

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental laboratoris murni secara *in vitro*.

B. Sampel Penelitian

1. Bahan uji yang digunakan adalah serbuk atau simplisia buah asam jawa. Simplisia tersebut diaplikasikan ke dalam pasta gigi sesuai dengan komposisi Volk dan Ash.
2. Bakteri Uji yang digunakan adalah bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang didapatkan dari Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Yogyakarta

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi
 - a) Pembuatan serbuk buah Asam jawa dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM).
 - b) Uji mikrobiologis antibakteri dilakukan di laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY).
2. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Juni sampai dengan Oktober 2014.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh: Pasta gigi buah asam jawa (*Tamarindus indica L.*)
2. Variabel Terpengaruh: Pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*
3. Variabel Terkendali:
 - a. Suhu dan waktu pengeraman *Porphyromonas gingivalis*.
 - b. Media pengeraman dan pembuatan *Porphyromonas gingivalis*.
 - c. Cara penghitungan zona radikal terhadap *Porphyromonas gingivalis*.
 - d. Sterilisasi alat dan bahan.
 - e. Suhu ruangan laboratorium
 - f. Sterilisasi ruangan
 - g. Penyebaran suspensi bakteri pada cawan petri

E. Definisi Operasional

1. Buah Asam Jawa (*Tamarindus indica L.*)

Buah asam jawa (*Tamarindus indica L.*) ini diperoleh dari Kabupaten Kendal, Jawa Tengah. Buah ini dibuat menjadi serbuk atau simplisia dengan cara dikeringkan dan dibuat tepung dengan menggunakan alat penepung (*hammer mills*).
2. Pasta gigi buah asam jawa (*Tamarindus indica L.*) adalah pasta gigi sederhana yang dibuat sesuai dengan komposisi Volk & Ash yang di dalamnya ditambahkan serbuk buah asam jawa (*Tamarindus indica L.*)
3. Pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang membentuk koloni-koloni setelah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

4. Daya antibakteri adalah kemampuan suatu bahan untuk membunuh dan menghambat pertumbuhan dan metabolisme bakteri. Hal ini ditandai dengan adanya zona hambat atau zona iradikal yang tampak bening kekeruhan di sekitar lubang sumuran yang menunjukkan terhambatnya pertumbuhan bakteri dan terdapat zona bunuh atau zona radikal yang tampak bening di sekitar lubang sumuran yang menunjukkan tidak adanya bakteri.
5. *Porphyromonas gingivalis* memiliki aktivitas proteolitik yang kuat (degradasi protein) dan merupakan patogen jaringan periodontal yang agresif. *Porphyromonas gingivalis* dibiakkan dalam agar *Tryptone Soya* (TSA).

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian

- a. Mortir dan stamper untuk mencampur bahan-bahan pasta gigi buah asam jawa
- b. Almari pengering untuk mengeringkan buah asam jawa
- c. Neraca untuk menimbang buah asam jawa setelah dikeringkan dan menimbang bahan-bahan pasta gigi buah asam jawa
- d. Alat penepung atau *hammer mills* untuk membuat buah asam jawa ke dalam bentuk serbuk
- e. Pipet untuk mengambil bakteri
- f. Tabung reaksi untuk tempat BHI cair
- g. Ose steril untuk menempatkan atau mengoleskan bakteri

- h. *Autoclave* untuk media sterilisasi *Tryptone Soya Agar* (TSA)
 - i. Cawan petri untuk tempat penuangan *Tryptone Soya Agar* (TSA)
 - j. Inkubator untuk menginkubasi *Tryptone Soya Agar* yang telah diolesi bakteri dan dilubangi untuk dibuat sumuran yang berisi pasta gigi buah asam jawa
 - k. Jangka sorong dengan ketelitian 0,01 mm untuk mengukur zona radikal di *Tryptone Soya Agar* (TSA)
 - l. Tabung Erlenmeyer untuk tempat meletakkan BHI
 - m. Lampu spritus untuk memanaskan ose
 - n. Toples untuk wadah serbuk
2. Bahan penelitian
- a. Serbuk buah asam jawa (*Tamarindus indica* L.)
 - b. Bahan pasta gigi
 - 1) Gum arab 4,5% sebagai zat pengikat
 - 2) Sakarin 0,1% untuk pemanis
 - 3) Gliserin 30% untuk menjaga kelembaban pasta
 - 4) *Peppermint oil* 0,1% untuk aroma pasta gigi
 - 5) CaCO_3 44% untuk bahan *abrasive*
 - 6) MgCO_3 2% untuk penetral bahan *abrasive*
 - 7) Akuades
 - c. Pasta gigi *Antiplaque* sebagai kontrol positif
 - d. Bakteri *Porphyromonas gingivalis*
 - e. Media *Tryptone Soya Agar* (TSA)

f. BHI cair

G. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan serbuk

Pembuatan serbuk dari buah asam jawa terdapat 3 tahap. Tahap pertama adalah penyiapan buah asam jawa yang meliputi penyortiran, pengupasan, dan penjemuran. Asam jawa yang sudah dikupas, dikeringkan menggunakan alat atau almari pengering *fresh dryer* pada suhu 30° C. Simplisia yang dihasilkan menggunakan alat penepung (*Hammer mills*) lalu diayak dengan saringan berukuran 60 mesh.

2. Pembuatan pasta gigi serbuk buah asam jawa

Pasta gigi buah asam jawa dibuat sesuai dengan komposisi Volk & Ash (1997). Haluskan Gum arab, kemudian tambahkan akuades yang telah dipanaskan (suhu 50 - 60°C) sedikit demi sedikit. Lalu tambahkan serbuk buah asam jawa. Tambahkan sakarin kemudian campur sampai merata. Selanjutnya tambahkan gliserin dan bahan pengisi pasta gigi (CaCO_3 dan MgCO_3) yang sudah dihaluskan sampai merata, lanjutkan penambahan *peppermint oil* kemudian aduk dan homogenkan sampai terbentuk pasta gigi. Dari pembuatan tersebut dihasilkan pasta gigi buah asam jawa.

3. Pembuatan media

Media *Tryptone Soya Agar* (TSA) dengan ketebalan kurang lebih 6 mm dibuat dengan cara menimbang stok kemudian dilarutkan dalam akuades sambil dipanaskan dan didistribusikan pada tabung dengan ketebalan yang sama. Kemudian disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu

121°C tekanan 1 atm selama 15 menit, selanjutnya dituang dalam cawan petri steril dengan diameter dan merk yang sama, kemudian dibiarkan dingin dan padat.

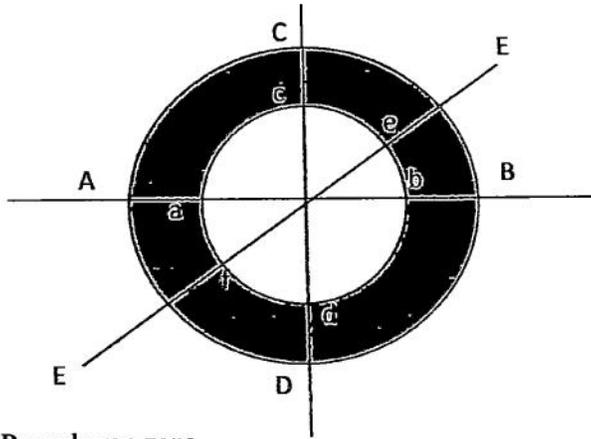
4. Pembuatan suspensi *Porphyromonas gingivalis*

Koloni kuman yang sudah dibiakkan ditanam dalam 0,5 ml BHI cair, lalu diinkubasikan 5-8 jam pada 37° C. Tambahkan akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar konsentrasi kuman 10⁸ CFU per ml (CFU= *Coloni Forming Unit*). Agar *Tryptone Soya* (TSA) dilubangi untuk membuat sumuran, setelah itu celupkan kapas lidi steril ke dalam suspensi kuman lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapasnya tidak terlalu basah, dan oleskan pada permukaan masing-masing media agar hingga rata. Sampel penelitian ada 5 cawan yang berisikan biakan bakteri *Porphyromonas gingivalis* dalam TSA dengan 2 dan 3 sumuran pada masing-masing cawan petri sehingga diperoleh jumlah sampel adalah 15 sumuran dengan 5 sumuran untuk setiap kontrol positif, kontrol negatif dan pasta gigi serbuk buah asam jawa. Selanjutnya letakkan bahan pasta gigi buah asam jawa, pasta gigi *antiplaque*, pasta gigi tanpa buah asam jawa ke dalam lubang sumuran pada cawan petri yang berbeda kemudian inkubasikan pada 37° C selama 19-24 jam.

5. Pengukuran zona radikal

Hasil dibaca setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan mengukur zona radikal yaitu daerah bening yang terbentuk di sekeliling lubang 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 dkk., 2008).



Gambar 2. Pengukuran zona

Keterangan gambar 2:

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

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

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

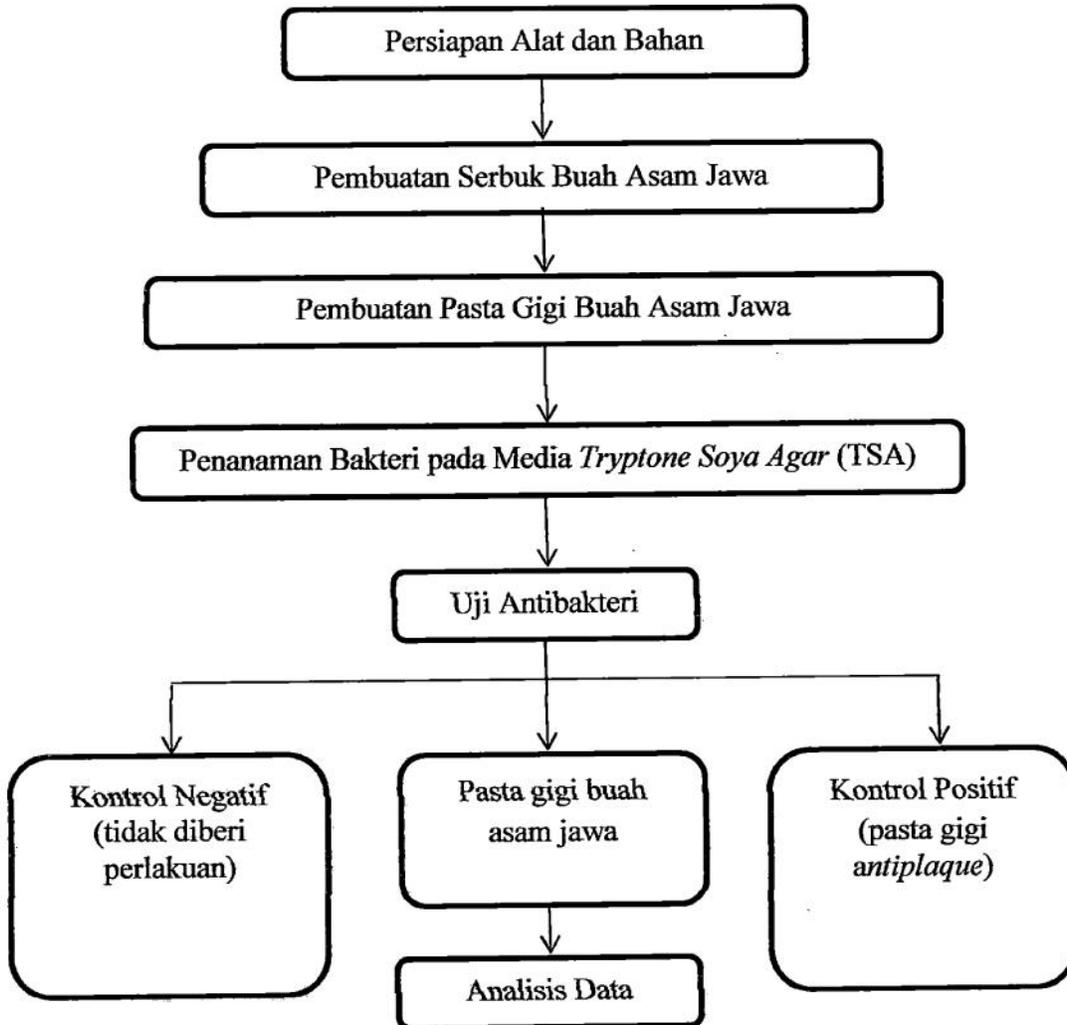
$$\text{Pengukuran kedua} = \frac{(CD-cd)}{2} \quad (2)$$

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

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

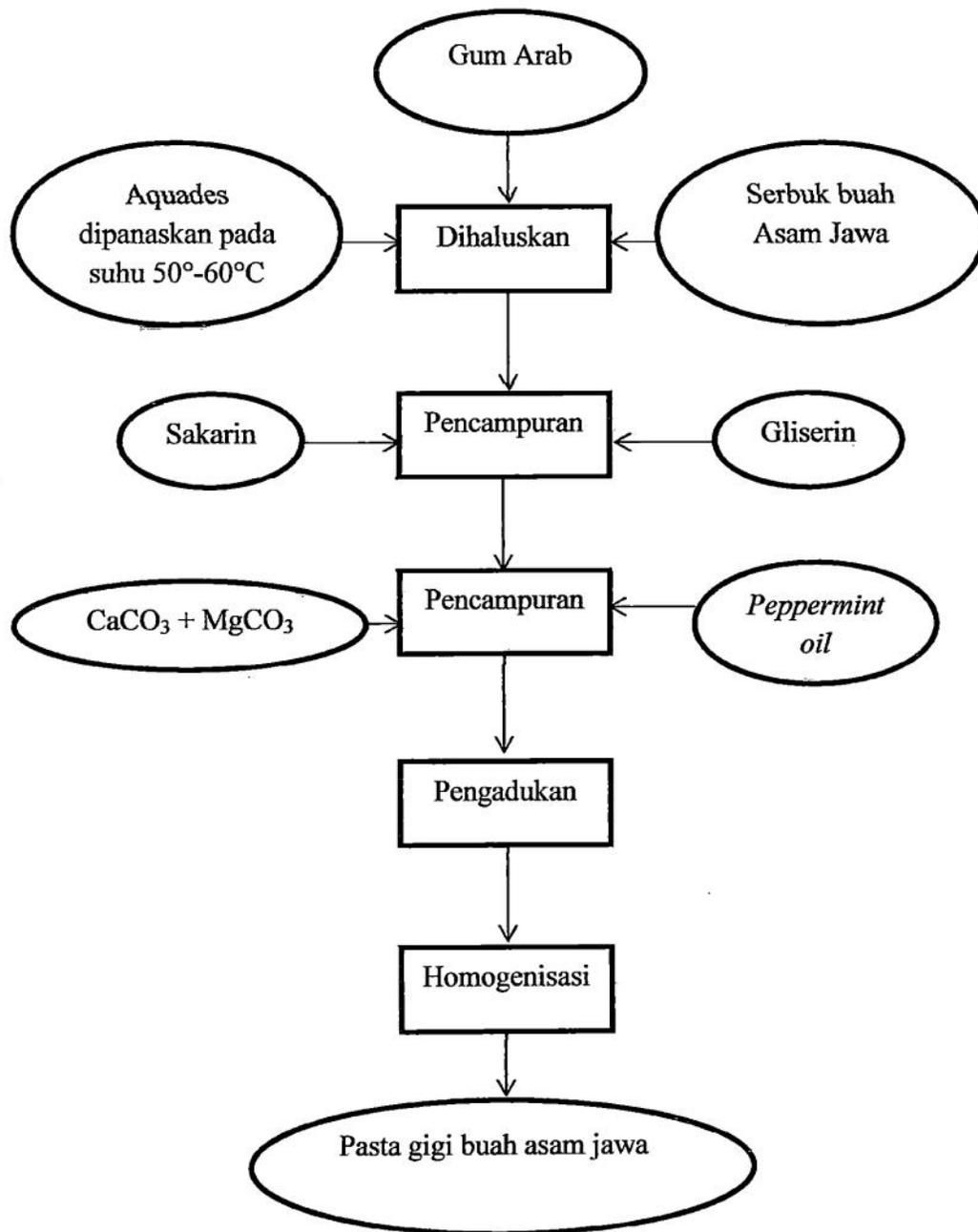
H. Alur Penelitian

1. Pengujian Daya Antibakteri



Gambar 3. Pengujian Daya Antibakteri

2. Pembuatan Pasta Gigi

**Gambar 4.** Pembuatan pasta gigi

I. Analisa Data

Untuk analisa data pada penelitian ini dilakukan uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk* karena sampel <50 . Uji ini digunakan untuk mengetahui apakah sampel yang diambil berdasar dari populasi terdistribusi secara normal, kemudian dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah sampel yang digunakan mempunyai varian yang sama. Data normal dan tidak homogen maka digunakan *Kruskal-Wallis*. Kemudian untuk mengetahui efektifitas daya antibakteri antara setiap kelompok uji digunakan uji analisis *Mann-Whitney*.