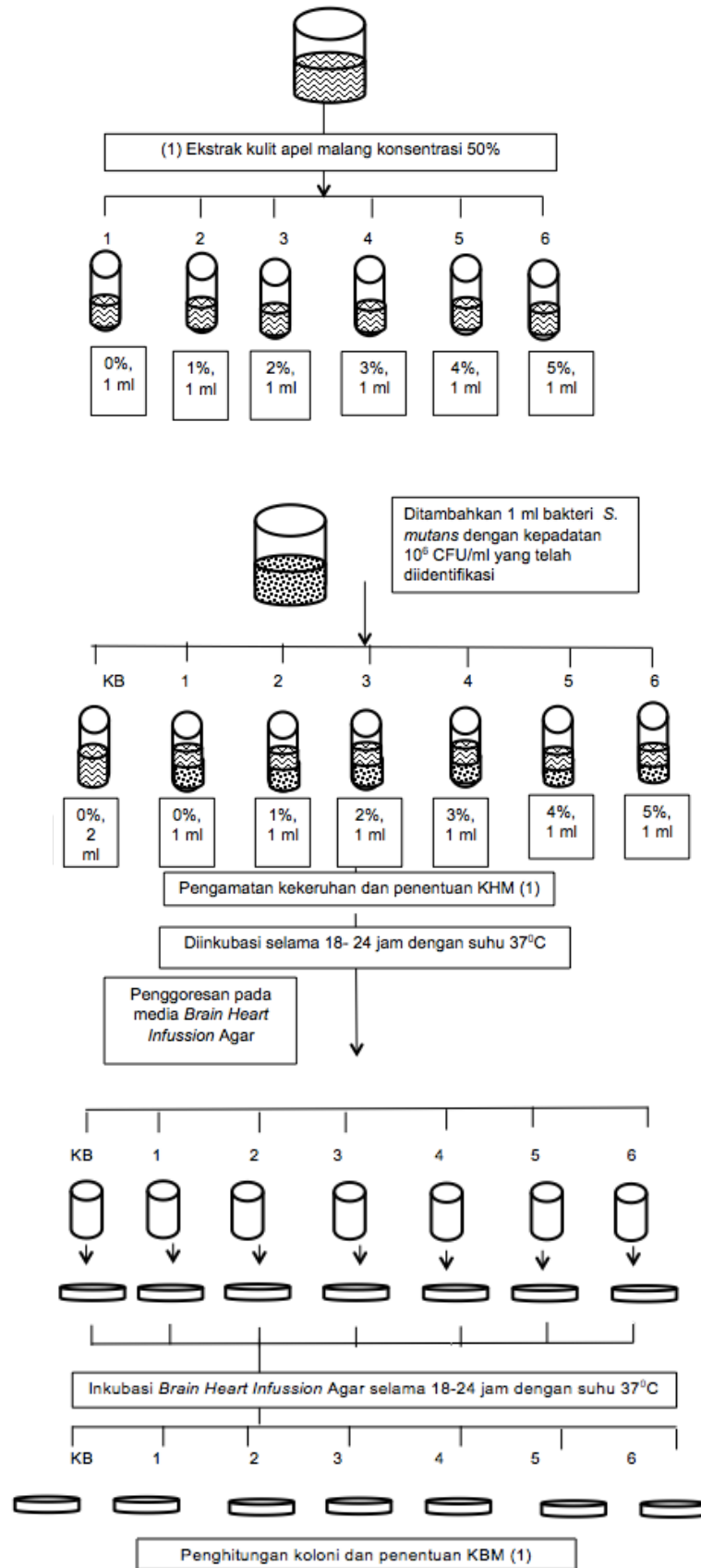
4.7.4 Uji Efek Antibakteri

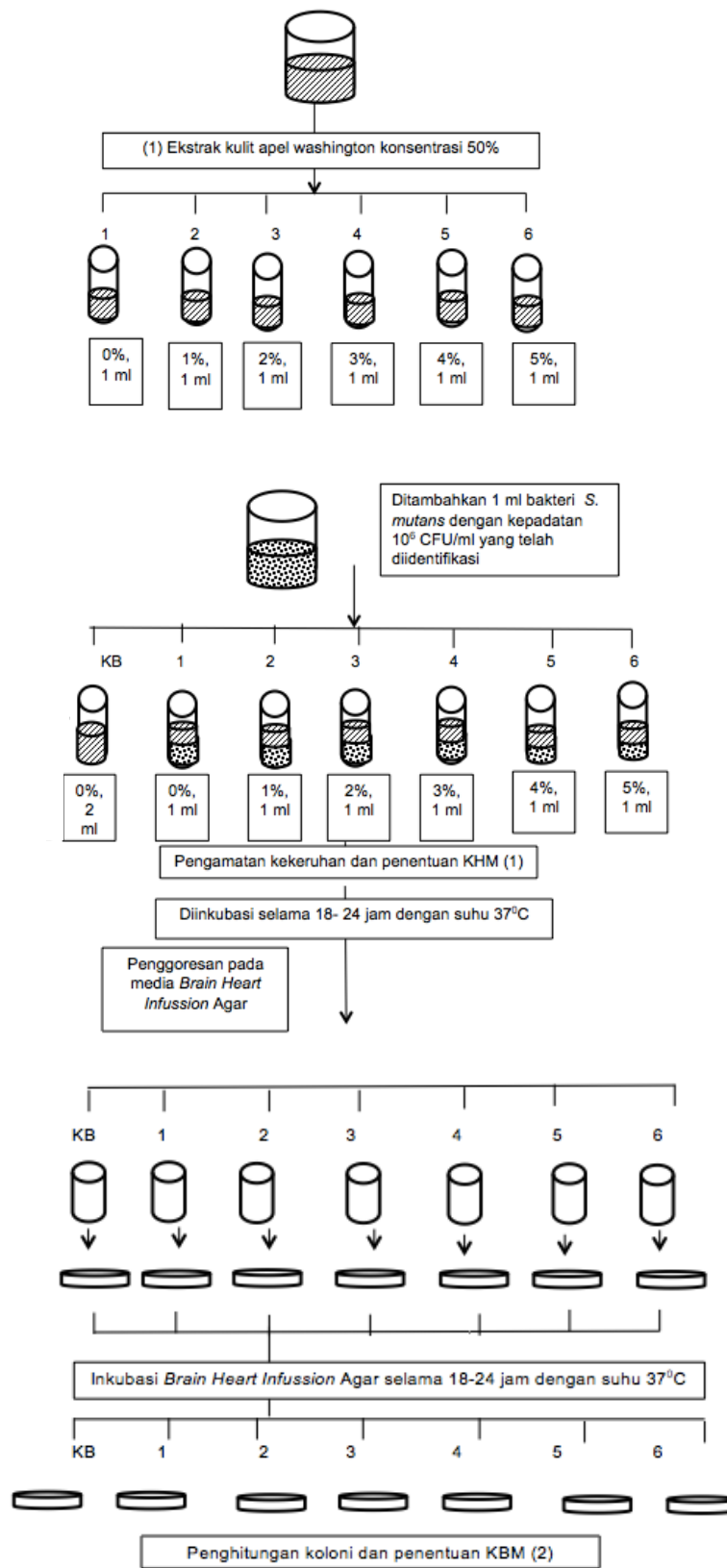
- 1) Siapkan 6 tabung steril untuk masing-masing ekstrak (6 tabung reaksi untuk setiap perlakuan) dan satu tabung untuk kontrol bakteri (KB)
- 2) Tabung tersebut masing-masing diisi dengan larutan ekstrak kulit apel malang dan apel washington dengan konsentrasi 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%.
- 3) Masukkan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* sebanyak masing-masing 1 mL dengan konsentrasi sebesar 10^6 bakteri/ml ke dalam tabung berisi ekstrak dan tabung untuk kontrol bakteri.
- 4) Masukkan ekstrak kulit apel malang dan apel washington dari konsentrasi 50% yang diencerkan untuk konsentrasi 1% berupa 0,2 mL ekstrak dan 0,8 mL akuades, konsentrasi 2% berupa 0,4 mL ekstrak dan 0,6 mL akuades, konsentrasi 3% berupa 0,6 mL ekstrak dan 0,4 mL akuades, konsentrasi 4% berupa 0,8 mL ekstrak dan 0,2

mL akuades, konsentrasi 5% berupa 1 mL ekstrak, dan 0% konsentrasi berupa 1 mL akuades. Inkubasikan semua tabung di dalam *anaerobic jar* berupa toples kaca besar selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

- 5) Setelah itu, keluarkan tabung dari inkubator. Amatilah kekeruhan yang terjadi pada setiap tabung lalu tentukan KHM. Bandingkan dengan menggunakan kertas putih yang sudah diberikan garis hitam dengan ketebalan berbeda yang diletakkan di belakang tabung untuk menilai tingkat kekeruhan. Jika warna garis dapat terlihat dengan jelas, maka tabung tersebut memiliki kejernihan yang tinggi dan menunjukkan bahwa terjadi penghambatan pertumbuhan dari koloni *Streptococcus mutans*.
- 6) Ekstrak dari masing-masing tabung diambil satu ose dengan ose yang telah dilewati api bunsen dan digoreskan pada media BHI agar plate. Kemudian seluruh plate diletakkan dalam *anaerobic jar* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- 7) Plate dikeluarkan dari inkubator dan *anaerobic jar*. Hasil koloni *Streptococcus mutans* dapat diamati.
- 8) Uji pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali untuk setiap konsentrasi dari masing-masing ekstrak. Masing-masing konsentrasi dari kedua ekstrak diambil sebanyak satu ose dan digoreskan pada media BHI agar plate. Semua plate diletakkan dalam *anaerobic jar* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- 9) Plate dikeluarkan dari inkubator dan koloni pada seluruh plate dihitung dengan *colony counter*. Konsentrasi terendah pada plate yang tidak didapati adanya pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* sama sekali merupakan KBM dari ekstrak tersebut.

4.7.5 Alur Penelitian Ekstrak Apel Malang dan Apel Washington





Gambar 4.1 Alur Penelitian

Keterangan :
 KB : Kontrol Bakteri

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian terlebih dahulu, apabila data terdistribusi normal maka teknik analisis data yang digunakan baik untuk data kuantitatif maupun kualitatif adalah *two-way ANOVA* dan dilakukan uji *Post Hoc Tukey*. Uji statistik *two-way ANOVA* dilakukan untuk apakah ada perbedaan yang bermakna antar perlakuan juga untuk menguji apakah ada perbedaan yang bermakna antara perlakuan konsentrasi satu dengan konsentrasi yang lain. Uji statistik *Post Hoc Tukey* merupakan uji pembandingan berganda (*Multiple Comparison Test*), bertujuan untuk mengetahui pasangan kelompok konsentrasi yang memberikan perbedaan signifikan dan yang tidak memberikan perbedaan signifikan. Dalam penelitian ini digunakan besar kepercayaan 95% untuk tingkat signifikansi ($\alpha = 0,05$).

