

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Desain penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris secara *in vitro* menggunakan ekstrak buah Asam Jawa (*Tamarindus indica L*) yang diujikan pada bakteri *P. gingivalis*.

B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

1. Tempat Penelitian : Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, LPPT Universitas Gadjah Mada dan Balai Laboratorium Kesehatan Kota Yogyakarta.
2. Waktu penelitian : Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2016 – Januari 2017

C. SUBYEK PENELITIAN

1. Bahan uji

Ekstrak buah Asam Jawa (*Tamarindus indica L*) yang diperoleh dari Kabupaten Klaten, Yogyakarta dan ekstrak daging buah Asam Jawa (*Tamarindus indica L*) yang diolah di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada.

2. Bakteri Uji

Bakteri yang akan digunakan adalah *P. gingivalis* ATCC 33277 dengan isolasi dan identifikasi sesuai dengan karakteristik strain *P. gingivalis* yang diperoleh di Laboratorium Balai Kesehatan (BLK) Daerah Kota Yogyakarta.

D. VARIABEL DAN DEFINISI OPERASIONAL

1. Identifikasi Variabel

a. Variable pengaruh

Ekstrak Asam Jawa (*Tamarindus indica* L) konsentrasi 100 %, 50%, 25%, 12,5%, 6,25 %, 3,12 %, 1,56 %, 0,78 %, 0,39 %, 0,18 %.

b. Variable terpengaruh

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

c. Variable terkendali

- 1) Suhu inkubasi *P. gingivalis* 37°C
- 2) Durasi inkubasi *P. gingivalis* selama 24 jam
- 3) Sterilisasi alat
- 4) Konsentrasi ekstrak Asam Jawa (*Tamarindus indica* L) 100 %, 50%, 25%, 12,5%, 6,25 %, 3,12 %, 1,56 %, 0,78 %, 0,39 %, 0,18 %.
- 5) Konsentrasi bakteri 10⁶ CFU/ml

6) Media agar darah untuk pertumbuhan bakteri

2. Defenisi operasional

- a. Daya antibakteri adalah kemampuan zat yang dapat menghambat dan membunuh bakteri
- b. Ekstrak daging buah Asam Jawa adalah ekstrak yang diperoleh dengan melakukan ekstraksi dengan proses maserasi. Pertama kali daging buah Asam Jawa dikeringkan, kemudian selanjutnya dihaluskan dengan blender dan dimaserasi etanol 70% kemudian hasil maserasi disaring dengan kertas saring. Pada penelitian ini menggunakan ekstrak daging buah Asam Jawa dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25 %, 3,12 %, 1,56 %, 0,78 %, 0,39 %, 0,18 %.
- c. *P. gingivalis* merupakan bakteri gram negatif yang bersifat anaerob dan merupakan salah satu bakteri penyebab periodontitis. Bakteri *P. gingivalis* ATCC 33277 dengan isolasi dan identifikasi sesuai dengan karakteristik strain *P. gingivalis* yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Kota Yogyakarta.
- d. Metode yang digunakan adalah serial dilusi, yaitu pengenceran bertahap dari suatu zat dalam larutan. Biasanya faktor pengenceran di setiap langkah adalah konstan, sehingga dalam perkembangan geometris dari konsentrasi dalam metode logaritmik.

E. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

1. Alat yang digunakan dalam penelitian
 - a. Tabung reaksi
 - b. Tabung erlenmeyer
 - c. Ose steril
 - d. spiritus
 - e. *Handscoon*
 - f. Masker
 - g. Lidi kapas
 - h. *Paper point*
 - i. Cawan Petri
 - j. Rak tabung
 - k. Pipet dan mikropipet
 - l. *Sliding caliper* dengan ketelitian 0,01 mm
 - m. Incubator
 - n. Timbangan untuk menimbang Asam Jawa
 - o. Blender untuk menghaluskan Asam Jawa
 - p. *Anaerbob jar*
 - q. Oven
 - r. *Vortex*

2. Bahan yang digunakan dalam penelitian
 - a. Ekstrak daging buah Asam Jawa (*Tamarindus indica L*) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25 %, 3,12 %, 1,56 %, 0,78 %, 0,39 %, 0,18 %.
 - b. Bakteri *P. gingivalis*
 - c. Etanol 70% sebagai pelarut ekstrak
 - d. NaCl
 - e. Akudes steril
 - f. Media agar TSA (*Tryptocase Soy Agar*)
 - g. BHI cair

F. JALANNYA PENELITIAN

1. Tahap persiapan penelitian

Tahap Persiapan yang harus dilakukan adalah mengurus surat ijin penelitian dan juga sterilisasi alat. Alat yang digunakan untuk uji bakteri yang terbuat dari kaca disterilkan dengan oven pada suhu 180°C – 200°C selama 1 jam, sedangkan untuk media agar darah di sterilkan dengan *autoclave* pada suhu 200°C selama 15 menit.

2. Persiapan Bakteri Uji

Satu koloni bakteri diambil dari hasil isolat yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose steril dan dimasukkan kedalam tabung yang berisi NaCl 1 ml, kemudian diinkubasi pada suhu

37°C selama 2-4 jam. Setelah diinkubasi selama 2-4 jam, kemudian larutan bakteri akan dibuat suspensi sesuai standar Brown III yaitu diencerkan dengan media BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian digojok hingga kekeruhan 10^8 CFU/ml, kemudian diencerkan lagi berseri dengan larutan BHI hingga diperoleh bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml (Kartikasari *et al*, 2008).

3. Pembuatan Ekstrak Daging Buah Asam Jawa (*Tamarindus indica L*)

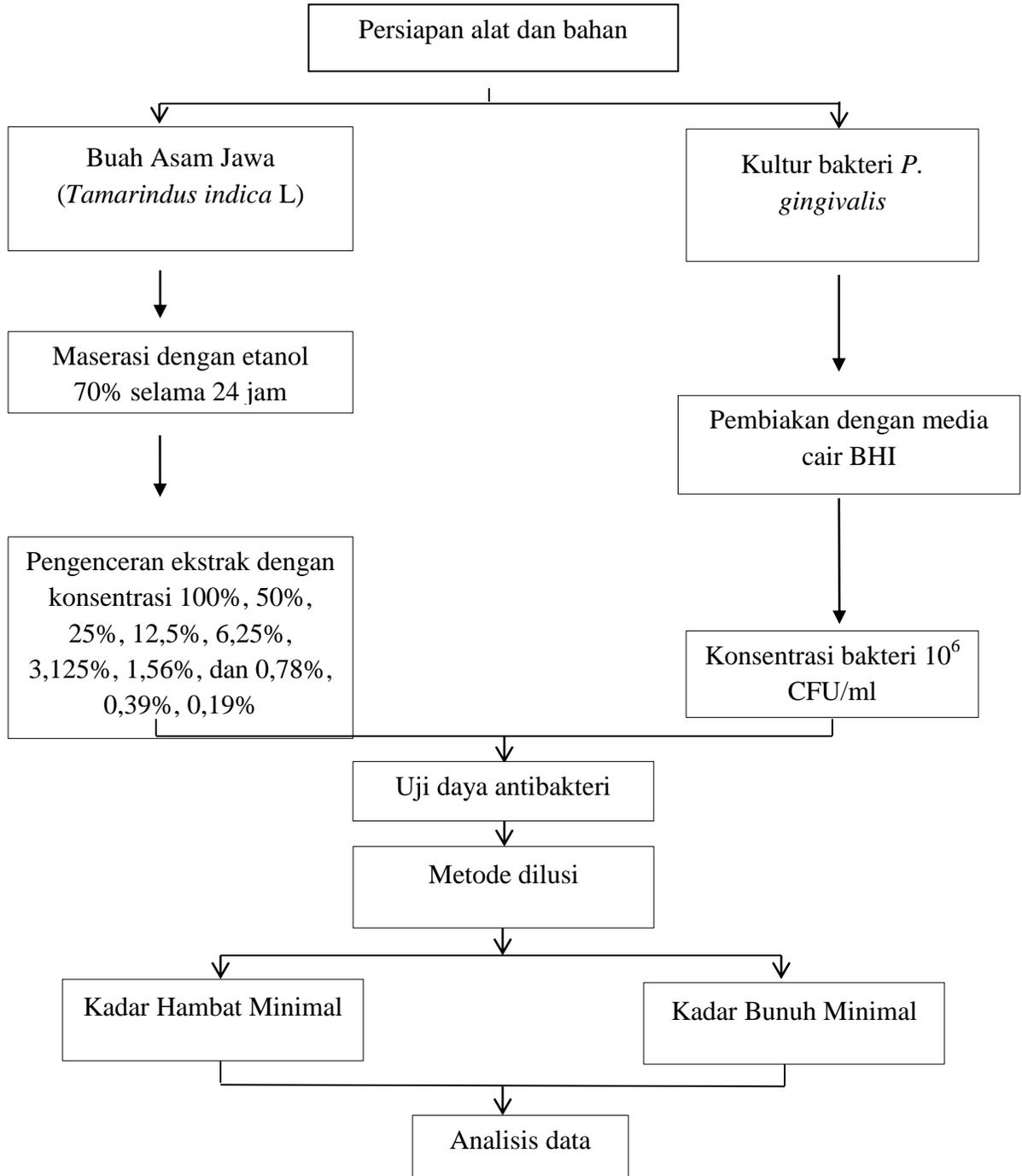
Pembuatan ekstrak Daging Buah Asam Jawa (*Tamarindus indica L*) dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM). Pembuatan dengan cara maserasi. Sebelum dimaserasi, Asam Jawa dicuci bersih. Daging buah Asam Jawa dikeringkan dengan temperatur (32-35°C) dan dihindarkan oleh sinar matahari langsung sampai mengering. Setelah itu, diblender sampai halus menjadi serbuk. Serbuk Asam Jawa 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 Asam Jawa dengan konsentrasi 100%.

4. Penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) Bakteri

- a. Dalam penelitian ini dilakukan 3 kali percobaan, disetiap percobaan menggunakan 12 tabung reaksi.
- b. Tabung reaksi pertama diisi larutan ekstrak 100% Aquades sebanyak 1 ml. Aquades dimasukan kedalam tabung reaksi ke 2 sampai kedalam tabung reaksi ke 6. Selanjutnya pada tabung reaksi ke 2 dimasukan larutan ekstrak sebanyak 1 ml dan dicampur hingga homogen. Setelah itu diambil larutan 1 ml dari tabung ke 2 untuk dimasukan kedalam tabung ke 3 dengan menggunakan pipet ukur. Begitu seterusnya hingga didapatkan pengenceran serial dari tabung ke 1 sampai tabung ke 10. Sebagai kontrol negatif digunakan larutan aquades murni didalam tabung reaksi ke 11, dan sebagai kontrol positif tabung reaksi ke 12 berisi sisa pengenceran.
- c. Setelah pengenceran serial selesai , selanjutnya sebanyak 1 ml larutan BHI cair yang berisi suspensi bakteri uji dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml kedalam tabung 1 sampai tabung 10 sehingga volume akhir masing-masing menjadi 2 ml.
- d. Konsentrasi larutan ekstrak Asam Jawa yang dicampur dengan larutan BHI berturut-turut dari tabung ke 1 sampai ke 10, tabung ke 1 100%, tabung ke 2 50%, tabung ke 3 25%, tabung ke 4 12,5%, tabung ke 5 6,25%, tabung ke 6 3,12%, tabung ke 7 1,56%, tabung ke 8 0,78%, tabung ke 9 0,39%, tabung ke 10 0,18%.

- e. Ke 12 tabung selanjutnya dimasukkan kedalam *anaerobic jar* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- f. Pengamatan dilakukan setelah proses inkubasi selama 24 jam selesai dengan cara membandingkan dengan kontrol positif.
- g. Kadar Hambat Minimum didapat dengan mengamati tabung subkultur yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi terendah.
- h. Tabung-tabung yang tidak memperlihatkan pertumbuhan bakteri selanjutnya ditanam pada media nutrient agar.
- i. Setelah ditanam pada media nutrient agar selanjutnya diinkubasi lagi selama 24 jam pada suhu 37°C
- j. Kadar Bunuh Minimum ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media agar nutrient dengan konsentrasi terendah.

G. ALUR PENELITIAN



Bagan 1. Alur Penelitian

H. ANALISIS DATA

Setelah penelitian selesai, data hasil penelitian disajikan menggunakan tabel.

Penelitian ini dianalisa secara deskriptif.

