

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium.

4.2 Waktu Penelitian

Oktober - November 2008.

4.3 Lokasi Penelitian

- Laboratorium Biologi Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia
- Pusat Penelitian dan Pengembangan Kimia Terapan, PUSPIPTEK, Serpong Tangerang
- Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

4.4 Bahan yang Diuji

Lidah Buaya.

4.5 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan adalah bakteri *Porphyromonas gingivalis strain* standar ATCC 33277.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat Penelitian

- Alat ekstraksi standar
- Tabung reaksi
- *Anaerobic jar*
- Mikroskop
- Pipet pengencer (*ependorf*)
- *Syringe tip*

- *Vortex*
- Inkubator
- *Water-bath*
- Alat ukur panjang
- Alat ukur berat
- Pengukur waktu
- Epis
- Cawan petri
- *Glass object*
- Pensil warna
- Sengkelit
- Pinset
- Gelas ukur
- Gelas arloji
- Blender
- Alat pengocok
- Corong pisah
- *Evaporator* (Laborota 4000)
- *Dry oven*

4.6.2 Bahan Penelitian

- *Gas pack*, indikator anaerob
- Perbenihan agar DST (*Diagnostic Sensitivity Test*)
- Perbenihan cair (*Brain Heart Infusion Broth*)
- Lidah buaya
- Bahan pewarnaan Gram (*Gentien Violet, Lugol, dan Fuchsin*)
- Pelarut : n-heksan, etil asetat, etanol
- Bahan uji fitokimia : HCl, Pereaksi Lieberman Burchard (Asam Asetat Anhidrat dan Asam Sulfat pekat), Natrium Klorida, Besi (III) Klorida, Benzene, Ammonia
- Kertas saring

- Kassa
- Alkohol
- Akuabides
- NaCl

4.7 Variabel Penelitian

4.7.1 Variabel Terikat

- Pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis strain* standar ATCC 33277.

4.7.2 Variabel bebas

- Konsentrasi infusum lidah buaya

4.8. Metode Kerja I

Penelitian dimulai dengan pembuatan ekstrak lidah buaya dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi dan infundasi. Setelah itu, dilakukan uji identifikasi fitokimia secara kualitatif untuk mengetahui ada atau tidaknya kandungan kimia aktif dalam masing-masing hasil ekstraksi.

4.8.1 Pembuatan Ekstrak

4.8.1.1 Cara Pembuatan Ekstrak dengan Metode Maserasi Bertingkat

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi bertingkat. Lidah buaya utuh sebelumnya dibersihkan, dan ditimbang dalam keadaan kering. Kemudian, lidah buaya dipotong kecil-kecil dan diblender hingga halus seperti jus. Lidah buaya yang sudah diblender lalu dihitung volumenya dalam gelas ukur. Proses maserasi dimulai dengan mencampurkan lidah buaya dengan masing-masing pelarut secara bertahap dengan menggunakan pelarut paling nonpolar, semi polar, hingga paling polar, yaitu n-heksan, etil asetat, etanol hingga air, dengan perbandingan 1:1.

Setelah dicampur, larutan dikocok dengan menggunakan alat pengocok hingga homogen. Setelah itu, larutan dibiarkan beberapa saat hingga saling memisah membentuk dua lapisan yang berbeda antara fase pelarut di bagian atas dan fase air di bagian bawah. Kemudian, fase pelarut dan air dipisahkan dengan menggunakan corong pisah, meninggalkan fase pelarut dan fase air dalam tabung yang berbeda. Dalam proses maserasi, setiap pelarut digunakan 2 kali hingga senyawa aktif dalam lidah buaya terikat seluruhnya dengan pelarut. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan dari sisa pelarutnya dengan evaporator (Laborota 4000), dikeringkan dan ditimbang.

4.8.1.2 Cara Pembuatan Ekstrak dengan Metode Infundasi

Langkah pertama dalam pembuatannya adalah dengan mencuci lidah buaya dan memotongnya menjadi berukuran kecil-kecil lalu ditimbang hingga 50 Gram masing-masing. Kemudian, 50 Gram lidah buaya dan 500 ml air yang diletakkan dalam cawan petri ukuran besar, dimasukkan ke dalam *water bath* dengan suhu 95°C selama 15 menit. Setelah itu, campuran yang masih panas disaring ke dalam gelas ukur dengan menggunakan corong kaca yang sebelumnya telah dilapisi kain kassa dan kertas saring. Setelah itu, cairan infus diletakkan kembali ke cawan petri berukuran besar dan diuapkan dalam *waterbath* dengan suhu 95°C selama 120 menit sambil diaduk sesekali, hingga cairan infus susut dari 500 cc menjadi 50 cc dan diperoleh konsentrasi infusum lidah buaya 100%.

4.8.2 Uji Identifikasi Fitokimia

Untuk mengetahui ada atau tidaknya kandungan kimia aktif pada ekstrak heksan-lidah buaya, ekstrak etil asetat-lidah buaya, ekstrak etanol-lidah buaya dan infusum lidah buaya yang diperoleh, maka dilakukan uji fitokimia kualitatif. Uji ini menggunakan perubahan warna sebagai indikator adanya senyawa kimia tertentu pada ekstrak dan infusum setelah diberikan bahan kimia tertentu.

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan uji pembentukan busa. Adanya saponin ditunjukkan dengan pembentukan busa mantap selama proses pengocokan dan pendiaman dengan ketinggian busa tidak kurang dari 1 cm selama 15 menit setelah penambahan HCl. Pemeriksaan ulang dengan reaksi warna menggunakan pereaksi Lieberman Burchard (LB), menunjukkan terbentuknya warna biru-hijau.

Untuk melihat ada tidaknya kandungan senyawa fenol dan tannin, maka ekstrak dan infusum lidah buaya pertama –tama dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 tetes NaCl 10 %, kemudian larutan dibagi menjadi 2 bagian ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Tabung reaksi pertama ditambahkan 3 tetes FeCl_3 1% , kemudian didiamkan selama beberapa saat. Terjadinya perubahan warna menjadi warna hijau, biru, merah, ungu, atau hitam pekat menandakan adanya senyawa fenol dan tannin yang terkandung dalam ekstrak dan infusum tersebut. Kemudian tabung reaksi kedua dijadikan sebagai kontrol.

Ada tidaknya kandungan steroid dan terpenoid dalam infusum dan ekstrak dapat diuji dengan meneteskan ekstrak dan infusum lidah buaya dengan pereaksi Lieberman Burchard yang terdiri dari 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Jika timbul warna merah menandakan adanya senyawa

Universitas Indonesia

terpenoid, dan jika terbentuk warna hijau atau biru menandakan adanya senyawa steroid.

Pemeriksaan antrakuinon pada sampel dilakukan dengan cara menambahkan 5 mL Benzene yang diikuti dengan penambahan Ammonia 28 % sebanyak 5 mL, kemudian dikocok, warna merah yang terbentuk menunjukkan adanya antrakuinon dalam sampel.

4.9 Metode Kerja II

4.9.1 Pembagian Konsentrasi Infusum

Konsentrasi 100% dari infusum lidah buaya yang diperoleh, dibagi menjadi delapan konsentrasi yaitu konsentrasi 20% (0,8 cc infusum ditambah 3,2 cc media), 30% (1,2 cc infusum ditambah 2,8 cc media), 40% (1,6 cc infusum ditambah 2,4 media), 50% (2 cc infusum ditambah 2 cc media), 60% (2,4 cc infusum ditambah 1,6 media), 70% (2,8 cc infusum ditambah 1,2 media), 80% (3,2 cc infusum ditambah 0,8 cc media), dan 90% (3,6 cc infusum ditambah 0,4 cc media). Setelah itu dilakukan tindalisasi untuk sterilisasi dengan cara pemanasan dalam *water-bath* pada suhu 65° C selama 30 menit dan selama 3 hari berturut-turut.

4.9.2 Pemiakkan Bakteri

Bakteri standar yang sudah tersedia dalam kemasan diambil, kemudian dimasukkan ke dalam epis yang berisi cairan NaCl, lalu divortex hingga homogen. Bakteri kemudian dibiakkan dengan penggoresan secara tipis dan merata ke media perbenihan padat yaitu agar DST dengan menggunakan sengkeli. Selain itu, bakteri juga dibiakkan dalam media perbenihan cair yaitu BHI *Broth*, dengan mencelupkan bakteri menggunakan sengkeli dan divortex agar homogen. Kemudian, perbenihan padat dan cair dieram dalam *anaerobic jar* bersama dengan *gas pack* lalu ditutup

rapat agar menciptakan suasana anaerob pada suhu 37°C selama 3 x 24 jam.

4.9.3 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan suatu tindakan untuk konfirmasi bakteri positif Gram dan negatif Gram. Bakteri positif Gram tidak melepaskan kompleks kristal-violet-yodium saat dicuci dengan alkohol. Hasil pewarnaan menjadi merah karena diwarnai oleh *fuchsin*.

Perbedaan reaksi pewarnaan antara bakteri positif dan negatif Gram terletak pada susunan kimia pada dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri negatif Gram memiliki kadar lipid lebih tinggi dari positif Gram. Meskipun kompleks kristal violet-yodium telah terbentuk dalam kedua jenis bakteri, namun alkohol melarutkan lipid bakteri negatif Gram dengan meningkatkan permeabilitas sel, sehingga menyebabkan hilangnya kompleks warna yodium.

Cara konfirmasi bakteri dilakukan dengan cara, pertamanya *glass object* ditandai dengan pensil warna, ambil koloni dari biakan agar dengan sengkeli yang dipanasi lalu larutkan bakteri dengan NaCl pada *glass object* untuk memfiksasi jaringan. Selain itu, bakteri juga diambil dari perbenihan cair untuk identifikasi bakteri.

Kemudian warnai dengan larutan *gentien violet* selama 1-3 menit. Larutan *gentien violet* dihilangkan, cuci dengan lugol. Kemudian rendam dalam lugol selama 10 detik/1 menit. Selanjutnya rendam dengan alkohol 95% selama 10 detik, dengan digoyang-goyangkan. Cuci dengan air. Lalu warnai dengan larutan fuchsin selama 30 detik hingga 3 menit, setelahnya cuci dengan air, dan keringkan dengan kertas saring, atau *glass object* dapat dilewatkan di atas api. Setelah *glass object* diteteskan minyak emersi untuk difiksasi, *glass object* kemudian dilihat di mikroskop hingga bakteri terlihat jelas.

Universitas Indonesia

4.9.4 Penyetaraan Bakteri dengan Standar McFarland

Setelah dilakukan pembiakan bakteri selama 3 x 24 jam, tabung reaksi dilihat tingkat kekeruhannya. Tingkat kekeruhan *Porphyromonas gingivalis* dalam media cair dibandingkan dengan Standar McFarland dengan metode visual. Tabung reaksi yang berisi kultur bakteri diletakkan sejajar dengan tabung McFarland, lalu didapatkan tingkat kekeruhan tabung reaksi yang sama dengan tabung McFarland 5.

4.9.5 Pengenceran Bakteri

NaCl 4,5 cc dicampurkan dengan bakteri 0,5 cc dalam tabung reaksi pertama untuk mendapatkan pengenceran bakteri sebanyak 10x. Kemudian 0,5 cc larutan pada tabung reaksi pertama dicampurkan ke dalam tabung reaksi kedua yang berisi NaCl 4,5 cc untuk mendapatkan pengenceran bakteri sebanyak 100x. Kemudian, 0,5 cc larutan pada tabung reaksi kedua dicampurkan ke dalam tabung reaksi ketiga yang berisi NaCl 4,5 cc sehingga diperoleh pengenceran bakteri sebanyak 1000x. Setelah itu, 2,5 cc larutan pada tabung reaksi ketiga dicampurkan ke dalam tabung reaksi keempat yang berisi NaCl 2,5 cc untuk memperoleh pengenceran bakteri sebanyak 500x.

4.9.6 Uji Antibakteri dengan Metode Dilusi

Bakteri yang telah dilakukan penyetaraan dan pengenceran, ditetaskan sebanyak 0,02 cc ke dalam tabung reaksi pada masing-masing konsentrasi infusum daging lidah buaya. Kontrol positif diperoleh dengan inokulasi bakteri sebanyak 0,02 cc ke dalam media BHI *Broth* sebanyak 4 cc, sehingga larutan berwarna keruh. Kontrol negatif merupakan infusum daging lidah buaya dengan

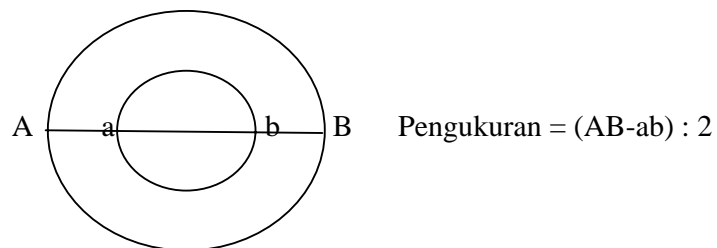
Universitas Indonesia

konsentrasi 50% tanpa inokulasi bakteri, sehingga larutan berwarna jernih. Kemudian berbagai tabung reaksi tersebut dieram di dalam *anaerobic jar* selama 3 x 24 jam pada suhu 37° C. Setelah 72 jam, pertumbuhan bakteri dapat ditentukan. Setelah dilakukan perbandingan dengan kontrol negatif, kekeruhan yang terlihat pada tabung reaksi menunjukkan masih adanya pertumbuhan bakteri. Sedangkan jika tabung reaksi tampak jernih, menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Untuk memastikan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada hasil dilusi yang tampak jernih, dilakukan penggoresan larutan pada pelat agar DST.

4.9.8 Uji Antibakteri dengan Metode Difusi

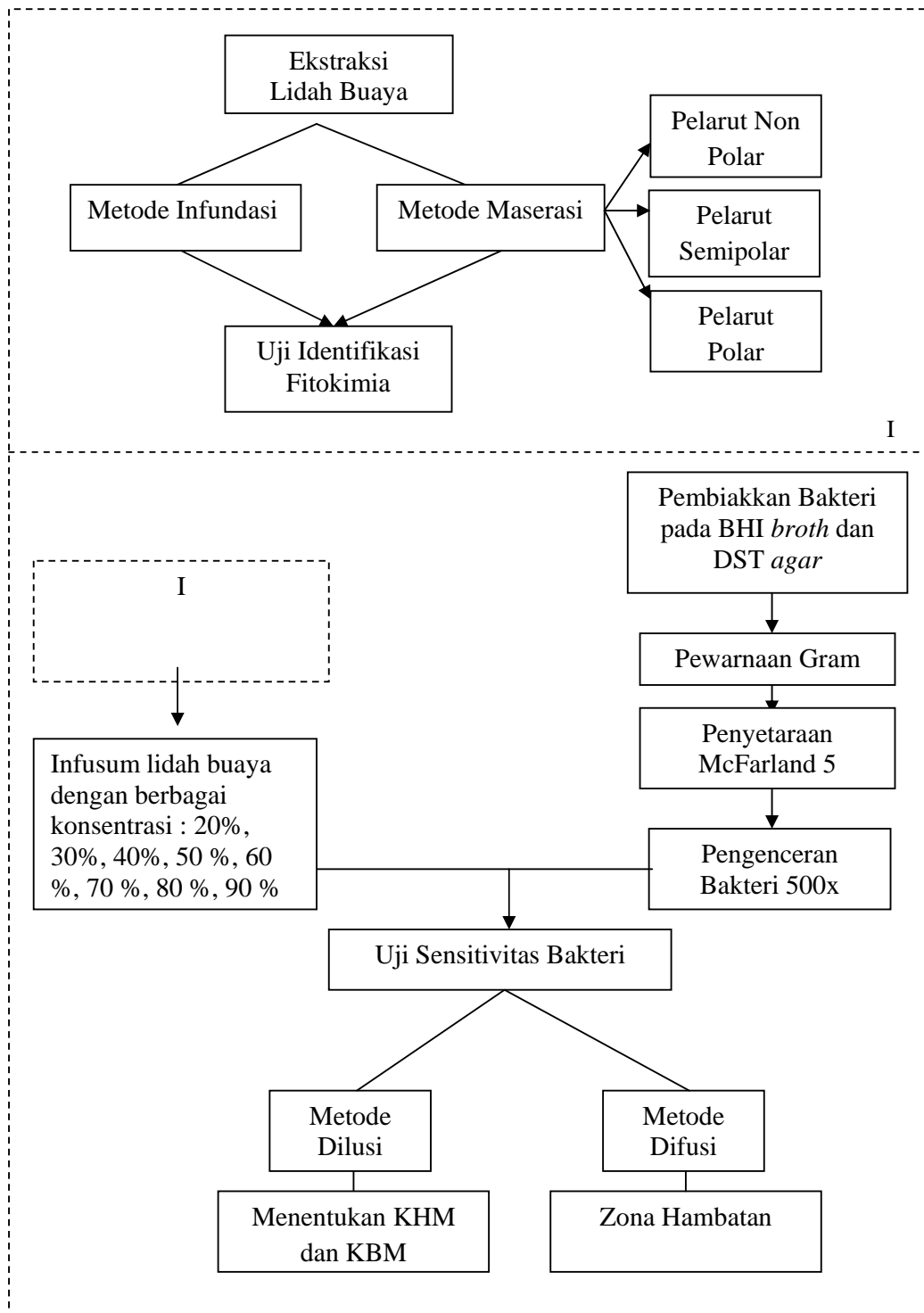
Bakteri yang telah dilakukan penyetaraan dan pengenceran, dituangkan secara perlahan dan merata ke perbenihan agar DST, lalu dimiringkan sedikit untuk dibuang kelebihannya. Perbenihan agar lalu dieram dalam inkubator pada suhu kamar yaitu 37°C selama 15 menit. Masing-masing konsentrasi infusum daging lidah buaya ditetaskan sebanyak 0,02 cc pada kertas saring berbentuk bulat dengan diameter 6 mm yang telah disterilkan, kemudian diletakkan pada perbenihan agar yang telah dieram selama 3 x 24 jam di dalam *anaerobic jar*. Setelah 72 jam, daya hambat infusum daging lidah buaya terhadap *Porphyromonas gingivalis* dapat dihitung dengan mengukur diameter zona hambatan yang terdapat dalam perbenihan.

Gambar 4.1 Cara pengukuran Zona Hambatan Infusum Lidah Buaya terhadap *Porphyromonas gingivalis* melalui metode difusi

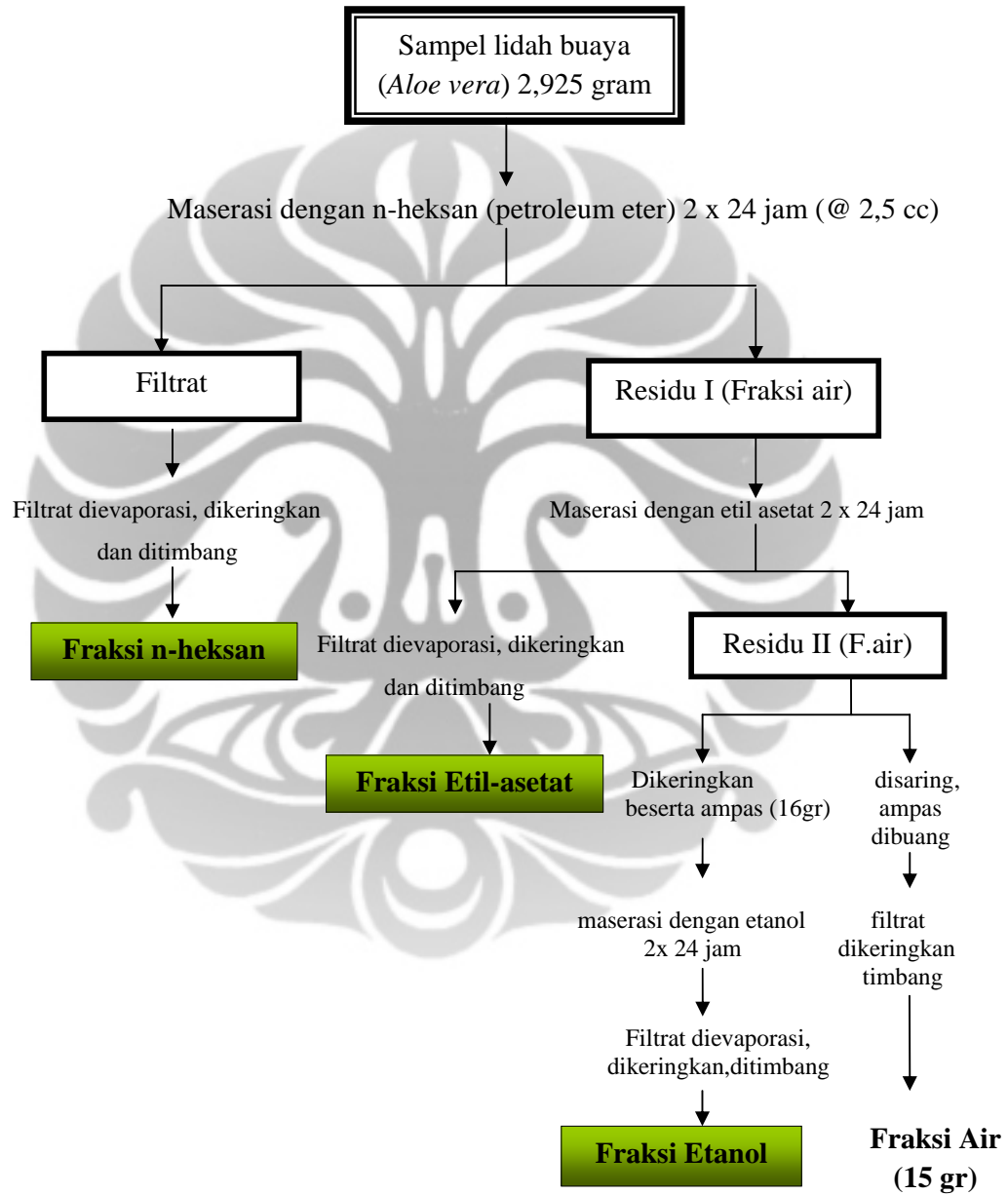


Universitas Indonesia

4.10 Alur Kerja Keseluruhan



4.10.1 Alur Kerja Metode Ekstraksi Maserasi :



4.10.2 Alur Kerja Metode Infundasi

