

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain penelitian

Desain penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris secara *in vitro* menggunakan ekstrak daun sirih merah (*Piper Crocatum*).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian : Pembuatan ekstrak daun sirih merah di LPPT UGM. Bakteri uji diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan sedangkan uji bakteri *Porphyromonas gingivalis* di Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY.
2. Waktu penelitian : Penelitian ini dilakukan sekitar bulan November 2016 – Januari 2017.

C. Sampel Penelitian

1. Bahan Uji

Ekstrak sirih merah (*Pipper crocatum*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Yogyakarta dan ekstrak sirih merah (*Pipper crocatum*) yang diolah di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada.

2. Bakteri Uji

Bakteri yang diujikan dalam penelitian ini adalah bakteri *Porphyromonas gingivalis*
Identifikasi variabel dan Definisi operasional penelitian

1. Identifikasi variabel

a. Variabel pengaruh

daun sirih merah (*Piper crocatum* 100% , 50% , 25% , 12,5% , 6,25% , 3,125% , 1,56% dan 0,78%)

b. Variabel terpengaruh

Pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang dilihat melalui kekeruhan pada media benih dengan pengukuran nilai KHM dan KBM.

c. Variabel terkontrol

- 1) Ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*)
- 2) Suhu pembiakan
- 3) Lama pembiakan
- 4) Media kultur populasi bakteri adalah TSA (*Trypton Soya agar*)
- 5) Sterilisasi alat

d. Variabel tidak terkontrol

Kontaminasi organisme lain seperti jamur.

2. Definisi operasional penelitian

- a. Daya antibakteri adalah kemampuan zat yang dapat menghambat dan membunuh bakteri.
- b. Ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) adalah sediaan zat aktif dalam bentuk serbuk dari daun sirih dengan menggunakan larutan etanol. Ekstrak yang diperoleh dari daun sirih merah (*Piper crocatum*) adalah 100%, 50%, 25% dan 12,5%.
- c. Bakteri *porphyromonas gingivalis* adalah bakteri Gram - negatif anaerob yang terlibat dalam patogenesis periodontitis.

D. Instrumen penelitian

1. Alat penelitian

- a. Ose steril
- b. Pipet dan mikropipet
- c. Timbangan
- d. Inkubator
- e. Tabung reaksi

- f. Kertas label
 - g. Gelas ukur
 - h. Rak tabung reaksi
 - i. Anaerob jar
 - j. Oven
 - k. Spritus
 - l. *autoclave*
 - m. Masker
 - n. *handscoon*
2. Bahan penelitian
- a. Biakan bakteri *Porphyromonas gingivalis*
 - b. Ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) konsentrasi 100%, 50%, 25% dan 12,5%, dan 0,78%.
 - c. Akuades steril sebagai kontrol negatif
 - d. Media TSA (*Tryptone Soya Agar*)
 - e. Kapas steril
 - f. Larutan media cair BHI (Brain Heart Infusion)
 - g. NaCl 0,9 % sebagai campuran larutan biakan spesimen bakteri

E. Jalannya penelitian

- 1. Tahap persiapan penelitian
 - a. Persiapan penelitian
 - 1) Mengurus surat izin penelitian
 - 2) Mengurus *ethical clearence*
 - b. Sterilisasi alat

Alat yang digunakan untuk uji bakteri yang terbuat dari kaca yang disterilkan dengan oven yang suhunya 180° C – 200° C selama 1 jam, sedangkan untuk media agar darah dapat disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 200° C.

2. Pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*)

Pembuatan ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dilakukan di laboratorium penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM). Pembuatan ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan cara maserasi. Sebelum dimaserasi, daun sirih merah (*Piper crocatum*) dicuci bersih. kemudian dikeringkan dengan temperatur (32-35° C) dan dihindarkan oleh sinar matahari langsung sampai mengering. Setelah itu, diblender sampai halus menjadi serbuk. Serbuk daun sirih merah (*Piper crocatum*) dimaserasi dengan etanol 70% selama 24 jam, kemudian disaring menggunakan corong *buchner*. Setelah proses maserasi, serbuk yang masih tersisa digunakan kembali untuk proses remaserasi untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang maksimum. Filtrat diuapkan dengan menggunakan *Rotary Evaporator* untuk menghilangkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak yang pekat dan kental. Hasil akhir berupa ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan konsentrasi 100%.

3. Pembuatan suspensi bakteri

Pembuatan suspensi bakteri berdasarkan standar Brown III yaitu dengan menggunakan ose steril diambil 4-5 ose bakteri dan dilarutkan dalam larutan NaCl fisiologis. Kemudian, suspensi diinkubasi selama 5 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis* dilarutkan kembali dengan media BHI cair sehingga sesuai standar konsentrasi bakteri 10⁸ CFU/ml. larutan diencerkan lagi hingga mencapai konsentrasi 10⁶ CFU/ml.

4. Penentuan KHM dan KBM bahan uji

Uji antibakteri ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan metode pengenceran tabung (*tube dilution method*) adalah :

- a. Menyiapkan tabung reaksi steril sebanyak 24 tabung dengan 4 kali pengulangan.
Sehingga perlu 8 tabung untuk 1 kali pengulangan yang masing-masing diberi label 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% antibiotik sebagai kontrol positif, dan akuades steril sebagai kontrol negatif.
- b. Ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dimasukan tabung reaksi sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan.
 - 1) Tabung 1 dengan konsentrasi 100% diisi 1 ml ekstrak.
 - 2) Tabung 2 dengan konsentrasi 50% diisi dengan larutan konsentrasi awal sebanyak 1 ml kemudian dicampur hingga homogen.
 - 3) Tabung 3 dengan konsentrasi 25% diisi dengan larutan konsentrasi yang diambil dari tabung no.2 sebanyak 1 ml.
 - 4) Tabung 4 dengan konsentrasi 12,5% diisi dengan larutan konsentrasi yang diambil dari tabung no.3 sebanyak 1 ml.
 - 5) Tabung 5 dengan konsentrasi 6,25% diisi dengan larutan konsentrasi yang diambil dari tabung no.4 sebanyak 1 ml.
 - 6) Tabung 6 dengan konsentrasi 3,125% diisi dengan larutan konsentrasi yang diambil dari tabung no.5 sebanyak 1 ml.
 - 7) Tabung 7 dengan konsentrasi 1,56%, diisi dengan larutan konsentrasi yang diambil dari tabung no.6 sebanyak 1 ml.
 - 8) Tabung 8 dengan konsentrasi 0,78% diisi dengan larutan konsentrasi yang diambil dari tabung no.7 sebanyak 1 ml.
 - 9) Tabung 9 digunakan sebagai kontrol positif, diisi suspensi bakteri.

- 10) Tabung 10 digunakan sebagai kontrol negatif yang diisi dengan sisa pengenceran
- c. Tabung 1 sampai dengan 8 ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 1 ml dengan menggunakan mikropipet. Tabung 9 berisi suspensi bakteri sebagai kontrol positif. Tabung 10 berisi sisa pengenceran sebagai kontrol negatif.
 - d. Semua tabung dilakukan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Semua tabung dikeluarkan dari inkubator pada hari kedua kemudian dilakukan pemeriksaan ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan adanya kekeruhan didalam tabung. Kadar Hambat Minimal ditentukan dengan konsentrasi yang pertama terlihat jernih pada tabung. Tabung yang terlihat keruh menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri.
 - e. Mengetahui Kadar Bunuh Minimal dilakukan dengan penggoresan pada 10 tabung hasil inkubasi hari kedua pada medium TSA yang kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C sebanyak satu ose. KBM ditunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada medium TSA dikonsentrasi terendah.
 - f. Tabung 1 sampai dengan 4 ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 1 ml dengan menggunakan mikropipet. Tabung 5 berisi antibiotik metronidazol dan 1 ml bakteri sebagai kontrol positif. Tabung 6 berisi akudes steril sebagai kontrol negatif.
 - g. Semua tabung dilakukan inkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C. Semua tabung dikeluarkan dari inkubator pada hari kedua kemudian dilakukan pemeriksaan ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan adanya kekeruhan didalam tabung. Kadar Hambat Minimal ditentukan dengan konsentrasi yang pertama terlihat jernih pada tabung. Tabung yang terlihat keruh menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri.

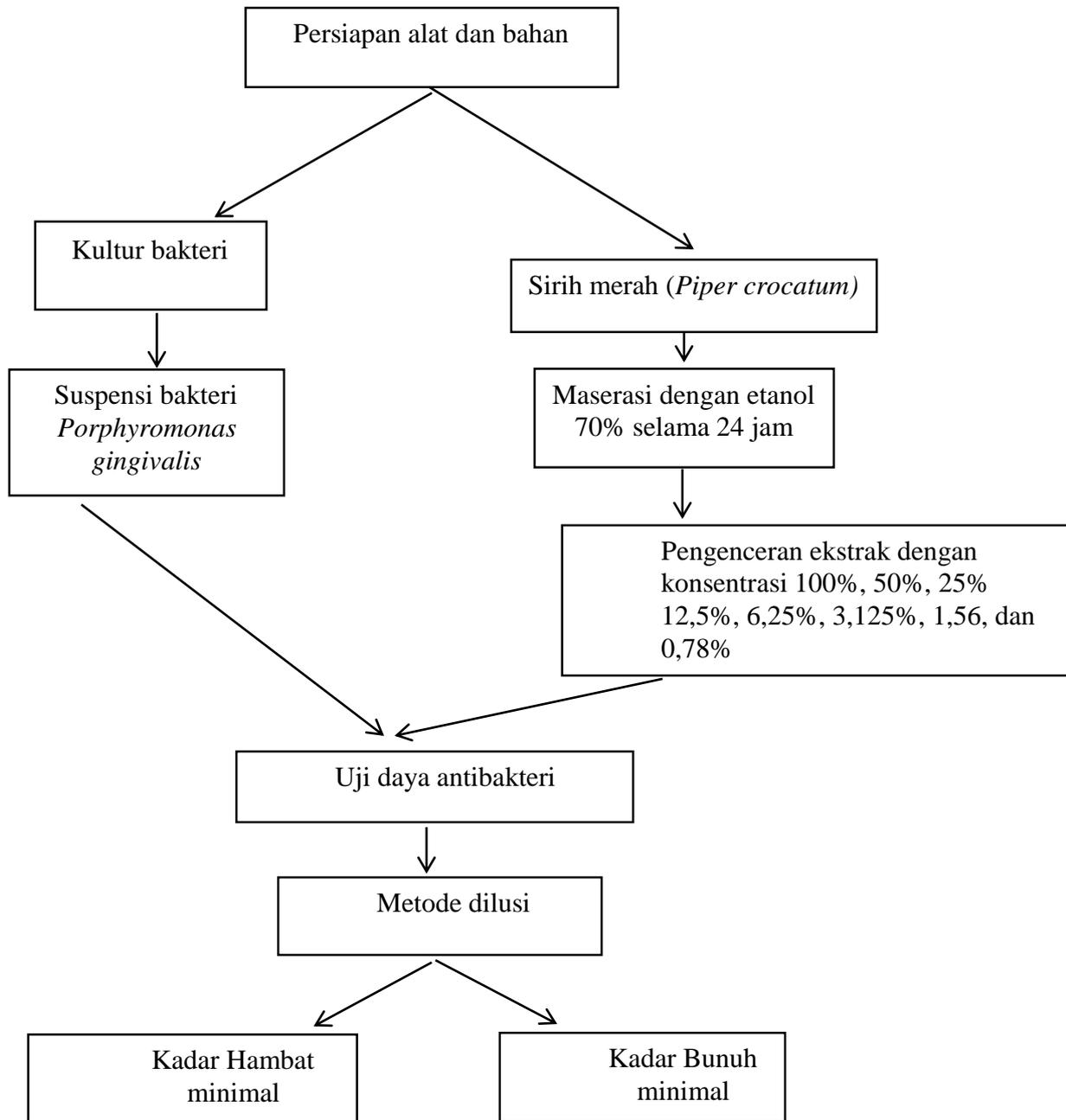
- h. Mengetahui Kadar Bunuh Minimal dilakukan dengan penggoresan pada tabung hasil inkubasi hari kedua pada 2 medium TSA yang kemudian diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37-37,5°C sebanyak satu ose. KBM ditunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada medium TSA di konsentrasi terendah.

KHM ditentukan dengan cara melihat kekeruhan pada larutan dalam tabung yang dibandingkan dengan kontrol, sebagai berikut:

- a. Tanda negatif (-) menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* sehingga ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dapat menghambat terjadinya pertumbuhan bakteri.
- b. Tanda positif (+) menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* sehingga ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) tidak dapat menghambat terjadinya pertumbuhan bakteri.
- c. Pembacaan KBM ditentukan dengan mengujikan bahan menggunakan konsentrasi yang terendah dari bahan uji yang masih dapat membunuh bakteri. Sehingga KBM ditunjukkan dengan ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada media TSA.

F. Alur penelitian

Skema alur penelitian adalah sebagai berikut:



Gambar 3. Alur Penelitian

G. Analisis Data

Mengukur Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari ekstrak etanol sirih merah (*Piper crocatum*) menggunakan uji deskriptif terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis*.