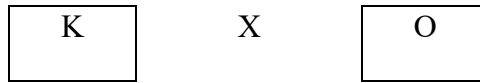


BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *one shot case study* (Alisjahbana, Hendratno dan Naldi 2015). Jenis *one shot case study* bertujuan untuk menunjukkan kekuatan pengukuran dan nilai ilmiah suatu desain penelitian. Pada penelitian ini menggunakan bakteri *Streptococcus mutans* dalam cawan petri dengan 4 perlakuan untuk mengetahui uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Adapun bagan dari *one-shot case study* adalah sebagai berikut:



Gambar 5. Desain Penelitian *one shot case study*

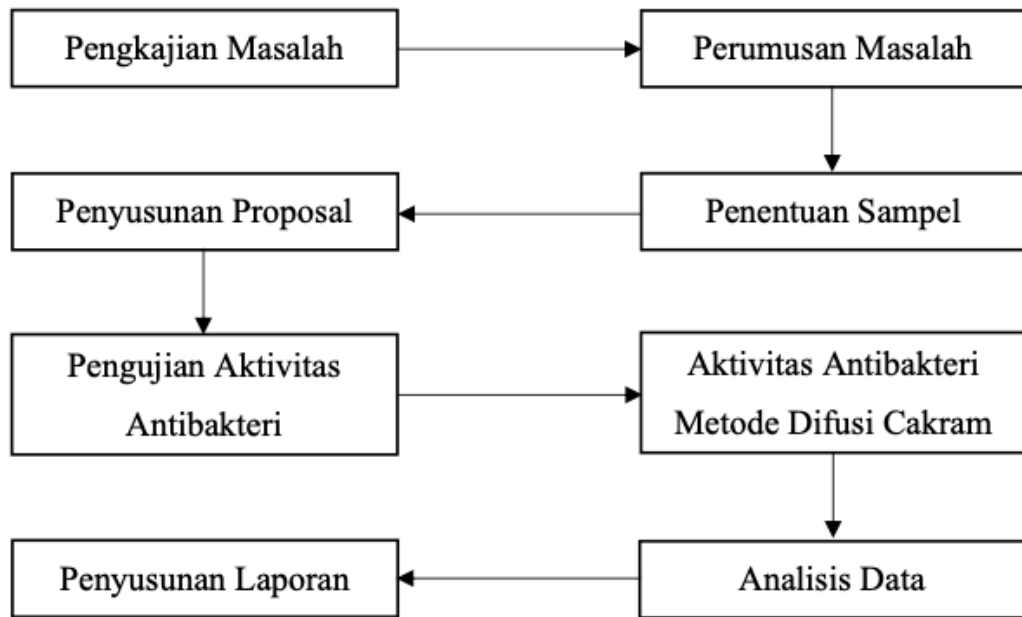
Keterangan :

K : Kelompok

X : *Treatment* atau perlakuan

O : Hasil observasi sesudah perlakuan

B. Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Warmadewa.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei sampai bulan Juni 2023.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Unit Analisis

Unit Analisis dalam penelitian ini adalah Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans*.

2. Populasi

Sampel dalam penelitian yang akan dilakukan adalah Daun Belimbing Wuluh. Sampel Daun Belimbing Wuluh diperoleh dari daerah Panjer, Denpasar Selatan.

3. Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini ekstrak etanol daun belimbing wuluh yang diperoleh dari daun belimbing wuluh dengan kriteria inklusi daun belimbing wuluh segar berwarna hijau, berumur muda sampai sedang yang tumbuh dari tangkai ketiga sampai keenam dan tidak berlubang.

4. Jumlah dan Besar Sampel

Jumlah daun belimbing wuluh yang digunakan untuk sampel basah sebanyak 2 kg lalu disortasi kemudian dikeringkan dan diayak sehingga diperoleh 300 gram. Selama proses ekstraksi, ekstrak etanol dari daun belimbing wuluh diperoleh dalam konsentrasi 100% sebagai stok sampel. Ekstrak daun belimbing wuluh diuji dengan 4 perlakuan yaitu menjadi variasi konsentrasi 20, 40, 60, dan 80% yang dibuat dengan mengencerkan stok sampel dengan pelarut etanol 96% sebagai kontrol positif atau kontrol kerja digunakan antibiotik klorampenikol 30 μg , dan kontrol dan kontrol negatif digunakan pelarut etanol 96%. Sehingga pada masing-masing perlakuan tersebut dilakukan pengulangan. Pengulangan masing-masing variasi konsentrasi dapat ditentukan menggunakan rumus Federer (1963) sebagai berikut :

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

Keterangan :

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$3(r-1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan di atas menggunakan empat perlakuan dengan enam kali pengulangan, sehingga besar sampel yang dibutuhkan adalah 12 gram.

E. Alat, bahan dan prosedur kerja

1. Alat

Blender (cosmos) (1 buah), oven (Memmert UN 55), neraca analitik (Fujitsu FS-A300) (1 buah), autoclave (Hirayama), *biosafety cabinet* (Biobase), tabung vial (2 buah), tempayan (2 buah), pipet ukur (Iwaki-Pyrex®) 5 ml dan 10 ml (masing-masing 1 buah), mikropipet 5µl – 200µl (secorex) (1 buah), mikropipet 100µl - 1000µl (secorex) (1 buah), hotplate (Jisico) (3 buah), lidi kapas steril (2 buah), ball pipet (b&n ballpipet) (1 buah), gelas ukur (Iwaki-Pyrex®) 250ml (1 buah), evaporator (Buchi I-300) (1buah), beaker glass (Iwaki-Pyrex®) 500 ml dan 800 ml (masing-masing 1 buah), ose bulat (2 buah), hotplate (Jisico) (3 buah), *magnetic stirrer* (1 buah), lampu spiritus (1 buah), *petridisk* (21 buah), *Mc Farland densitometer* (Biosan Den 1B) (1 buah), jangka sorong (1 buah), inkubator (Esco) (1 buah), autoclave (Tomy Sx- 500), rak tabung reaksi (1 buah), *refrigerator* (1 buah), *sample cup* volume 1 ml (6 buah) dan corong (2 buah).

2. Bahan

Daun belimbing wuluh, etanol 96% 3000 ml, biakan bakteri *Streptococcus mutans*, media pertumbuhan Muller Hinton Agar, standar 0,5 Mc Farland, NaCl Fisiologis 0,9%, yellow tip (10 buah), cakram disk kosong (35 buah), cakram antibiotik kloramfeikol 30 μ g (3 buah), etanol 96%, aluminium foil, kertas saring, dan kapas.

3. Prosedur Penelitian

a. Persiapan sampel

Pembuatan simplisia dan ekstrak daun belimbing wuluh dengan metode maserasi berdasarkan prosedur kerja yang dilakukan oleh (Pendit, Zubaidah, dan Sriherfyna, 2016) dan (Angelina, Turnip dan Khotimah, 2015) yang dimodifikasi oleh peneliti. Adapun prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:

- 1) Memetik daun belimbing wuluh sesuai kebutuhan.
- 2) Membersihkan kotoran daun yang dipetik kemudian dicuci pada air mengalir.
- 3) Melakukan sortasi basah dengan pemilihan daun sesuai dengan kriteria yang ditentukan dalam penelitian.
- 4) Menghilangkan sisa air daun belimbing wuluh dengan cara ditiriskan
- 5) Memotong daun belimbing wuluh kecil-kecil dan ditimbang terlebih dahulu dengan neraca analitik.
- 6) Mengeringkan daun belimbing wuluh dengan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 10 jam.
- 7) Melakukan proses sortasi pada bahan kering.
- 8) Menghaluskan simplisia menjadi bubuk (dihaluskan dengan mortar atau diblender).

- 9) Mengayak serbuk untuk mendapatkan simplisia yang lebih halus dan mudah larut.
- 10) Serbuk simplisia yang sudah diayak ditimbang dengan neraca analitik sebanyak 400 gram dan dimasukkan ke dalam botol 1,5 liter. Serbuk kemudian dituang dengan pelarut etanol 96% sampai simplisia terendam (\pm 1400 ml). Tutup dengan baik dan diamkan selama 2 hari, terlindung dari sinar matahari, diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 8 jam setiap hari.
- 11) Menyaring sampel dengan kertas saring kembali hasil maserasi, filtratnya ditampung kedalam botol kaca.
- 12) Menggabungkan filtrate dan pemekatan dengan evaporator pada suhu 40-60°C sampai ekstrak kental dihasilkan.
- 13) Menimbang ekstrak kental menggunakan neraca analitik untuk mengetahui massa total dari ekstrak yang diperoleh dan simpan kedalam refrigerator.

b. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh

Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh berdasarkan prosedur kerja yang dilakukan (Putri, Hafida dan Megawati, 2017) dan yang dimodifikasi oleh peneliti. Adapun prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:

- 1) Menggunakan konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh 20, 40, 60 dan 80%. Masing-masing konsentrasi dibuat dengan menimbang dan mengencerkan ekstrak etanol pekat daun belimbing dengan pelarut etanol 96%.
- 2) Menimbang stok sampel untuk variasi konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh dibuat dengan terbesar menggunakan presentase

perbandingan konsentrasi % (b/v) yang dapat ditentukan melalui rumus berikut:

$$\% = \frac{b}{v} \times 100$$

Keterangan:

% : Variasi konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh dalam satuan persen

b : Massa ekstrak daun belimbing wuluh (100%)

v : Volume total pengenceran

- 3) Membuat variasi konsentrasi uji ekstrak etanol daun belimbing wuluh dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

Tabel 2

Variasi Konsentrasi Uji Ekstrak Etanol Belimbing Wuluh

Konsentrasi (%)	Ekstrak Daun Belimbing Wuluh 100% (gram)	Etanol 96% (ml)
20	0,2	1
40	0,4	1
60	0,6	1
80	0,8	1

c. Prosedur pembuatan media uji sensitivitas (*Mueller Hinton Agar*).

- 1) Sebanyak 3,2 gram bubuk media *Mueller Hinton Agar* ditimbang menggunakan neraca analitik.
- 2) Setelah menimbang, bubuk media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dicampur dengan 120 ml akuades.

- 3) Memanaskan media dengan hotplate dan aduk hingga homogen.
 - 4) Setelah bubuk media larut dengan sempurna dan homogen, ukur pH media menggunakan pH stick (pH optimal $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C).
 - 5) Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan aluminium foil.
 - 6) Setelah mencapai suhu 121°C , autoclave mensterilisasi media selama 15 menit.
 - 7) Media yang telah disterilisasi, didinginkan sampai suhu media turun menjadi $\pm 40 - 50^{\circ}\text{C}$.
 - 8) Menuangkan media ke dalam cawan petri dengan volume ± 15 ml secara aseptis. Setelah itu, diamkan hingga memadat.
 - 9) Setelah media memadat, balikkan cawan petri. Jika tidak digunakan segera, media dapat dituangkan ke dalam tabung erlenmeyer atau dibungkus dengan kertas buram dan disimpan di dalam refrigerator.
- d. Proses penjuanan berbagai konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh dan kontrol ke dalam cakram kosong
- 1) Menyediakan cakram kosong berukuran 6 mm dan pipet 20 μl ekstrak etanol daun belimbing wuluh masing-masing. Kemudian masukkan cairan ke dalam cakram hingga meresap sepenuhnya.
 - 2) Menggunakan cakram kosong yang dijenuhkan untuk mengontrol dengan 20 μl etanol 96% sebagai pelarut pengenceran.
 - 3) Gunakan cakram antibiotik kloramfenikol 30 μl untuk control kerja. Kontrol kerja digunakan untuk menjaga sterilitas prosedur kerja dan untuk membandingkan hasil pemeriksaan apabila kelompok perlakuan menghasilkan

hasil positif atau menunjukkan bahwa terbentuk zona hambat. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*

Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* berdasarkan prosedur kerja yang dilakukan (Dharmawati *et al.*, 2022) yang dimodifikasi oleh peneliti. Adapun prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:

- 1) Mengambil biakan murni dari koloni bakteri *Streptococcus mutans* pada ose dan suspensikan dalam tabung reaksi berisi masing-masing 5 ml larutan NaCl Fisiologis 0,9% steril sampai memperoleh konsentrasi 0,5 *Mc Farland* untuk setiap bakteri.
- 2) Membaca kekeruhan suspensi bakteri menggunakan *Mc Farland* densitometer.
- 3) Dengan menggunakan densitometer *Mc Farland* untuk membaca kekeruhan suspensi bakteri. 0,5 *Mc Farland* setara dengan $1,5 \times 10^8$ (*Colony Forming Unit*) CFU/ml.

e. Tahap pemeriksaan uji daya hambat antibakteri

Tahap pemeriksaan uji daya hambat antibakteri berdasarkan prosedur kerja yang dilakukan (Dharmawati *et al.*, 2022) dan (Putri dkk., 2017) yang dimodifikasi oleh peneliti. Adapun prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:

- 1) Menyediakan suspensi bakteri 0,5 *Mc Farland Streptococcus mutans* dengan lidi kapas steril. Dibiarkan selama beberapa saat agar suspensi meresap ke dalam kapas.
- 2) Mengoleskan suspensi bakteri 0,5 *Mc Farland Streptococcus mutans* ke permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) lainnya. Pastikan suspensi tersebar merata di seluruh permukaan media dan kemudian tutup media.

- 3) Selama 15 menit, diamkan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* agar suspensi bakteri dapat meresap ke dalam agar.
- 4) Mengeringkan permukaan media. Masing-masing cakram diberi ekstrak etanol daun belimbing wuluh dalam konsentrasi 20, 40, 60, dan 80%, dan kemudian kontrol ditempelkan pada permukaan yang sama dan ditekan perlahan dengan pinset hingga cakram melekat sempurna pada permukaan media.
- 5) Meletakkan cakram antibiotik kloramfenikol 30 µg, berfungsi sebagai kontrol positif dan negatif pada setiap media MHA yang diinokulasi dengan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*.
- 6) Menetapkan jarak antara cakram pada jarak ±15mm dan tidak boleh memindahkan atau mengubah cakram yang sudah ditempelkan pada permukaan media.
- 7) Selama 24 jam, media MHA yang diinokulasi dengan bakteri *Streptococcus mutans* diinkubasi pada suhu 37°C di inkubator..

f. Pelaporan hasil

Dilihat dan menggunakan jangka sorong untuk mengukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Zona hambat, yang merupakan daerah bening pada cakram² yang tidak memiliki pertumbuhan bakteri, diukur dengan mengukur tiga sisi, yaitu horizontal, vertikal, dan miring. (Mahmudah and Atun, 2017).

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang dikumpulkan adalah data primer. Sumber data primer merupakan sumber data yang langsung memberikan data kepada pengumpul data (Sugiono, 2009 dalam Istana dan Manado, 2013). Data primer meliputi data diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* pada berbagai variasi konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh, yang diperoleh dari penelitian di laboratorium.

2. Teknik pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan teknik pengumpulan data secara observasi dan penelitian laboratorium menggunakan metode difusi cakram.

3. Instrumen pengumpulan data

- a) Alat pelindung diri (APD)
- b) Alat tulis
- c) Alat dokumentasi (camera)
- d) Alat pemeriksaan dan pengambilan sampel

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik Pengolahan Data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang dinyatakan dalam satuan mm (millimeter) diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating data yaitu data yang disajikan dalam bentuk tabel naratif.

2. Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis kuantitatif, dilakukan dengan uji statistik menggunakan bantuan perangkat lunak komputer. Analisis data dilakukan dengan beberapa tahap, antara lain:

- a) Untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak normal digunakan uji *Kolmogorov Smirnov*.
- b) Untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan menggunakan ekstrak etanol daun belimbing wuluh antara konsentrasi 20, 40, 60, dan 80% apabila data berdistribusi normal digunakan uji *One Way Anova*.
- c) Untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan menggunakan ekstrak etanol daun belimbing wuluh antara konsentrasi 20, 40, 60, dan 80% apabila data berdistribusi tidak normal digunakan uji *Kruskal Wallis*.
- d) Untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* apabila data berdistribusi normal, uji statistik yang digunakan adalah LSD (*Least Significant Deference*).
- e) Untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* apabila data berdistribusi tidak normal, uji statistik yang digunakan adalah *Mann-Whitney*.