

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris murni secara in-vitro menggunakan ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang diujikan pada bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

B. SAMPEL PENELITIAN

1. Bahan Uji

Daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang diperoleh dari desa Tritis, Kecamatan Samigaluh, Kabupaten Kulonprogo, Yogyakarta dan ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang dibuat di

2. Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang di peroleh dari lab mikrobiologi UGM

3. Besar sampel

Jumlah ulangan dari tiap kelompok perlakuan akan dihiung menggunakan rumus Federer. Kelompok perlakuan berjumlah tujuh yaitu lima konsentrasi ekstrak daun teh hijau (30%, 40%, 50%, 70%

dan 100%), satu kontrol negatif (aquades steril) dan satu kontrol positif (antibiotik amoksisilin).

Rumus Federer yang digunakan adalah $(t-1)(n-1) \geq 15$, dimana :

t = jumlah kelompok tiap perlakuan

n = jumlah ulangan tiap perlakuan

diketahui : $t = 7$

ditanya : $n = ?$

Jawab : $(t-1)(n-1) \geq 15$

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan minimal tiap kelompok perlakuan adalah 4 kali pengulangan kemudian dari hasil tersebut ditambah dengan drop out 10% sehingga jumlah pengulangan tiap kelompok perlakuan yang diperlukan adalah 5 kali pengulangan (Tanjong, 2011).

Kelompok perlakuan yang berjumlah tujuh kelompok dibagi menjadi 2 cawan petri, cawan petri pertama dibuat 4 lubang sumuran dan cawan petri kedua dibuat 3 sumuran. Setiap cawan petri diulang sebanyak lima kali sehingga dibutuhkan 10 cawan petri.

4. Kriteria Inklusi

Kriteria Inklusi

- 1.) Daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang masih segar
- 2.) Daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang berasal dari satu pedagang dari satu daerah perkebunan.

Kriteria Eksklusi

- 1.) Bakteri *Phorphyromonas gingivalis* yang terkontaminasi dengan lingkungan
- 2.) Ekstrak daun teh hijau yang terkontaminasi dengan lingkungan
- 3.) Cawan petri yang terkontaminasi dengan lingkungan

C. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta untuk pengujian ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap *Porphyromonas gingivalis* dan proses ekstraksi daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel pengaruh

Ekstrak daun teh hijau (*Camelia sinensis*)

2. Variabel terpengaruh

Pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang ditunjukkan dengan diameter zona radikal dalam cawan petri yang telah diinokulasikan dengan bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada media TSA (Tryptone Soya Agar) setelah pemberian ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 70%, 100%

3. Variabel terkendali

a. Suhu inkubator 37 C

b. Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 70%, 100%

c. Etanol 70% sebagai penyari

d. Jenis media kultur bakteri TSA (Tryptone Soya Agar)

e. Lama Pengeraman 48 jam

f. Konsentrasi bakteri 10 CFU/ml (LARUTAN BROWN III)

E. DEFINISI OPERASIONAL

1. Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) adalah sediaan kental yang diperoleh dengan cara ekstraksi daun teh hijau(*Camellia sinensis*)

menggunakan teknik maserasi dengan penyari etanol 70% (Amelia, 2012)

2. *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri gram negatif yang bersifat anaerob. Menjadi salah satu bakteri penyebab periodontitis, sebagian besar ditemukan di daerah *subgingiva*.
3. Daya antibakteri adalah kemampuan ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) membunuh dan menghambat pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

F. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

1. Alat Penelitian

- a. Ose untuk meratakan suspensi bakteri dalam larutan tes pembanding maupun kontrol pada media agar.
- b. Inkubator untuk pengeraman bakteri
- c. Cawan petri sebagai tempat *Tryptone Soya Agar*
- d. Lampu spiritus untuk mensterilkan peralatan
- e. Jangka sorong untuk pengukuran hasil
- f. Alat tulis untuk mencatat hasil percobaan
- g. Mikropipet untuk mengambil larutan NaOCl Fisiologis

2. Bahan Penelitian

- a. Ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 70%, dan 100%

- b. Aquades steril sebagai kontrol negatif dan untuk mengencerkan ekstrak daun teh hijau
- c. Bakteri *Porphyromonas gingivalis*
- d. Media cair BHI (*Brain Heart Infusion*)
- e. *Tryptone Soya Agar* (TSA) untuk pertumbuhan koloni bakteri
- f. Larutan NaCL fisiologis untuk melarutkan bakteri

G. CARA KERJA

1. Persiapan

Menyiapkan alat dan bahan serta sterilisasi alat

2. Pembuatan ekstra daun Teh Hijau (*Camelia sinensis*)

Daun teh hijau (*Camelia sinensis*) segar dicuci bersih dan dikeringkan dalam almari pengering dengan suhu 45°C selama 48 jam. Setelah kering diserbuk menggunakan mesin penyerbuk dengan saringan diameter lubang 1mm sampai selesai dan ditimbang dengan neraca timbang sehingga didapatkan berat keringnya. Selanjutnya dilakukan proses ekstraksi yaitu serbuk dimasukkan ke dalam toples yang berisi etanol 70 % sambil diaduk selama 30 menit dan didiamkan minimal 24 jam. Hasilnya disaring atau difiltrasi sebanyak 3 kali dengan corong *Buchner* sehingga diperoleh filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan *vacuum rotary* pada suhu 70°C dan dipanaskan dengan pemanas *water bath* sehingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental ini kemudian dituang ke

dalam cawan porselin dan dipanaskan lagi dengan pemanas *water bath* sambil terus diaduk. Hasil akhirnya berupa ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 100 %. Ekstrak daun teh hijau murni diencerkan dengan menggunakan aquades steril sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan, yaitu 30%, 40%, 50%, 70% dan 100%. Pengenceran ekstrak daun teh hijau konsentrasi 30%, 40%, 50%, 70% dan 100% diperoleh dengan cara pengenceran menggunakan aquades steril dengan perhitungan sebagai berikut.

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

Keterangan:

N_1 : konsentrasi awal ekstrak daun teh hijau (%)

V_1 : volume awal ekstrak daun teh hijau

N_2 : konsentrasi akhir ekstrak daun teh hijau (%)

V_2 : volume akhir ekstrak daun teh hijau

(Kartikasari *et al.*, 2008)

3. Pembuatan Suspensi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Pembuatan suspensi bakteri dibuat sesuai dengan standar Brown III yaitu menggunakan ose steril diambil 4-5 ose bakteri dan dilarutkan dalam larutan NaCl fisiologis. Suspensi tersebut diinkubasikan dalam inkubator selama 5 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis* tersebut dilarutkan kembali dalam media agar BHI (*Brain Heart Infusion*) cair sehingga sesuai dengan

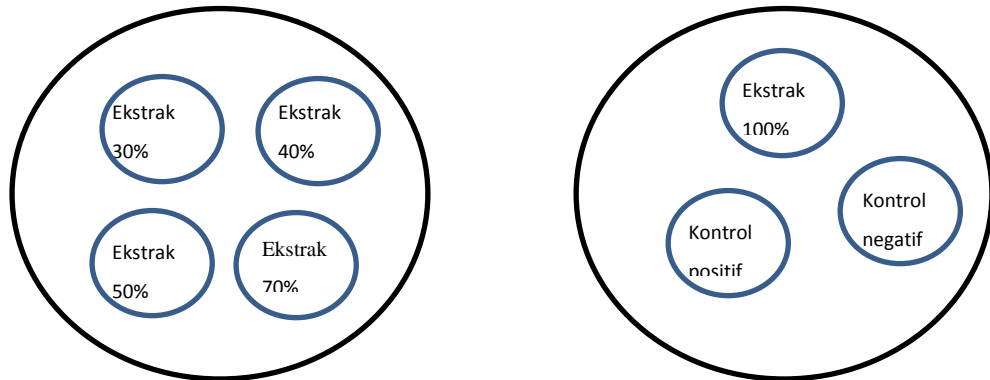
konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml. Volume yang terbentuk setelah pencampuran sebanyak 10 ml (Kartikasari *et al.* , 2008)

4. Uji Kepekaan Bakteri

a. Inokulasi suspensi bakteri pada nodula agar

Setelah mendapatkan standar konsentrasi bakteri ,bakteri diambil dari suspensi dengan menggunakan kapas lidi steril dan dioleskan pada permukaan media TSA secara merata.setelah itu dibuat lubang sumuran sebanyak 4 lubang dan 3 lubang untuk 2 cawan petri, dengan diameter 6 mm. Lima lubang diisi konsentrasi ekstrak daun teh hijau, satu lubang sebagai tempat kontrol negatif (aquades steril), dan satu lubang sebagai tempat kontrol positif (metronidazol). Pemindahan bakteri dari satu tempat ke tempat lain dilakukan dekat dengan lampu lain (Kartikasari *et al.* , 2008)

Kelompok perlakuan yang berjumlah tujuh kelompok dibagi menjadi dua cawan petri, cawan petri pertama dibuat 4 lubang sumuran dan cawan petri kedua dibuat 3 lubang sumuran. Setiap cawan petri diulang sebanyak lima kali sehingga sehingga dibutuhkan 10 cawan petri. Pembagian lubang sumuran ekstrak dan kontrol dalam cawan petri seperti pada gambar di bawah ini :



Gambar 2. Sumuran cawan petri

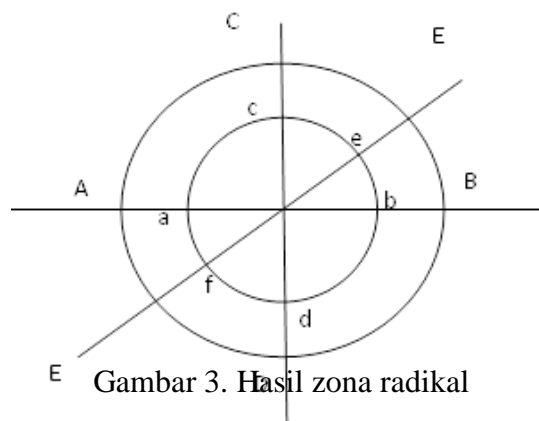
b. Cara aplikasi bahan penelitian

Ekstrak daun teh hijau (*Camellia Sinensis*) yang telah dibuat dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 70 % dan 100% diteteskan ke masing-masing lubang sumuran pada cawan petri tempat media tumbuh bakteri sebanyak 50 μ l, satu lubang ditetesi 50 μ l aquades steril sebagai kontrol negatif, dan satu lubang diisi antibiotik metronidazol sebagai kontrol positif. Langkah ini diulangi pada cawan petri lainnya, jika semua cawan petri media pertumbuhan bakteri sudah ditetesi dengan masing-masing konsentrasi, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C (Kartikasari *et al.*, 2008)

c. Pengukuran zona radikal

Zona radikal diukur dengan menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm. Tiap sumuran dalam cawan petri dilakukan pengulangan pengukuran sebanyak 3 kali dan hasilnya

merupakan angka rata-rata dari pegulangan tersebut. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan data yang *reliabel*, namun demikian tidak ada ketentuan pengukuran sebanyak 3 kali setiap sumuran. Cara pengukuran zona radikal yaitu dengan mengambil 3 garis yang melalui titik pusat lubang sumuran. Pada pengukuran pertama menggunakan diameter daerah daerah hambat (A-B) dikurangi diameter lubang sumuran (a-b) kemudian hasilnya dibagi 2. Pengukuran kedua menggunakan diameter daerah hambat (C-D) dikurangi diameter lubang sumuran (c-d) hasilnya dibagi 2. Data pengukuran pertama, kedua, dan ketiga diambil rata-ratanya, maka akan diperoleh data zona radikal (Kartikasari *et al.*.,2008).



Gambar 3. Hasil zona radikal

Keterangan gambar 3 :

A, B, C, D, E, dan F adalah titik terluar zona radikal

A, b, c, d, e, dan f adalah titik dalam zona radikal

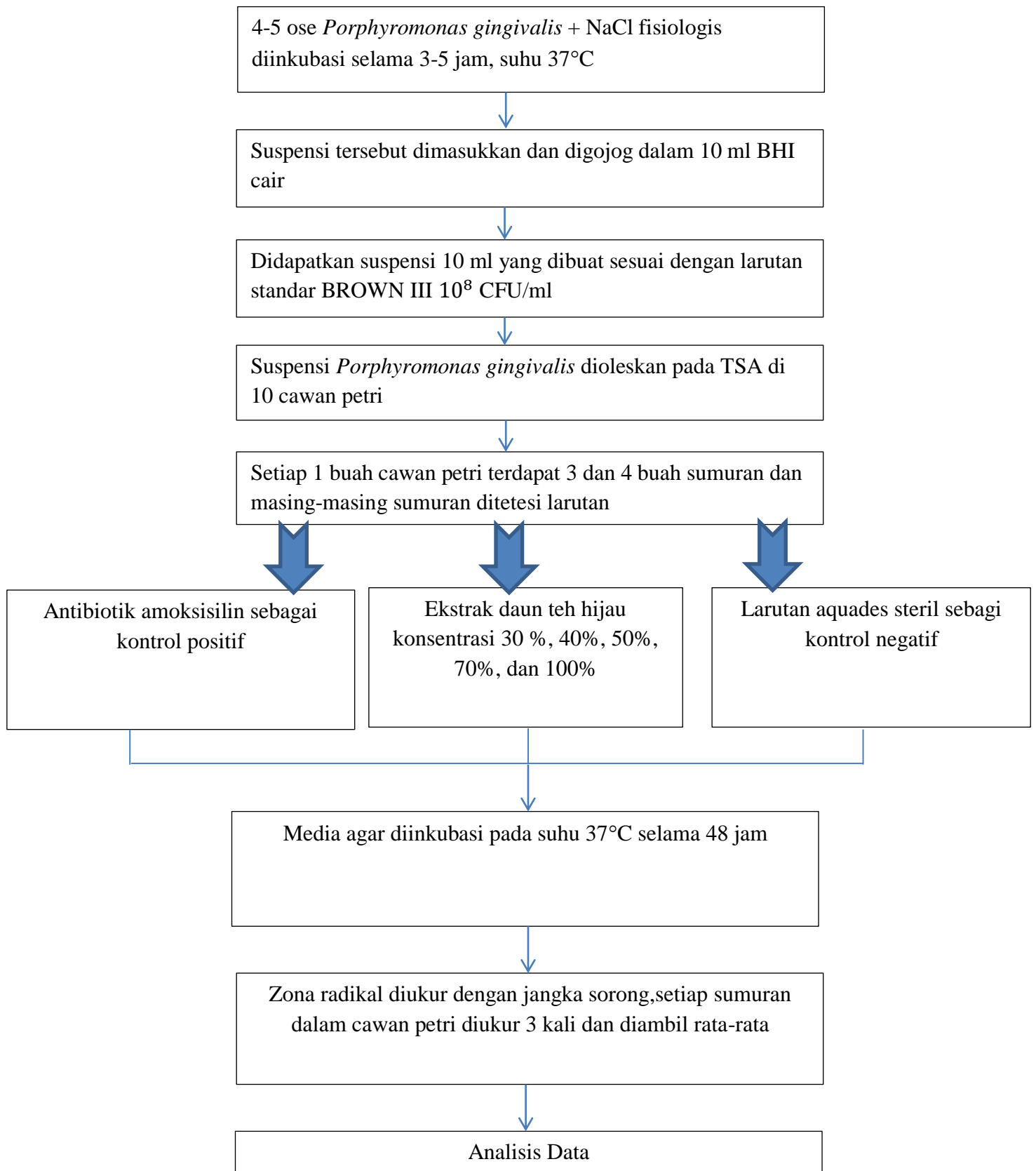
$$\text{Pengukuran pertama} = \frac{(AB-ab)}{2} \quad (1)$$

$$\text{Pengukuran kedua} = \frac{(CD-cd)}{2} \quad (2)$$

$$\text{Pengukuran ketiga} = \frac{(EF-ef)}{2} \quad (3)$$

$$\text{Zona Radikal} = \frac{\text{pengukuran (1)+(2)+(3)}}{3}$$

H. ALUR PENELITIAN



I. ANALISIS DATA

Metode analisis statistik yang di gunakan adalah :

1. Uji normalitas data dan uji variansi data.

Data yang di peroleh dari hasil penelitian ini dilakukan dengan uji normalitas metode *Shapiro-Wilk*. Alasan memakai metode ini karena sampel berjumlah <50. Uji normalitas di gunakan untuk mengetahui apakah sampel yang diambil berdasarkan dari populasi yang terdistribusi secara normal. Kemudian di lakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah sampel yang digunakan mempunyai varians yang sama.

2. Setelah uji normalitas dan uji homogenitas terpenuhi maka untuk mengetahui ada atau tidaknya efek ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* maka digunakan uji statistik *One Way ANOVA*.
3. Uji lanjutan dari *One Way ANOVA* adalah uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan efektifitas ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 70%, dan 100%, kontrol negatif, dan kontrol positif terhadap pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*.