

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris *in vitro*.

B. Sampel Penelitian

1. Bahan yang digunakan simplisia buah asam jawa yang pembuatannya dilakukan di Laboratorium dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM).
2. Bakteri uji yaitu *Streptococcus mutans* yang didapat dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pembuatan serbuk buah Asam jawa dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Uji mikrobiologis antibakteri akan dilaksanakan di laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY).

Penelitian ini 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 *Streptococcus mutans*.
3. Variabel Terkendali:
 - a. Suhu dan waktu pengeraman *Streptococcus mutans*.
 - b. Media pengeraman dan pembuatan *Streptococcus mutans*.
 - c. Cara penghitungan zona radikal terhadap *Streptococcus mutans*.
 - 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 (simplisia) dengan cara dikeringkan dan dibuat tepung dengan menggunakan alat penepung.

2. Pasta Gigi

Pasta gigi adalah pasta gigi sederhana yang dibuat sesuai dengan komposisi Volk & Ash (1997), yang di dalamnya ditambahkan serbuk buah asam jawa (*Tamarindus indica L.*)

3. Pertumbuhan bakteri

Pertumbuhan bakteri adalah adanya pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang membentuk koloni-koloni setelah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

4. Daya antibakteri

Daya antibakteri adalah kemampuan suatu bahan untuk membunuh dan menghambat pertumbuhan dan metabolisme bakteri. Ini ditandai dengan adanya zona hambat atau zona iradikal yang tampak bening kekeruhan di sekitar cakram yang menunjukkan terhambatnya pertumbuhan bakteri dan terdapat zona bunuh atau zona iradikal yang tampak bening di sekitar cakram yang menunjukkan tidak adanya bakteri.

5. *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans termasuk kelompok *Streptococcus viridans* yang merupakan anggota floral normal rongga mulut yang memiliki sifat α -hemolitik dan memegang peranan penting dalam proses terjadinya karies. *Streptococcus mutans* dibiakkan dalam agar *Mueller-Hinton* yang didapat dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY).

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian

- a. Almari pengering untuk mengeringkan buah asam jawa
- b. Neraca untuk menimbang buah asam jawa setelah dikeringkan

- c. Alat penepung atau *Hammer mills* untuk membuat buah asam jawa ke dalam bentuk serbuk
- d. Pipet untuk mengambil bakteri
- e. Tabung reaksi untuk tempat BHI cair
- f. Ose steril untuk menempatkan atau mengoleskan bakteri
- g. *Autoclave* untuk media sterilisasi *Tryptone Soya Agar (TSA)*
- h. Cawan petri untuk tempat penuangan *Tryptone Soya Agar (TSA)*
- i. Inkubator untuk menginkubasi *Tryptone Soya Agar (TSA)* yang telah diolesi bakteri dan diletakkan disk atau cakram yang mengandung pasta gigi buah asam jawa
- j. Jangka sorong digital untuk mengukur zona radikal di *Tryptone Soya Agar (TSA)*
- k. Lampu spritus untuk memanaskan ose
- l. Toples untuk wadah serbuk
- m. Mortir dan Stemper untuk mencampur bahan-bahan pasta gigi

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 19,4%
- c. Pasta gigi *Antiplaque* sebagai kontrol positif
- d. Bakteri *Streptococcus mutans*
 - n. Media *Tryptone Soya Agar (TSA)*
 - e. BHI cair

G. Jalannya Penelitian

- a. Cara pembuatan serbuk

Tahap-tahap untuk memperoleh serbuk dari buah asam jawa. Tahap pertama adalah penyiapan buah asam jawa yang meliputi penyortiran, pengupasan, dan penjemuran. Asam jawa yang sudah dikupas, dikeringkan menggunakan alat pengering *fresh dryer* pada suhu 30°C . Simplisia yang dihasilkan menggunakan alat penepung (*hammer mills*) lalu diayak dengan saringan berukuran 60 mesh (Sembiring, 2009).

- b. Cara Pembuatan Pasta Gigi

Pasta gigi buah asam jawa dibuat sesuai dengan komposisi Volk & Ash (1997). Haluskan Gum arab, kemudian tambahkan akuades yang telah dipanaskan (suhu $50 - 60^\circ \text{C}$) 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. Pembuatan pasta gigi sesuai

metode Volk dan Ash masih mempunyai tekstur kurang berbentuk pasta (masih terlalu encer), maka untuk mendapatkan pasta gigi yang bertekstur pasta dilakukan *trial and error* komposisi gum arab di dalam pembuatan pasta gigi buah asam jawa.

c. Pembuatan media

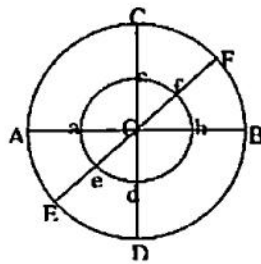
Media *Tryptone Soya Agar* (TSA) dengan ketebalan kurang lebih 6mm dibuat dengan cara menimbang stok kemudian dilarutkan dalam akuades sambil dipanaskan dan didistribusikan pada tabung dengan ketebalan yang sama. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit, selanjutnya dituang dalam cawan petri steril dengan diameter dan merk yang sama, kemudian dibiarkan dingin dan padat.

d. Pembuatan suspensi *Streptococcus mutans*

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. 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.

Hasil dibaca setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan mengukur zona radikal yaitu daerah bening yang terbentuk di sekeliling sumuran. Zona radikal diukur menggunakan jangka sorong dengan tingkat ketelitian 0,01 mm. Cara pengukuran yaitu dengan membuat dua garis tegak lurus melalui titik pusat sumuran, sedangkan garis ketiga dibuat diantara kedua garis tegak lurus dengan membentuk sudut 45°. Pengukuran dilakukan tiga kali pada tempat yang berbeda.



Gambar 1. Cara pengukuran zona radikal

Keterangan :

Titik O : Titik pusat sumuran

Garis A-B, C-D, E-F : Zona radikal yang terbentuk

Garis a-b, c-d, e-f : Diameter sumuran

Pengukuran I : $(AB-ab)/2$

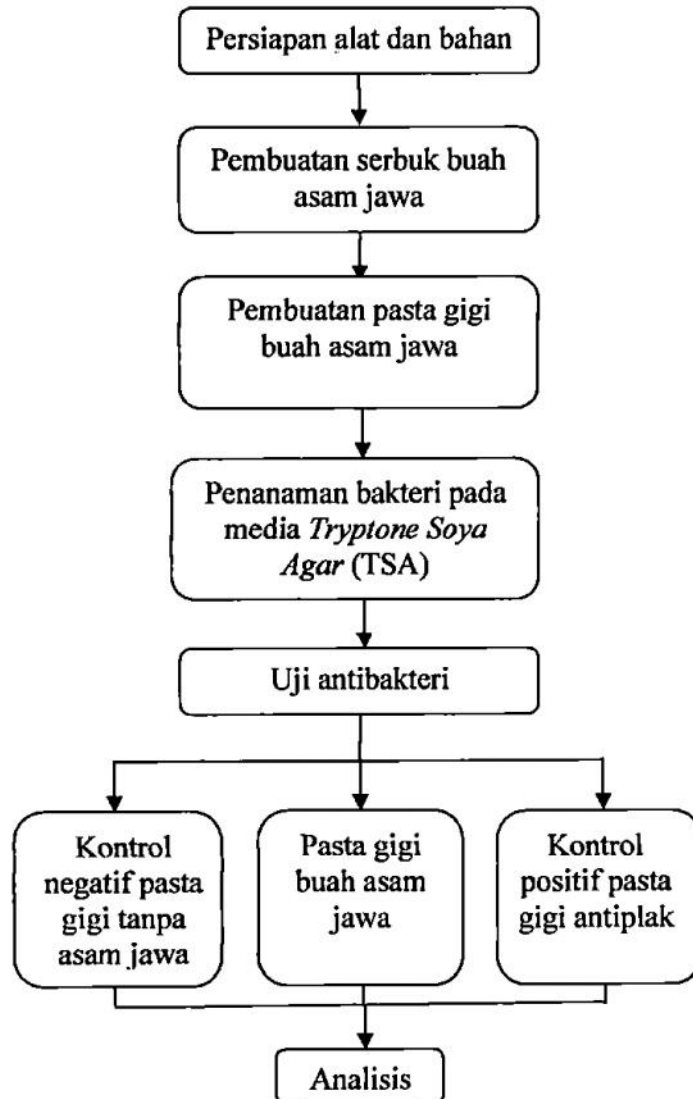
Pengukuran II : $(CD-cd)/2$

Pengukuran III : $(EF-ef)/2$

Zona radikal = $(\text{Pengukuran I} + \text{II} + \text{III})/3$

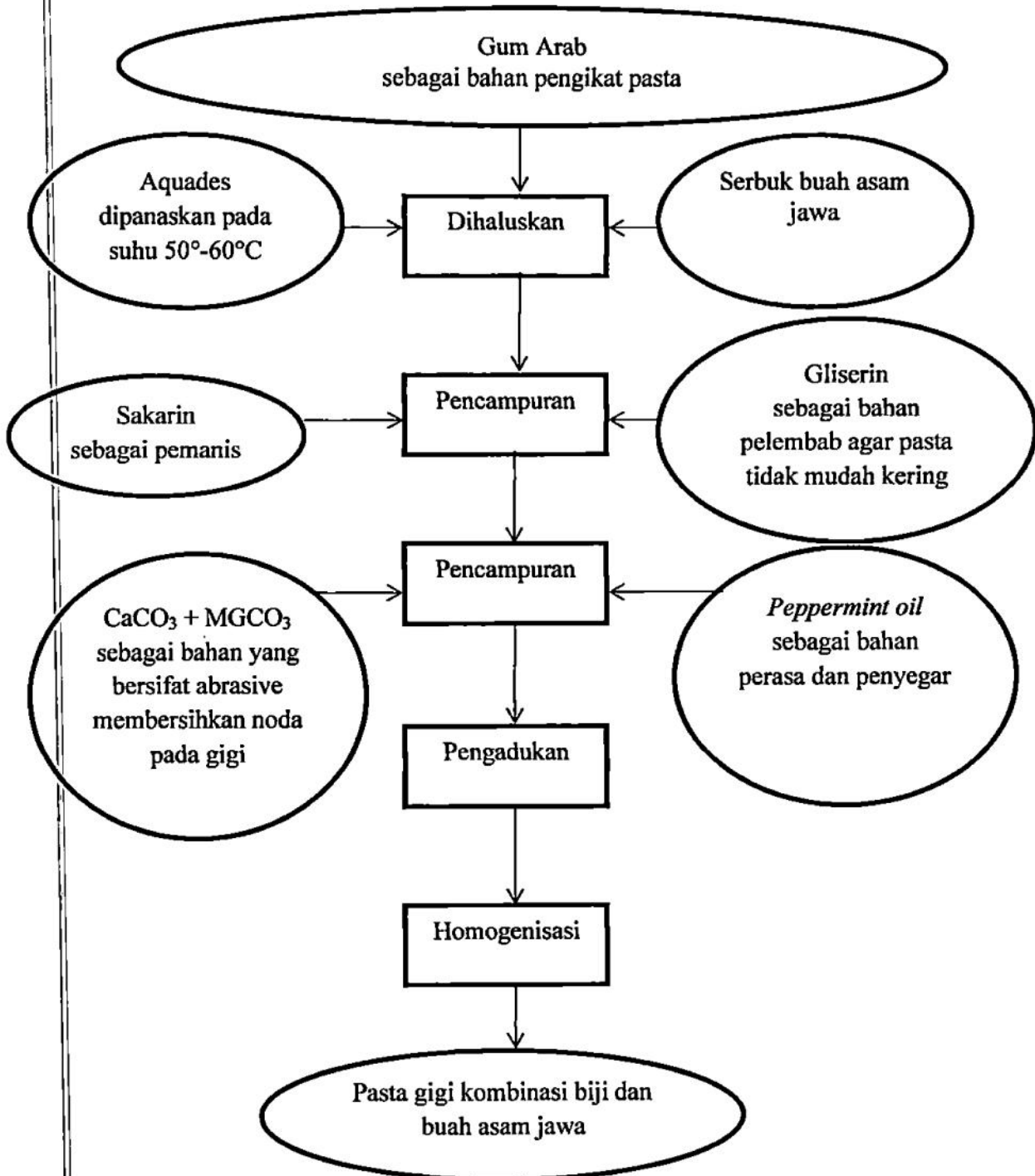
H. Alur Penelitian

1. Alur Penelitian



Gambar 2. Alur Penelitian

2. Pembuatan Pasta Gigi



Gambar 3. Pembuatan Pasta Gigi

I. Analisa Data

Analisa data menggunakan uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk* karena sampel berjumlah <50 . Uji ini digunakan untuk mengetahui sampel yang diambil berdasar dari populasi terdistribusi secara normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui sampel yang digunakan mempunyai varian yang sama. Bila data normal dan homogen maka digunakan uji statistic *One Way ANOVA*, bila data tidak normal dan tidak homogen maka digunakan *Kruskal-Wallis*, kemudian untuk mengetahui efektifitas daya antibakteri antara setiap kelompok uji digunakan uji analisis LSD (*Least Significant Different*).