

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris murni secara in-vitro.

B. Sampel Penelitian

1. Bahan Uji

Daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang diperoleh dari desa Tritis, Kecamatan Samigaluh, Kabupaten Kulonprogo, Yogyakarta dan ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dibuat di Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

2. Bakteri Uji

Bakteri *Streptococcus viridans* yang digunakan sebagai subyek penelitian diperoleh di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta

3. Besar sampel

Jumlah ulangan dari tiap kelompok perlakuan akan dihitung 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 clindamycin).

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

t = jumlah kelompok tiap perlakuan

n = jumlah ulangan tiap perlakuan

diketahui : t = 7

ditanya : n = ?

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

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

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

$$n \geq 3,5$$

$$n = 4$$

Berdasar 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.

C. Kriteria Inklusi

Kriteria Inklusi sampel

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

D. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Januari sampai Mei 2015

E. Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh

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

2. Variabel terpengaruh

Pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan diameter zona radikal dalam cawan petri yang telah diinokulasikan dengan bakteri pada media TSA (*Tryptone Soya Agar*) setelah pemberian ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 10%, 30%, 40%, 50%, 70%, 100%.

3. Variabel terkontrol

a. Suhu inkubator 37 C

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

c. Etanol 70% sebagai penyari

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

e. Lama Pengeraman 48 jam

f. Konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml (LARUTAN BROWN III)

4. Variabel tidak terkontrol

- a. Penyebaran suspensi bakteri dalam cawan petri
- b. Kontaminasi Bakteri lain

F. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol 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. *Streptococcus viridans* merupakan anggota flora normal pada membran mukosa di tubuh, termasuk kavitas mulut dan nasofaring. Bakteri ini masuk ke aliran darah sebagai hasil dari lesi mulut dan manipulasi dental yang sering menjadi penyebab dari infeksi endokarditis (Willet, 1991).
3. Daya antibakteri adalah kemampuan ekstrak etanol daun teh hijau membunuh dan menghambat pertumbuhan dan metabolisme bakteri *Streptococcus viridans*

G. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian
 - a. Ose untuk meratakan suspensi bakteri dalam larutan tes pembandingan 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. Kapas steril
 - h. Tabung dan raknya
 - i. Mikropipet untuk mengambil larutan
 - j. Sarung tangan dan masker steril
2. Bahan Penelitian
- a. Ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 70% dan 100%
 - b. Aquades steril
 - c. Bakteri *Streptococcus viridans*
 - d. Media cair BHI (*Brain Heart Infusion*)
 - e. *Tryptone Soya Agar (TSA)* untuk pertumbuhan koloni bakteri
 - f. Larutan NaCl fisiologis
 - g. Antibiotik Clindamycin

H. Jalannya Penelitian

1. Persiapan

Menyiapkan alat dan bahan serta sterilisasi alat

2. Pembuatan ekstrak etanol daun Teh Hijau (*Camellia Sinensis*)

Daun teh hijau (*Camellia 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 selam 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 etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 100 %. Ekstrak etanol daun teh hijau murni diencerkan dengan menggunakan aquades steril sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan, yaitu 30%, 40%, 50%, 70% dan 100%. Pengenceran ekstrak etanol daun teh hijau konsentrasi 30%, 40%, 50%, 70% dan 100% diperoleh dengan cara pengenceran menggunakan aquades steril dengan perhitungan sebagai berikut.

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

Keterangan:

N_1 : konsentrasi awal ekstrak etanol daun teh hijau (%)

V_1 : volume awal ekstrak etanol daun teh hijau

N_2 : konsentrasi akhir ekstrak etanol daun teh hijau (%)

V_2 : volume akhir ekstrak daun teh hijau

(Kartikasari *et al.* , 2008)

3. Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus viridans*

Pembuatan suspensi bakteri dibuat sesuai dengan standar Brown III yaitu menggunakan ose steril diambil 4-5 ose bakteri dan dilarutkan dalam

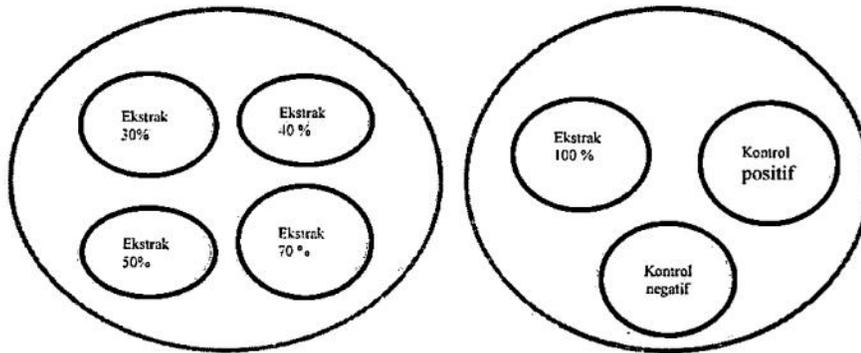
larutan NaCl fisiologis. Suspensi tersebut diinkubasikan dalam inkubator selama 5 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri *Streptococcus viridans* tersebut dilarutkan kembali dalam media agar BHI (*Brain Heart Infusion*) cair sehingga sesuai dengan konsentrasi bakteri 10⁸ CFU/ml. Volume yang terbentuk setelah 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 dengan konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau, satu lubang sebagai tempat kontrol negatif (aquades steril), dan satu lubang sebagai tempat kontrol positif (clindamycin). 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 dibutuhkan 10 cawan petri. Pembagian lubang sumuran ekstrak dan kontrol dalam cawan petri seperti pada gambar di bawah ini



Gambar 5. Sumuran cawan petri

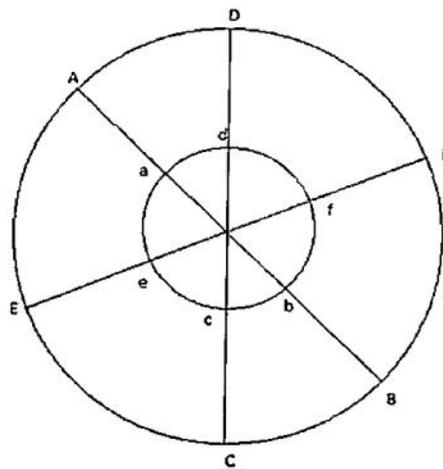
b. Cara aplikasi bahan penelitian

Ekstrak etanol 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 clindamycin 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

Pengukuran zona radikal yaitu dengan mengambil tiga garis yang melalui titik pusat lubang sumuran. Pada pengukuran satu menggunakan diameter daerah bening (A-B) dikurangi diameter sumuran (a-b) dibagi dua. Pengukuran kedua menggunakan diameter daerah bening (C-D) dikurangi diameter sumuran (c-d) dibagi dua.

Pengukuran ketiga menggunakan diameter daerah bening (E-F) dikurangi diameter sumuran (e-f) dibagi dua. Hasil akhir dari pengukuran zona radikal adalah pengukuran pertama ditambah dengan pengukuran kedua ditambah pengukuran ketiga kemudian hasilnya dibagi tiga (kartikasari *et al*, 2008).



Gambar 6. Cara Pengukuran zona radikal

Pengukuran zona radikal (1) = $(AB-ab) : 2$

Pengukuran zona radikal (2) = $(CD-cd) : 2$

Pengukuran zona radikal (3) = $(EF-ef) : 2$

Pengukuran zona radikal satu lubang sumuran :

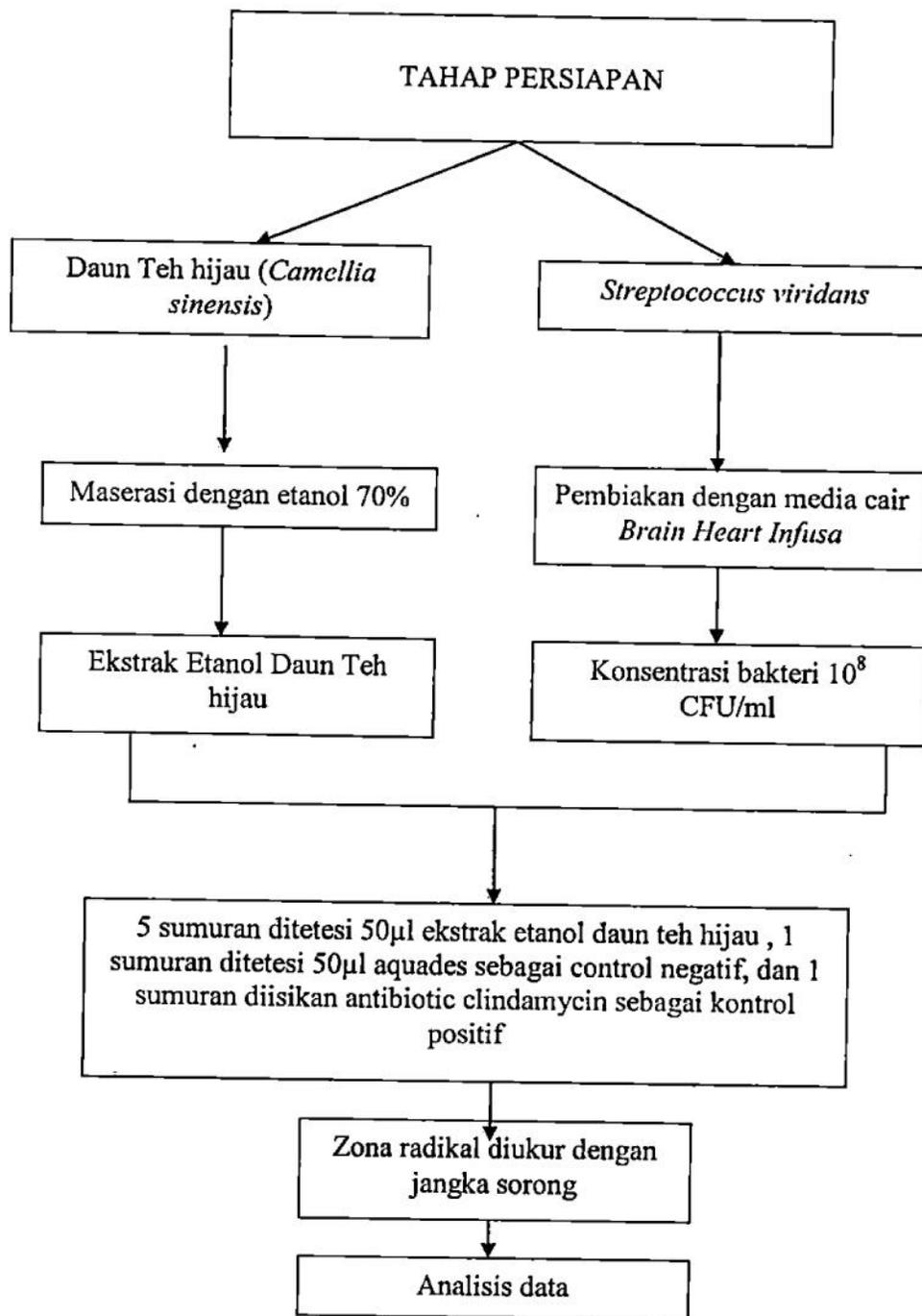
$$\frac{\text{Pengukuran 1} + 2 + 3}{3}$$

3

Keterangan :

Aa, Bb, Cc, Dd, Ee, Ff : Zona radikal

ab, cd, ef : Diameter lubang sumuran

I. Alur Penelitian

Gambar 7. Alur penelitian

J. Analisis Data

Metode analisis statistik yang digunakan adalah

1. Uji normalitas data dan uji variansi data

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

2. Setelah uji normalitas dan uji homogenitas terpenuhi maka untuk mengetahui ada atau tidaknya efek ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus viridans* maka digunakan uji statistik *One Way ANOVA*.

3. Uji lanjutan dari *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan efektifitas ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 70% dan 100%, kontrol negatif, dan kontrol positif terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus viridans*.

4. Jika pada uji normalitas data dan uji variansi data didapatkan hasil sebaran data yang tidak normal dan data yang tidak homogen, maka uji yang digunakan adalah turunan dari uji *One Way ANOVA* yaitu uji *Kruskal Wal*