

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 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

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 Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada.

2. Bakteri Uji

Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang digunakan sebagai subyek penelitian diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

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 (10%, 30%, 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 perlakuan

n = jumlah ulangan tiap perlakuan

Diketahui : t = 7

Ditanya : n = ?

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

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

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

$$6n \geq 15+6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq \frac{21}{6}$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \approx 4$$

berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan minimal tiap kelompok perlakuan adalah 4 kali pengulangan kemudian dari

pengulangan tiap kelompok perlakuan yang diperlukan adalah 5 kali pengulangan (Tanjong, 2011).

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.

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 dan satu daerah perkebunan.

C. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

1. Tempat Penelitian

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

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2012- Januari 2013

D. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel pengaruh

Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70% dan 100%.

2. Variabel terpengaruh

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

3. Variabel terkendali

a. Suhu inkubator 37°C.

b. Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 10%, 30%, 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 10^8 CFU/ml (CARITAN BROWN III)

E. DEFINISI OPERASIONAL

1. Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) adalah sediaan kental yang diperoleh dengan cara mengekstraksi daun teh hijau (*Camellia sinensis*) menggunakan teknik maserasi dengan penyari etanol 70% (Amelia, 2012).
2. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah bakteri gram negatif berbentuk kokobasil yang dapat tumbuh soliter atau berkoloni dan bersifat fakultatif anaerob. Bakteri tersebut diperoleh hasil biakan yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
3. Daya antibakteri adalah kemampuan suatu bahan membunuh dan menghambat pertumbuhan dan metabolisme bakteri.
4. Pertumbuhan adalah peningkatan jumlah semua komponen dari suatu organisme secara teratur.
5. Metode difusi adalah suatu cara uji kepekaan bakteri yang menggunakan pembedihan padat yang diusapi dengan biakan bakteri kemudian dibuat lubang sumuran dan ditetesi dengan bahan antibakteri.
6. Zona radikal adalah daerah sekitar lubang sumuran dimana sama sekali tidak ditemukan pertumbuhan bakteri.

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 (merk MEMMERT)
- 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 daun teh hijau konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70% dan 100%
- b. Aquades steril
- c. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- d. Media cair BHI (*Brain Heart Infusion*)
- e. *Tryptone Soya Agar (TSA)* untuk pertumbuhan koloni bakteri

G. CARA KERJA

1. Persiapan

Menyiapkan alat dan bahan serta sterilisasi alat.

2. Pembuatan Ekstrak 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 1 mm sampai selesai dan ditimbang dengan neraca timbang sehingga didapatkan berat keringnya. Selanjutnya dilakukan proses ekstraksi yaitu serbuk dimasukkan 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 evaporator* 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 menggunakan aquades steril sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan, yaitu 10%, 30%, 50%, 70% dan 100%. Pengenceran ekstrak daun teh hijau konsentrasi 10% 30% 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:

N1 : konsentrasi awal ekstrak daun teh hijau (%)

V1 : volume awal ekstrak daun teh hijau

N2 : konsentrasi akhir ekstrak daun teh hijau (%)

V2 : Volume akhir ekstrak daun teh hijau

(Kartikasari *et al.*, 2008).

3. Pembuatan Suspensi Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

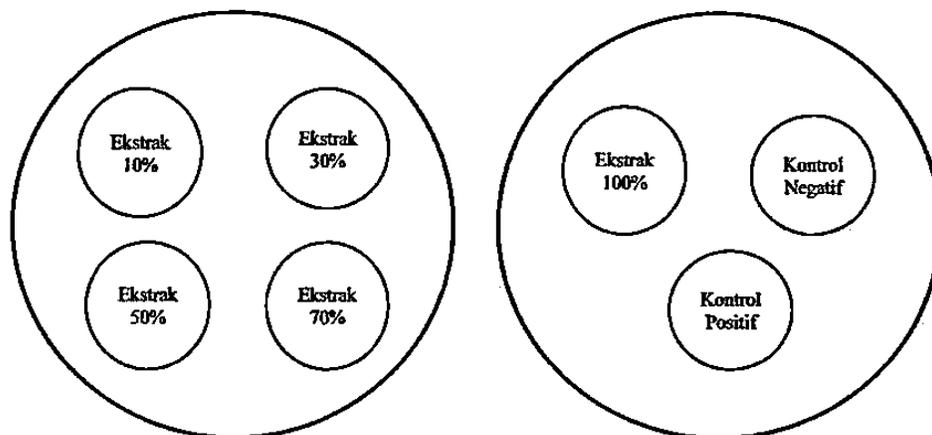
Pembuatan suspensi bakteri dibuat sesuai dengan standar Brown III yaitu menggunakan ose steril diambil 4-5 ose bakteri dan dilarutkan dalam larutan NaCl fisiologis. Suspensi tersebut diinkubasikan dalam inkubator selama 5 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tersebut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

Setelah mendapatkan standar konsentrasi bakteri, bakteri diambil dari supensi 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 (antibiotik amoksisilin). Pindahkan bakteri dari satu tempat ke tempat yang lain dilakukan dekat dengan lampu spiritus agar meminimalkan media bakteri terkontaminasi bakteri 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 4. Sumuran cawan petri

b. Cara aplikasi bahan penelitian

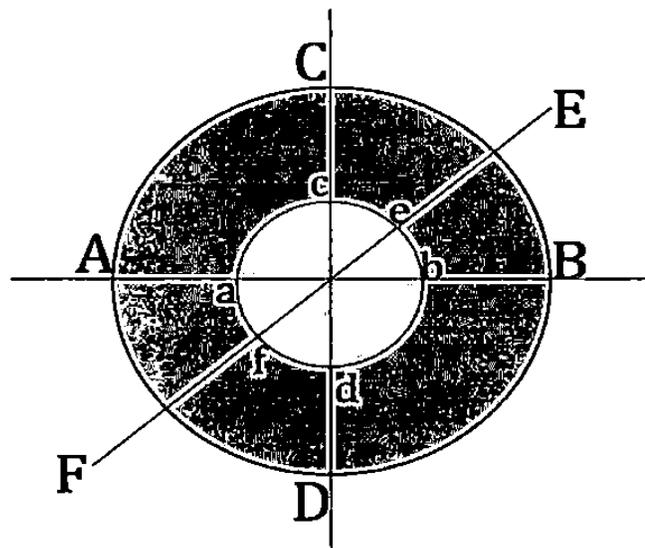
Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang telah dibuat dengan konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70% dan 100% diteteskan ke masing-masing lubang sumuran pada cawan petri tempat media tumbuh bakteri sebanyak 50 μ l, satu lubang ditetesi 50 μ l aquades steril sebagai kontrol negatif, dan satu lubang diisikan antibiotik amoksisilin 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).

b. 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 pengulangan 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 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. Pengukuran ketiga menggunakan diameter daerah hambat (E-F) dikurangi diameter lubang sumuran (e-f) hasilnya dibagi 2. Data pengukuran pertama, kedua, dan ketiga diambil rata-ratanya, maka akan diperoleh data zona radikal (Kartikasari, *et al.*, 2008).



Gambar 5. Pengukuran Zona Radikal

Keterangan gambar 5 :

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

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

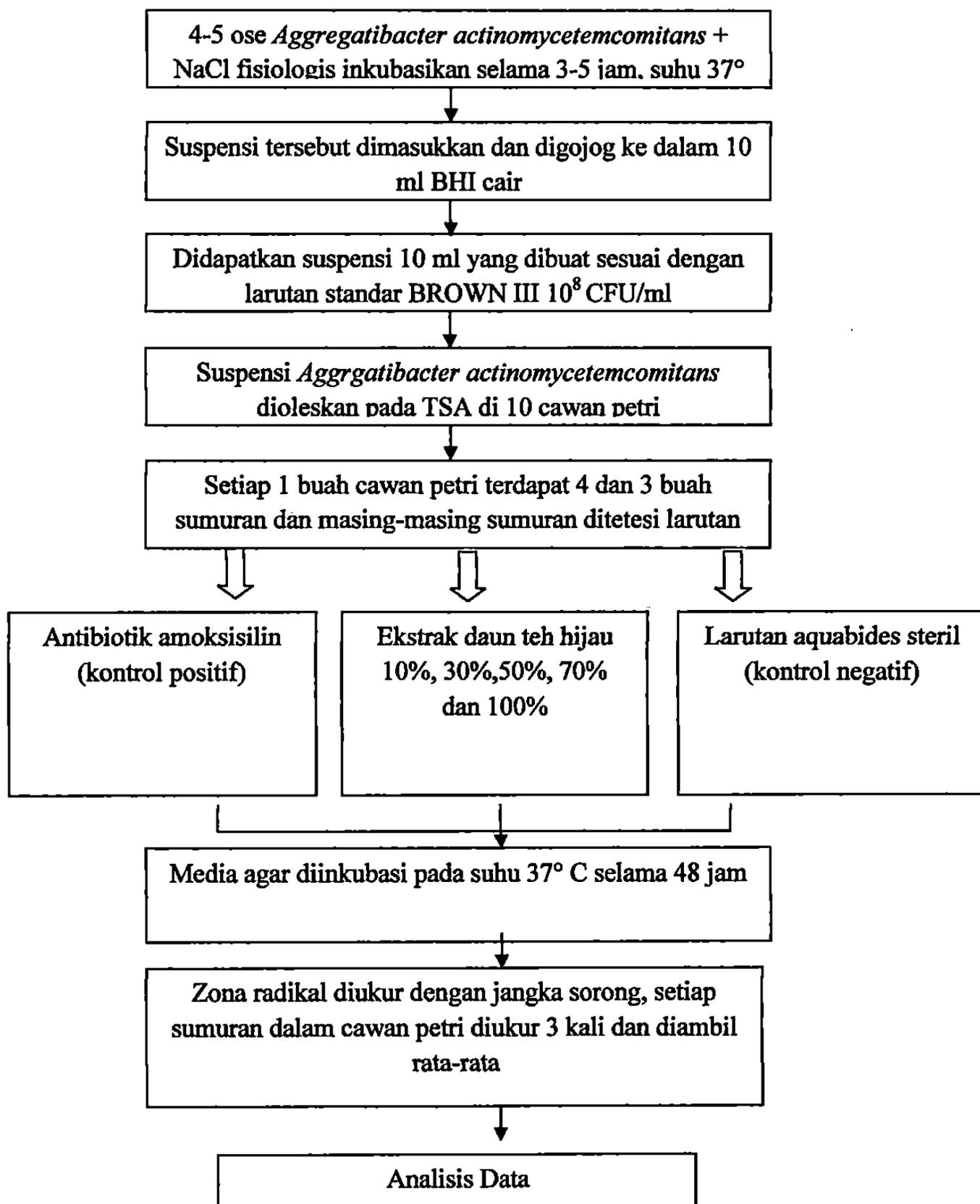
$$\text{Pengukuran pertama} = \frac{(AB-ab)}{2} \quad (1)$$

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

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

— pengukuran (1)+(2)+(3)

H. ALUR PENELITIAN



Gambar 6. Alur Penelitian

I. 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 berdasar dari populasi yang terdistribusi secara normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah sampel yang digunakan mempunyai varians yang sama.

2. Setelah uji normalitas dan uji homogenitas terpenuhi maka untuk mengetahui ada tidaknya efek ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* maka digunakan uji statistic *One Way Anova*
3. Uji lanjutan dari *one way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan efektifitas ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70%, 100%, kontrol negatif, dan kontrol positif terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* digunakan uji analisis *Least Significant Different*.
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