

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik.

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

Daging 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

- 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
- Gelas kimia
- 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*)
- Daging 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 daging lidah buaya.

4.8 Metode Kerja I

Penelitian dimulai dengan pembuatan ekstrak lidah buaya keseluruhan 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 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 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 dua kali hingga senyawa aktif dalam lidah buaya terikat seluruhnya dengan pelarut. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan dari sisa pelarutnya dengan evaporator (Laborota 4000), lalu dikeringkan dan ditimbang.

4.8.1.2 Metode Infundasi

Langkah pertama dalam pembuatannya adalah dengan mencuci dan memotong lidah buaya menjadi berukuran kecil-kecil kemudian ditimbang hingga 50 gram. Kemudian, 500 ml aquabides dicampur dengan 50 gram lidah buaya yang diletakkan dalam cawan petri ukuran besar, lalu 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. Kemudian, cairan infus diletakkan kembali ke cawan petri berukuran besar dan diuapkan dalam *water-bath* dengan suhu 95°C selama 120 menit sambil diaduk sesekali, hingga cairan infus susut dari 500 cc menjadi 50cc dan diperoleh konsentrasi infusum lidah buaya 100%.

4.8.2 Uji Identifikasi Fitokimia

Uji ini menggunakan perubahan warna sebagai indikator untuk melihat ada tidaknya senyawa kimia tertentu pada sampel setelah diberikan bahan kimia tertentu.

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

Untuk melihat ada tidaknya kandungan senyawa tanin dan fenol, sampel lidah buaya pertama 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 , 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 sampel tersebut. Kemudian, tabung reaksi kedua dijadikan sebagai kontrol.

Ada tidaknya kandungan steroid dan terpenoid dalam sampel dapat diuji dengan meneteskan sampel dengan pereaksi Liebermann Burchard yang terdiri dari 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Jika timbul warna merah, menandakan adanya senyawa 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 Pembuatan Infusum Daging Lidah Buaya

Langkah pertama dalam pembuatannya adalah dengan mencuci lidah buaya dan mengupas kulitnya hingga terpisah dengan

dagingnya yang berada di sebelah dalam. Kemudian, daging lidah buaya dipotong menjadi berukuran kecil-kecil lalu ditimbang hingga 50 gram. Prosedur selanjutnya merujuk pada 4.8.1.2. Konsentrasi 100% dari infusum daging 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 masing-masing konsentrasi infusum daging lidah buaya, dengan cara pemanasan dalam *water-bath* pada suhu 65°C selama 30 menit, yang dilakukan selama tiga hari berturut-turut.

4.9.2 Uji Identifikasi Fitokimia

Uji identifikasi fitokimia dilakukan pada infusum daging lidah buaya dengan konsentrasi 100%. Prosedur mengacu pada 4.8.3.

4.9.3 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 *Brain Heart Infusion Broth* (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.

4.9.4 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 pertama-tama dilakukan dengan menandai *glass object* dengan pensil warna, kemudian ambil koloni dari biakan agar menggunakan sengkeli yang dipanasi lalu larutkan bakteri dengan NaCl pada *glass object* untuk memfiksasi jaringan. Selain itu, bakteri juga diambil dari perbenihan cair untuk konfirmasi bakteri.

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

4.9.5 Penyetaraan Bakteri dengan Standar McFarland

Setelah dilakukan pembiakan bakteri selama 3 x 24 jam, tabung reaksi dilihat tingkat kekeruhannya. Tingkat kekeruhan *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 dalam media cair dibandingkan dengan 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.

4.9.6 Pengenceran Bakteri 500x

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.

4.9.7 Uji Antibakteri dengan Metode Dilusi

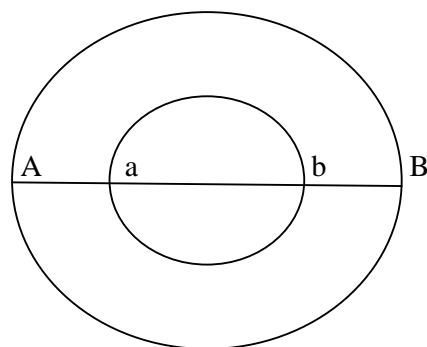
Bakteri yang telah dilakukan penyetaraan dan pengenceran, diteteskan sebanyak 0,02 cc ke dalam tabung reaksi pada masing-masing konsentrasi infusum daging lidah buaya, yaitu konsentrasi 20% hingga 90%. Kontrol positif diperoleh dengan inokulasi bakteri sebanyak 0,02 cc ke dalam media BHI *Broth* sebanyak 4 cc. Kontrol negatif merupakan infusum daging lidah buaya dengan konsentrasi 50% tanpa inokulasi bakteri. Kemudian, berbagai tabung reaksi tersebut dieram di dalam *anaerobic jar* selama 3x24 jam pada suhu 37°C. Setelah 72 jam, pertumbuhan bakteri dapat ditentukan dengan

membandingkan tabung reaksi perlakuan dengan kontrol negatif, kekeruhan yang terlihat pada tabung reaksi menunjukkan masih adanya pertumbuhan bakteri yang menandakan hasil positif. Sedangkan jika tabung reaksi tampak jernih, menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri yang menandakan hasil negatif. Untuk memastikan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada hasil dilusi yang tampak jernih, dilakukan penggosokan larutan pada pelat agar DST.

4.9.8 Uji Antibakteri dengan Metode Difusi

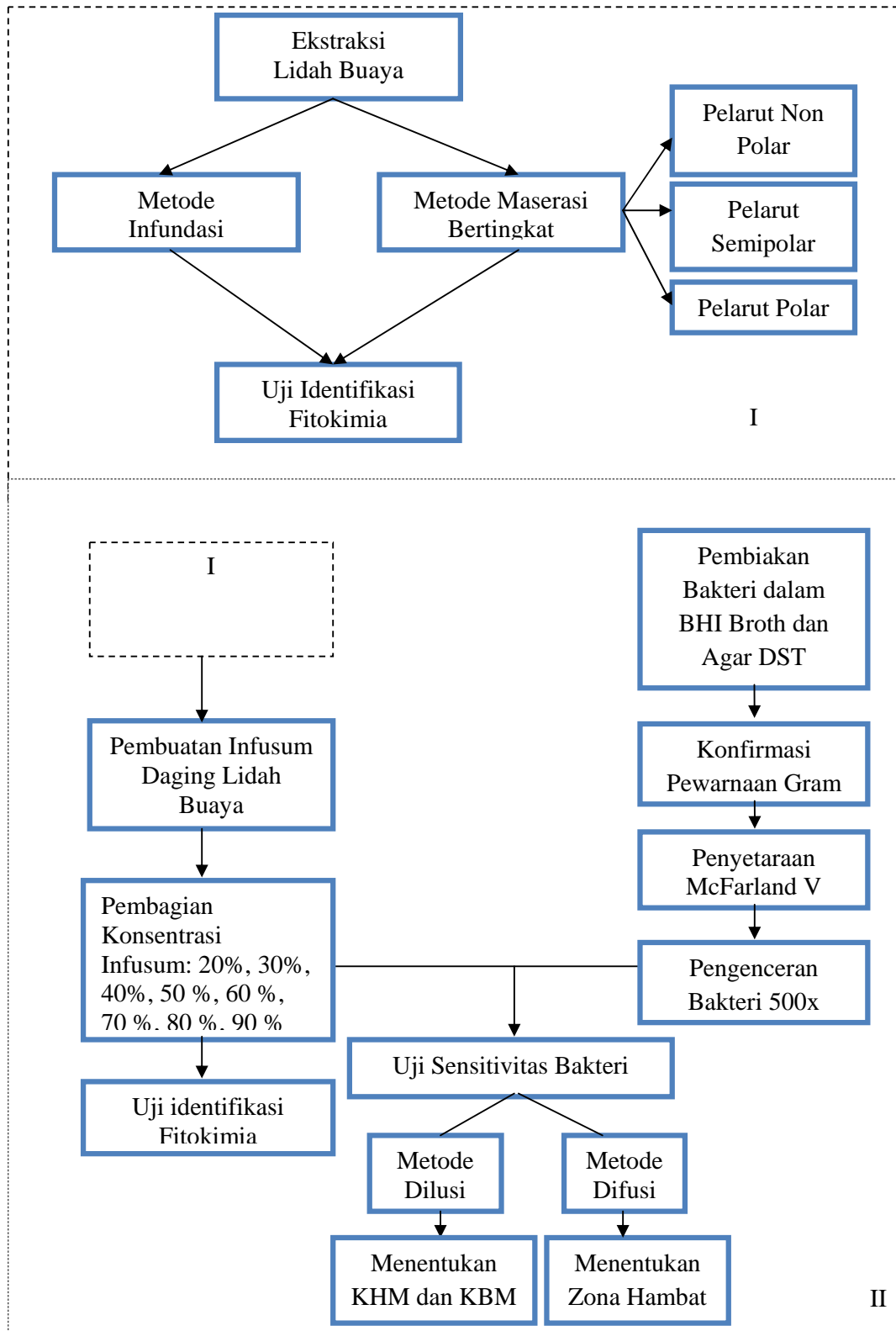
Bakteri yang telah dilakukan penyetaraan dan pengenceran, dituangkan secara perlahan dan merata ke perbenihan agar DST, lalu dimiringkan sedikit untuk dibuang kelebihannya. Perbenihan agar lalu dieram dalam inkubator pada suhu kamar yaitu 37°C selama 15 menit. Masing-masing konsentrasi infusum daging lidah buaya diteteskan sebanyak 0,02 cc menggunakan *syringe tip* 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* dan diciptakan suasana anaerob. Setelah 72 jam, daya hambat infusum daging lidah buaya terhadap *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 dapat dihitung dengan mengukur diameter zona hambatan yang terdapat dalam perbenihan.

Gambar 4.1. Cara Pengukuran Zona Hambatan Infusum Daging Lidah Buaya terhadap *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 Melalui Metode Difusi



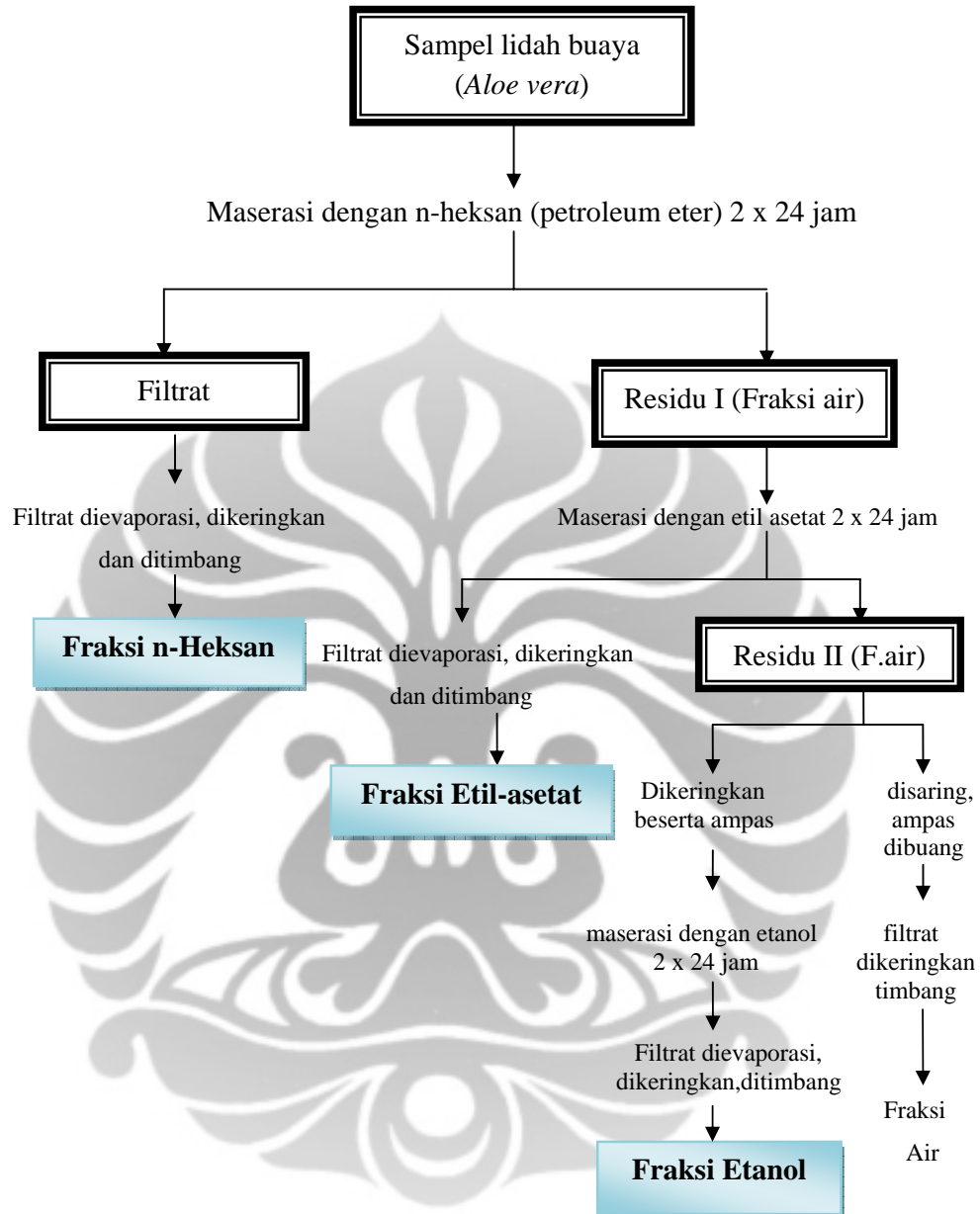
$$\text{Pengukuran} = (AB - ab) : 2$$

4.10 Alur Kerja Keseluruhan



Universitas Indonesia

4.10.1 Alur Kerja Metode Maserasi



4.10.2 Alur Kerja Metode Infundasi

