

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental. Rancangan percobaan yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas adalah *extra virgin olive oil* (EVOO) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% serta dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali dan variabel terikatnya adalah zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Tanjungkarang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni 2023.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian yaitu *extra virgin olive oil* (EVOO) kemasan dengan kriteria berikut :

1. EVOO berwarna kuning keemasan, pekat, serta memiliki aroma tajam.
2. Tersertifikasi Halal No. 00080092261118.
3. Tersertifikasi BPOM RI No. ML 107910489032.
4. EVOO merek Bertolli dari *The Olive Oil Company* (Deoleo).
5. Dikemas dalam botol berwarna hijau gelap dengan volume 100 ml.
6. Diperoleh dari supermarket.

Extra virgin olive oil (EVOO) dibuat pengenceran dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, dan 90% serta EVOO tanpa pengenceran 100%. Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987 diperoleh dari Universitas Indonesia. Jumlah perlakuan *extra virgin olive oil* (EVOO) sebanyak 10 perlakuan dengan 3 kali pengulangan yang didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus Federer, yaitu :

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No.	Variable penelitian	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
Variabel Bebas						
1	<i>Extra Virgin Olive Oil</i> (EVOO)	<i>Extra Virgin Olive Oil</i> (EVOO) berwarna kuning keemasan, pekat, dan memiliki aroma tajam dikemas dalam bentuk botol kaca volume 100 ml, yang diperoleh dari supermarket yang dilakukan pengenceran dengan berbagai konsentrasi.	Pengenceran dengan rumus : $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$	Pipet ukur	<i>Extra Virgin Olive Oil</i> dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%	Interval
Variabel Terikat						
2	Zona hambat Pertumbuhan bakteri <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 31987	Zona jernih yang terbentuk setelah pertumbuhan bakteri dihambat oleh <i>Extra Virgin Olive Oil</i> (EVOO).	Diameter zona hambat	Jangka sorong	Diameter zona hambat (mm)	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur Pemeriksaan

- Persiapan alat dan bahan.
- Peremajaan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987.
- Identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987.
- Pembuatan larutan uji.
- Pengujian *extra virgin olive oil* (EVOO) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987.
- Pengukuran zona hambat.

2. Metode Pemeriksaan

Pada penelitian ini metode pemeriksaan uji daya hambat yang digunakan yaitu metode difusi (*disc diffusion*) tes Kirby & Bauer. Metode ini dilakukan dengan cara menanam bakteri pada media agar padat, kemudian diletakkan disk yang mengandung obat dan dilihat hasilnya. Diameter zona jernih disekitar cakram diukur sebagai zona kekuatan obat dalam menghambat bakteri yang diuji. (Soemarno, 2000).

3. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah: tabung reaksi, rak tabung reaksi, petridist, lidi kapas steril, pinset, mixer vortex, inkubator, autoklaf, oven, neraca analitik, erlenmayer, pipet ukur, vacuum pump, ose, disk cakram, kapas, beaker glass, batang pengaduk, kertas kopi, benang kasur, jangka sorong, hot plate, korek api, handscoon, masker, lampu spirtus, wadah sampel, botol gelap, corong gelas, objek glass, mikroskop, *biosafety cabinet*, tabel *Zone Diameter Interpretive Standard*.

b. Bahan

1) Bahan uji

Bahan uji yang digunakan adalah *extra virgin olive oil* (EVOO) kemasan yang didapat dari pasaran bebas dan dibuat pengenceran dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, dan 90% serta konsentrasi tanpa pengenceran yaitu 100% yang diencerkan menggunakan larutan *dimethyl sulfoxide* (DMSO)

2) Bakteri uji

Bakteri uji yang digunakan adalah *Streptococcus mutans* ATCC 31987 yang diperoleh dari Universitas Indonesia.

3) Antibakteri pembanding

a) Kontrol negatif : disk blank yang direndam dalam *dimethyl sulfoxide* (DMSO).

b) Kontrol positif : antibiotik Erytromycin 15 µg.

4) Reagen

Reagen yang digunakan dalam penelitian yaitu aquadest steril, *dimethyl sulfoxide* (DMSO), minyak imersi, NaCl fisiologis steril (0,85%), larutan H₂O₂.

c. Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: Media Blood Agar Plate (BAP), Mac Conkey Agar, Endo Agar, Trypticase Soya Broth, Nutrient Broth + NaCl 6,5%, Muller Hinton Agar (MHA), Brain Heart Infussion-Broth (BHIB).

4. Cara Kerja

a. Sterilisasi Alat

Sterilisasi dengan pemanasan kering menggunakan *hot air oven* pada suhu 140°C dengan waktu 2 jam 30 menit, semua alat-alat gelas yang telah dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu ditutup kapas dan dibungkus dengan aluminium foil atau kertas kopi kemudian dimasukkan ke dalam hot air oven (Soemarno, 2000).

b. Pembuatan Media Brain Heart Infusion-Broth (BHIB)

Media *Brain Heart Infusion-Broth* ditimbang sebanyak 0,74 gram dilarutkan dengan 20 ml aquades dalam tabung Erlenmeyer, dipanaskan di atas hotplate hingga larut, setelah larut pindahkan ke masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 ml, kemudian tutup tabung dengan kapas dan sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C 1 atm selama 15 menit. Prosedur ini dilakukan untuk membuktikan bahwa media BHIB dalam keadaan steril sebelum inokulasi.

c. Pembuatan Media Muller Hinton Agar (MHA)

Media *Muller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 15,2 gram dilarutkan dengan 400 ml aquades dalam tabung Erlenmeyer, dipanaskan di atas hotplate hingga larut. Setelah media larut, sterilkan media menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Media MHA dituang ke dalam cawan petri steril secara aseptis, kemudian homogenkan dan diamkan hingga memadat, media siap pakai dapat disimpan dalam lemari es pada suhu 2-8° C.

d. Pembuatan NaCl 0,85%

Kristal NaCl ditimbang sebanyak 0,85 gram kemudian ditambahkan 100 ml aquades dalam labu ukur lalu dihomogenkan. Larutan NaCl 0,85% dituangkan ke dalam Erlenmeyer, kemudian ditutup dengan sumbat kapas yang dilapisi dengan aluminium foil kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

e. Peremajaan Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987

Peremajaan bakteri yaitu dengan cara memindahkan biakan murni *Streptococcus mutans* ATCC 31987 ke media Blood Agar Plate. Bakteri diambil sebanyak 1 ose kemudian diinokulasi dengan cara digoreskan pada media Blood Agar Plate dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh pada media Blood Agar Plate dapat diuji untuk keperluan identifikasi.

f. Identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987

- 1) Pengecatan Gram (Lampiran 3).
- 2) Penanaman pada media Blood Agar Plate, Trypticase Soya Broth, Nutrient Broth + NaCl 6,5%, Mac Concey agar plate, dan Endo agar (Lampiran 3).
- 3) Melakukan tes katalase pada media Trypticase Soya Broth (Lampiran 3).
- 4) Pembacaan hasil identifikasi (Lampiran 4).

g. Persiapan Larutan Uji *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO)

- 1) Diambil 3 botol *extra virgin olive oil* (EVOO) yang akan di ujikan dengan kriteria EVOO berwarna kuning keemasan, pekat, memiliki aroma tajam, dan dikemas dalam bentuk botol volume 100 ml, yang diperoleh dari supermarket.
- 2) *Extra virgin olive oil* (EVOO) dipipet sebanyak 30 ml untuk pengulangan ke 1 pada botol pertama, pada botol kedua dipipet sebanyak 30 ml untuk pengulangan ke 2, dan pada botol ketiga dipipet sebanyak 30 ml untuk pengulangan ke 3.

h. Pembuatan Larutan Uji

Tabel 3.2 Konsentrasi Pengenceran *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO)

Konsentrasi <i>extra virgin olive oil</i> (%)	Volume <i>extra virgin</i> <i>olive oil</i> (ml)	Volume DMSO (ml)	Volume Total (ml)
10	0,2	1,8	2
20	0,4	1,6	2
30	0,6	1,4	2
40	0,8	1,2	2
50	1	1	2
60	1,2	0,8	2
70	1,4	0,6	2
80	1,6	0,4	2
90	1,8	0,2	2
100	2	0	2

i. Uji Daya Hambat

Menggunakan metode Difusi (Uji Kirby & Bauer)

1) Hari pertama

a) Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987

(1) Ambil beberapa koloni bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987 yang telah diremajakan, kemudian disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHIB kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C dalam keadaan anaerob fakultatif.

(2) Suspensi tersebut diukur kekeruhannya dengan turbidimeter dengan tingkat kekeruhan mencapai 50 NTU.

b) Pengujian antibakteri *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO)

(1) Siapkan media MHA yang sudah memadat.

(2) Masukkan lidi kapas steril ke dalam suspensi bakteri media *Brain Heart Infussion-Broth* (BHIB) yang kekeruhannya telah distandarisasi dengan Mac Farland 0,5. Tunggu dan pastikan cairan sudah meresap kedalam kapas. Kemudian lidi kapas dapat diangkat dan diperas dengan menekannya pada dinding tabung bagian dalam sambil memutar lidi kapas.

(3) Kemudian lidi kapas dipulas ke seluruh permukaan media MHA. Biarkan media MHA yang sudah dipulas selama 15 menit agar suspensi meresap ke dalam media agar.

(4) Rendam disk blank pada masing-masing konsentrasi (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%) *extra virgin olive oil* (EVOO) selama 15 menit. Kemudian diambil menggunakan pinset steril dan dilekatkan pada permukaan media MHA yang telah dipulas suspensi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987 dengan jarak 20 mm antar disk.

(5) Untuk kontrol negatif disk blank direndam pada larutan *dimethyl sulfoxide* (DMSO). Kemudian diambil menggunakan pinset steril dan dilekatkan pada permukaan media MHA yang telah dipulas suspensi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987 dengan jarak 20 mm antar disk.

(6) Kontrol positif menggunakan disk antibiotik Erytromycin 15 µg diambil menggunakan pinset steril kemudian dilekatkan pada permukaan media MHA yang telah dipulas suspensi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987 dan diberi jarak 20 mm antar disk.

(7) Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam suasana fakultatif anaerob.

2) Hari kedua

a) Lihat dan baca hasil zona hambat yang terbentuk.

b) Ukur diameter zona hambat yang terbentuk. Diameter zona hambat yang diukur yaitu daerah jernih yang terbentuk disekeliling disk (tidak ada pertumbuhan bakteri) menggunakan jangka sorong.

c) Tulis hasil pengukuran diameter zona hambat dari masing-masing disk larutan uji antibakteri.

(Soemarno, 2000)

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data diperoleh dengan cara :

- Dilakukan pengujian efektivitas *extra virgin olive oil* (EVOO) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987.
- Dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing konsentrasi pada tiap pengulangan menggunakan alat ukur jangka sorong dalam satuan mm.
- Data zona hambat yang diperoleh disajikan dalam tabel.

2. Analisis Data

Data dianalisis menggunakan analisa data univariat dan analisa data bivariat. Analisa data univariat digunakan dengan menghitung nilai rata-rata diameter zona hambat pada seluruh perlakuan terhadap bakteri uji. Analisa data bivariat menggunakan uji *One Way ANOVA* ($\alpha=0,05$) sesuai dengan Rancangan Acak Lengkap untuk melihat ada tidaknya perbedaan yang nyata pada zona hambat *extra virgin olive oil* (EVOO) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987. Jika ada perbedaan yang nyata maka

dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil). Analisis data ini digunakan untuk melihat perbedaan zona hambat pada setiap konsentrasi antar konsentrasi secara signifikan pada taraf uji 5% atau tingkat kepercayaan 95% ($P < 0,05$).