

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian *true experimental*, dengan rancangan penelitian *Posttest only control group design*. Rancangan penelitian ini memungkinkan untuk peneliti mengukur pengaruh perlakuan atau intervensi pada satu kelompok yang diberi perlakuan dan satu kelompok kontrol tidak diberi perlakuan yang berfungsi sebagai kontrol kerja. Menurut Notoatmodjo (2012) gambar dari rancangan ini adalah:

	Perlakuan	Posttest
R _E	X	O ₂
R _K		O ₂

Gambar 4. Desain Penelitian *Posttest only-control grup design*

Keterangan:

- R_E : Kelompok eksperimen dalam penelitian ini adalah berbagai konsentrasi ekstrak Etanol daun gamal pada konsentrasi 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%
- R_K : Kelompok kontrol dalam penelitian ini terdiri dari kontrol positif berupa cakram antibiotik Kloramfenikol dan kontrol negatif berupa cakram yang mengandung etanol 96%.
- X : Perlakuan atau eksperimen berupa berbagai konsentrasi ekstrak Etanol daun gamal
- O₂ : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Dasar, Kimia Terapan, dan Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Denpasar

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai Juni tahun 2018.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Variabilitas populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah semua tanaman gamal dengan nama ilmiah (*Gliricidia sepium*), yang tumbuh di pesisir pantai. Bagian tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun gamal dari tangkai ketiga sampai tangkai keenam.

2. Besar sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak Etanol daun gamal (*Gliricidia sepium*). Massa sampel ekstrak Etanol daun gamal (*Gliricidia sepium*) yang diperlukan adalah sebanyak 3 gram. Ekstrak Etanol daun gamal dibuat dalam lima konsentrasi yaitu 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%, dengan menggunakan Etanol sebagai pelarut, sehingga jumlah perlakuan dalam uji ini adalah 5.

Syarat jumlah pengulangan yang bisa dilakukan untuk percobaan laboratorium adalah cukup tiga kali pengulangan (Hanafiah, 2005). Sehingga akan dilakukan tiga kali pengulangan dalam satu kali replikasi sampel ekstrak Etanol daun gamal. Jadi, besar sampel dalam penelitian ini adalah jumlah perlakuan dikalikan dengan jumlah pengulangan, yaitu sebesar 15 sampel. Dilakukan

replikasi sebanyak 2 kali, sehingga total besar sampel atau unit analisis adalah sebanyak 30.

3. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* pada variasi konsentrasi ekstrak Etanol daun gamal (*Gliricidia sepium*) dengan 5 jenis konsentrasi yaitu 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%. Konsentrasi ini dipilih untuk mengetahui konsentrasi paling efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

D. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja

1. Alat

Tikar (1 buah), pengayak (1 buah), pipet ukur (Iwaki-Pyrex®) 1 ml dan 10 ml (1 buah), mikropipet (socorex) 20 µl-1000 µl (1 buah) dan tip (10 buah), ball pipet (d&n ball pipet) (1 buah), gelas ukur (Iwaki-Pyrex®) 100 ml (1 buah), blender Miyako (1 buah), rotary evaporator (1 buah), beaker glass (Iwaki-Pyrex®) 50 dan 500 ml (1 buah), spiritus, tabung reaksi (pyrex), neraca analitik Radwag (1 buah), Biosafety cabinet, Mc Farland densitometer (Biosan) (1 buah), incubator (Esco) (1 buah) dan autoclave (Tomy Sx-500).

2. Bahan

Serbuk daun gamal (100 gr), ekstrak daun gamal, aquadest steril 1000 ml, bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 35668, media Muller Hinton Agar, standar MacFarland 0,5%, NaCl fisiologis 0,9%, cakram disk kosong 30 buah, cakram antibiotic Kloramfenikol 30µg (4 buah), lidi kapas steril (2 buah), Etanol 96%, aquadest dan aluminium foil.

3. Prosedur kerja

a. Pembuatan media

- 1) Pembuatan Media MHA (Muller Hinton Agar)
 - a) Ditimbang serbuk MHA (Muller Hinton Agar) dilarutkan dengan aquadest steril.
 - b) Dihomogenkan dengan hotplate stirrer, sampai media homogen dengan baik.
 - c) Media ditutup dengan kapas dan aluminium foil kemudian dibungkus dengan kertas buram, lalu disterilisasi dalam autoclave dengan suhu 121⁰C selama 2 jam.
 - d) Didinginkan media yang telah steril.
 - e) Dituangkan kedalam plate yang telah disterilisasi.
 - f) Masing-masing plate diisi minimal dengan 15 ml media (Muller Hinton Agar).
 - g) Ditunggu hingga membentuk agar.

b. Persiapan sampel

- 1) Pembuatan ekstrak Etanol daun gamal metode maserasi:
 - a) Daun gamal muda yang masih berwarna hijau muda dipetik, ditimbang dan selanjutnya dicuci dengan air mengalir, agar bersih dari kotoran.
 - b) Daun gamal ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.
 - c) Daun gamal kemudian dipotong untuk memperluas daerah pengeringan.
 - d) Potongan daun gamal kemudian dikeringkan dengan cara dianginkan dan dijauhkan dari sinar matahari langsung.
 - e) Simplisia yang sudah kering, ditimbang kembali untuk menentukan kadar air dalam simplisia. Kadar air dalam simplisia harus < 10%.

- f) Simplisia kering dihaluskan dengan blender, kemudian ditimbang masing-masing 100 gram.
- g) Sebanyak 100 gram serbuk sampel yang telah ditimbang, dilarutkan dengan Etanol 96% sampai terendam (\pm 500 ml), ditutup dengan aluminium foil selama 3 hari, kemudian dihomogenkan dengan stirrer selama 8 jam setiap harinya.
- h) Setelah 24 jam, rendaman kemudian disaring.
- i) Dilakukan remaserasi dengan perlakuan yang sama seperti maserasi pertama pada endapan yang tersisa setelah penyaringan kemudian dihomogenkan dengan hotplate stirrer selama 3 hari dengan perbandingan waktu 8 jam setiap harinya.
- j) Sesudah 24 jam, kemudian disaring.
- k) Semua filtrat digabung dan dievaporasi pada suhu (40-60⁰C), sehingga akan didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kemudian ditimbang sesuai dengan massa yang diperlukan.
- 2) Pembuatan berbagai konsentrasi ekstrak Etanol daun gamal.
- a) Rumus pengenceran yang digunakan yaitu sebagai berikut :

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

Keterangan rumus :

% : variasi konsentrasi dalam satuan persen

b : masa ekstrak Etanol daun gamal (100%)

v : volume pengenceran

- b) Jumlah ekstrak daun gamal konsentrasi 100% yang diperlukan untuk masing-masing konsentrasi adalah sebagai berikut:
- (1) Konsentrasi 80% dibuat dengan menimbang 0,8 gram ekstrak Etanol daun gamal konsentrasi 100% kemudian ditambahkan Etanol sampai tanda batas satu ml pada tabung eppendorf.
 - (2) Konsentrasi 70% dibuat dengan menimbang 0,7 gram ekstrak Etanol daun gamal konsentrasi 100% kemudian ditambahkan Etanol sampai tanda batas satu ml pada tabung eppendorf.
 - (3) Konsentrasi 60% dibuat dengan menimbang 0,6 gram ekstrak Etanol daun gamal konsentrasi 100% kemudian ditambahkan Etanol sampai tanda batas satu ml pada tabung eppendorf.
 - (4) Konsentrasi 50% dibuat dengan menimbang 0,5 gram ekstrak Etanol daun gamal konsentrasi 100% kemudian ditambahkan Etanol sampai tanda batas satu ml pada tabung eppendorf.
 - (5) Konsentrasi 40% dibuat dengan menimbang 0,4 gram ekstrak Etanol daun gamal konsentrasi 100% kemudian ditambahkan Etanol sampai tanda batas satu ml pada tabung eppendorf.
- 3) Pembuatan suspensi *Streptococcus mutans*
- a) Biakan murni koloni *Streptococcus mutans* diambil dengan ose dan disuspensikan dalam larutan NaCl fisiologis steril 0,9%.
 - b) Kekeruhan suspensi bakteri dibaca dengan menggunakan alat *Mc Farland densitometer*, dimana 0,5% *Mc Farland* setara dengan $1,5 \times 10^8$ (Colony Forming Unit) CFU/ml.

- 4) Penjenuhan berbagai konsentrasi ekstrak Etanol daun gamal dan kontrol berupa Etanol.
 - a) Disiapkan masing-masing cakram kosong, yang kemudian direndam kedalam masing-masing konsentrasi ekstrak Etanol daun gamal, hingga cairan meresap sempurna.
 - b) Sebagai kontrol, disk kosong direndam dengan Etanol.
 - c) Sebagai kontrol kerja, digunakan cakram disk dengan antibiotik Kloramfenikol 30 µg.
- c. Tahap pemeriksaan
 1. Dichelupkan lidi kapas yang telah disiapkan kedalam suspensi bakteri 0,5% *Mc Farland*, didiamkan beberapa saat, lalu kemudian ditiriskan dengan cara menekankan pada dinding tabung.
 2. Lidi kapas tersebut digoreskan pada permukaan media MHA secara merata, kemudian media ditutup kembali.
 3. Media MHA yang sudah berisi suspensi bakteri didiamkan diatas tempat datar selama 5-15 menit agar suspensi bakteri yang telah disebar, meresap kedalam media.
 4. Setelah kering, masing-masing cakram disk yang sudah berisi berbagai konsentrasi ekstrak daun gamal, kontrol, dan antibiotik Kloramfenikol ditempelkan pada permukaan media MHA, sambil sedikit ditekan dengan pinset, agar cakram disk menempel kuat pada media MHA.
 5. Jarak antar cakram minimal 15 mm dengan syarat tidak boleh dipindahkan atau digeser lagi setelah penempelan pertama dilakukan.

6. Media diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam dalam inkubator dengan posisi media terbalik dan dibungkus rapi dengan kertas buram.

d. Pelaporan hasil

Dilihat dan diukur diameter zona hambat bakteri *Streptococcus mutans* pada media MHA dengan menggunakan jangka sorong. Diameter yang dihambat adalah zona bening yang tidak ditumbuhi koloni bakteri, diukur panjang garis tengah, dari satu sisi ke sisi yang lain.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang dikumpulkan adalah data berupa diameter zona hambat ekstrak Etanol daun gamal terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* secara in-vitro, dan data tersebut diperoleh melalui penelitian yang dilakukan laboratorium.

2. Teknik pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan teknik pengumpulan data secara observasi dan penelitian laboratorium dengan mengukur diameter zona hambat ekstrak Etanol daun gamal terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* menggunakan metode difusi cara Kirby-Bauer. Hasil pengukuran diameter zona hambat dari masing-masing unit analisis yang menunjukkan aktivitas penghambatan dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen pengujian perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* pada berbagai konsentrasi ekstrak Etanol daun gamal secara in vitro yang dinyatakan dalam satuan mm (millimeter) diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating data yaitu data yang disajikan dalam bentuk table dan naratif.

2. Analisis data

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

- a. Untuk mengetahui data distribusi normal atau tidak digunakan uji *Kolmogorov smirnov*
- b. Untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan menggunakan ekstrak Etanol daun gamal pada berbagai konsentrasi yang diuji, apabila data berdistribusi normal digunakan uji *One Way Anova*.
- c. Untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan menggunakan ekstrak Etanol daun gamal pada berbagai konsentrasi yang diuji, 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*, uji statistic yang digunakan adalah LSD (*Least Significant Deference*).