

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian *true experimental* dengan rancangan penelitian *Compeletely Randomized Design* (Rancangan Acak Lengkap). Dalam desain *true experimental* ini, peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen (Sugiyono, 2012). Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan yang paling sederhana jika dibandingkan dengan rancangan-rancangan lainnya. Dalam rancangan ini tidak terdapat lokal kontrol, sehingga sumber keragaman yang diamati hanya perlakuan dan galat. RAL umumnya cocok digunakan untuk kondisi lingkungan, alat, bahan dan media yang homogen (Hanafiah, 2016).

Tabel 4.
Rancangan penelitian *Compeletely Randomized Design*
(Rancangan Acak Lengkap)

¹ B2	² D6	³ A3	⁴ E5	⁵ A2
⁶ B6	⁷ E6	⁸ D5	⁹ A5	¹⁰ A4
¹¹ B1	¹² B3	¹³ D4	¹⁴ C3	¹⁵ B5
¹⁶ E4	¹⁷ D2	¹⁸ D3	¹⁹ E2	²⁰ C1
²¹ E3	²² A6	²³ E1	²⁴ C5	²⁵ C4
²⁶ A1	²⁷ C6	²⁸ C2	²⁹ B4	³⁰ D1

Keterangan : ¹B2

¹ : Nomor unit analisis

B : Perlakuan

- 2 : Nomor pengulangan
- A : Etanol 96% sebagai kontrol
- B : Ekstrak etanol daun legundi konsentrasi 30%
- C : Ekstrak etanol daun legundi konsentrasi 50%
- D : Ekstrak etanol daun legundi konsentrasi 70%
- E : Ekstrak etanol daun legundi konsentrasi 90%

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

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

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai bulan Juni 2018

C. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia Linn.*) yang diperoleh dari daun tanaman legundi dengan kriteria inklusi daun legundi yang segar, berwarna hijau yang tidak terlalu muda maupun tua, tidak berlubang, berumur muda sampai sedang yang tumbuh dari tangkai ketiga sampai ketujuh dari pucuk. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu daun legundi yang tidak segar, layu, berwarna kuning, dan berlubang yang tidak sesuai dengan kriteria yang ditentukan oleh peneliti.

2. Besar sampel penelitian

Ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia Linn.*) dengan konsentrasi 100% sebagai stok sampel yang diperoleh dari proses ekstraksi. Ekstrak etanol daun legundi dibuat empat seri konsentrasi yang berbeda yaitu 30%, 50%, 70%, dan 90% yang dibuat dengan mengencerkan stok sampel dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Penelitian ini menggunakan etanol 96% sebagai kontrol, sehingga jumlah perlakuan dalam penelitian ini adalah lima. Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan pada masing-masing perlakuan yang ditentukan dengan persamaan berikut:

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

Keterangan:

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

$$(5 - 1) (r - 1) \geq 15$$

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

$$4r - 5 \geq 15$$

$$4r \geq 20$$

$$r \geq 5$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini sebanyak lima kali. Namun, pada penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak enam kali. Menurut Hanafiah (2008), jumlah minimal pengulangan untuk percobaan laboratorium adalah cukup tiga kali

pengulangan, dengan demikian maka jumlah pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini sudah memenuhi syarat. Berdasarkan jumlah perlakuan dan pengulangan yang dilakukan, maka banyaknya data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah sebanyak 30 unit data. Jumlah data tersebut diperoleh dari jumlah perlakuan dikalikan dengan jumlah pengulangan.

3. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun legundi (*Vitex Trifolia Linn.*) yaitu 30%, 50%, 70%, dan 90% terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* dan diameter zona hambat yang terbentuk dalam kontrol yang mengandung etanol 96%. Seri konsentrasi tersebut digunakan untuk mendapatkan konsentrasi yang paling efektif yang dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

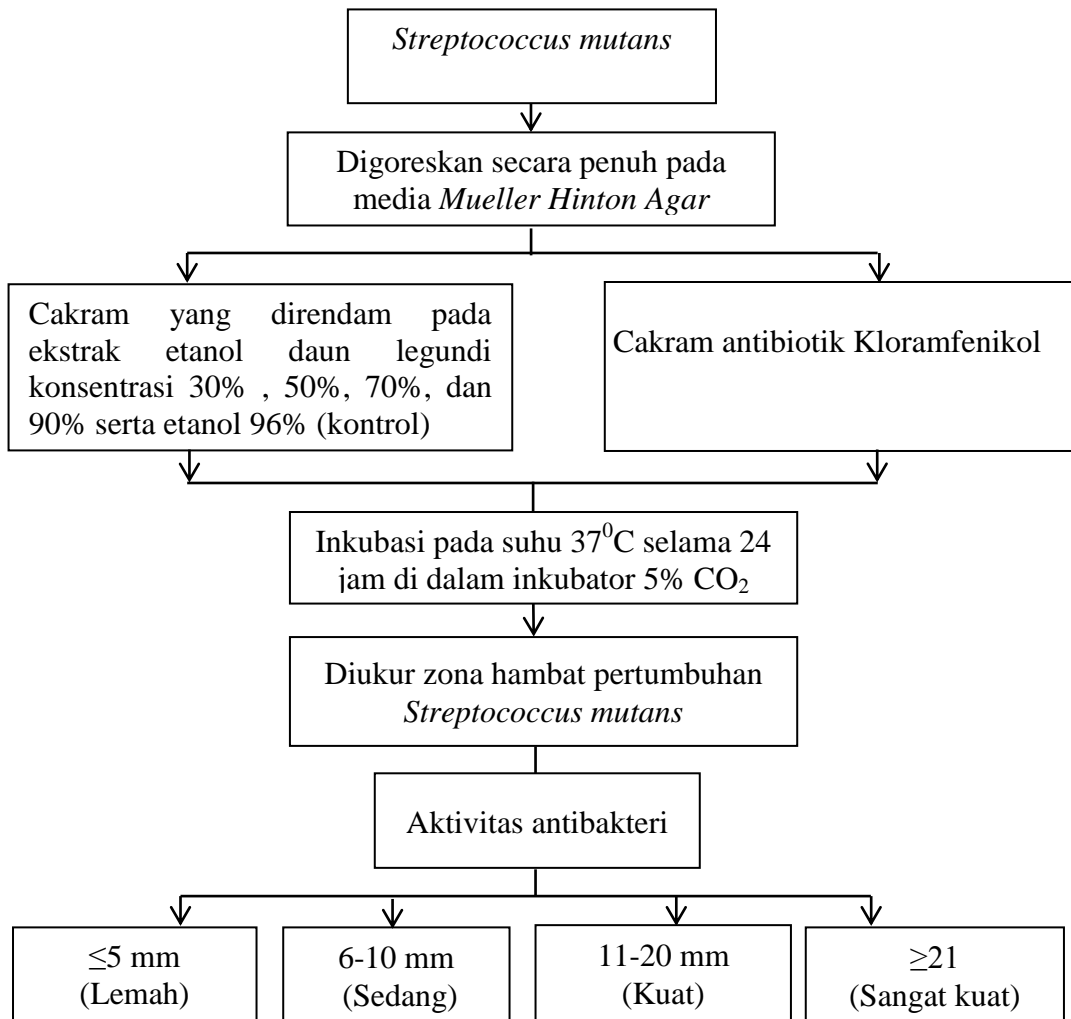
Blender (1 buah), neraca analitik (radwag) (1 buah), pipet ukur (iwaki pyrex ®) 1 ml dan 10 ml (1 buah), mikropipet 20µl-1000µl (socorex) dan tip (10 buah), ball pipet (d&n ball pipet) (1 buah), gelas ukur (iwaky-pyrex®) 250 ml (1 buah), evaporator (1 buah), beaker glass (iwaky-pyrex®) 250 ml (1 buah) dan 800 ml (2 buah), corong (1 buah), spiritus 1 buah, petridisk steril (8 buah), tabung reaksi (1 buah), *biosafety cabinet* (biobase), *Mac Farland* densitometer (Biosan) (1 buah), inkubator (Esco) (1 buah), jangka sorong (1 buah) dan *autoclave* (Tomy Sx-500).

2. Bahan

Daun legundi, etanol 96% 1000 ml, bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 35668, media Muller Hinton Agar, standar *Mac Farland* 0,5 %, Natrium Klorida fisiologis 0,9 %, cakram disk kosong (30 buah), cakram disk antibiotik kloramfenikol (7 buah), lidi kapas steril (1 buah), kertas saring dan aluminium foil.

E. Kerangka Kerja dan Prosedur Kerja

1. Kerangka kerja



Gambar 5. Kerangka kerja penentuan zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*

Keterangan gambar :

Berdasarkan kerangka kerja pada gambar 5, suspensi *Streptococcus mutans* 0,5% Mc Farland yang telah dibuat ditanam pada media *Mueller Hinton Agar* secara merata. Cakram disk dari masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun legundi, kontrol dan antibiotik Kloramfenikol ditempelkan pada media *Mueller Hinton Agar* pada sisi yang berbeda-beda antara cakram satu dan lainnya. Kemudian diinkubasi di dalam incubator 5% CO₂ pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang diperoleh dikategorikan berdasarkan aktivitas antibakterinya yaitu lemah, sedang, kuat dan sangat kuat.

2. Prosedur kerja

- a. Pembuatan ekstrak etanol daun legundi dengan metode maserasi.
 - 1) Daun legundi dipetik dari tangkai ketiga sampai ketujuh sebanyak 1 kg daun dan daun yang dipetik tidak berlubang.
 - 2) Selanjutnya daun dibersihkan dari kotoran dengan dicuci di aliran air, lalu dibilas dan ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.
 - 3) Kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sampai daun menjadi kering.
 - 4) Daun yang sudah berbentuk simplisia (kering) disortasi. Tujuannya untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotoran-pengotoran lain yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering.
 - 5) Simplisia tersebut kemudian dihaluskan dengan blender, kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk halus.

- 6) Ditimbang sebanyak 100 g serbuk daun legundi, kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass*.
 - 7) Ditambahkan etanol 96% sebanyak 500 ml atau hingga daun legundi terendam sempurna dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil, didiamkan selama tiga hari terlindungi dari cahaya matahari sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 8 jam setiap harinya
 - 8) Setelah tiga hari, kemudian disaring menggunakan kertas saring dan filtrat ditampung ke dalam botol kaca bersih, selanjutnya residu kembali dimaserasi dengan 500 ml etanol. Ditutup dengan rapat dan dibiarkan selama 3 hari terlindungi dari cahaya matahari sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 8 jam setiap harinya.
 - 9) Sesudah 3 hari kemudian disaring menggunakan kertas saring, filtrat ditampung ke dalam botol kaca yang bersih dan ditutup rapat.
 - 10) Dilakukan remaserasi hingga warna filtrat bening atau hingga kandungan semua zat telah habis dimaserasi.
 - 11) Ditampung filtrat dari masing-masing maserasi ke dalam labu penampung pada alat evaporator.
 - 12) Setelah itu dimasukkan ke dalam alat evaporator.
 - 13) Dilakukan proses evaporasi secara *automatic* dengan diuapkan menggunakan alat evaporator (suhu 40-60⁰C) sampai didapatkan ekstrak kental.
 - 14) Hasil ekstraksi daun legundi yang dihasilkan ditampung dalam tabung vial yang telah disiapkan dan kemudian ditimbang berat bersih ekstrak
- b. Pembuatan ekstrak daun legundi konsentrasi 30%, 50%, 70%, dan 90%
- 1) Rumus pengenceran yang digunakan yaitu sebagai berikut :

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

Keterangan rumus :

% : variasi konsentrasi dalam satuan persen

b : masa ekstrak etanol daun legundi (100%)

v : volume pelarut/pengencer (etanol 96%)

2) Jumlah ekstrak daun legundi konsentrasi 100% yang diperlukan untuk masing-masing konsentrasi adalah sebagai berikut :

a) Konsentrasi 90% dibuat dengan menimbang 0,9 g ekstrak daun legundi konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas 1 ml pada tabung eppendorf

b) Konsentrasi 70% dibuat dengan menimbang 0,7 g ekstrak daun legundi konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas 1 ml pada tabung eppendorf

c) Konsentrasi 50% dibuat dengan menimbang 0,5 g ekstrak daun legundi konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas 1 ml pada tabung eppendorf.

d) Konsentrasi 30% dibuat dengan menimbang 0,3 g ekstrak daun legundi konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas 1 ml pada tabung eppendorf.

3) Masing-masing seri konsentrasi dihomogenkan hingga ekstrak daun legundi tersebut larut.

c. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

- 1) Ditimbang sebanyak 3,8 g media MHA, kemudian dimasukkan kedalam Erlenmeyer dan ditambahkan sebanyak 100 ml Aquades (etiket media 38,0 g medium disuspensikan ke dalam 1 L aquades).
- 2) Media dipanaskan di atas hotplate sambil diaduk sampai serbuk benar-benar larut dan tercampur dengan sempurna.
- 3) Media yang sudah larut dan tercampur sempurna disterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan satu sampai 2 atm.
- 4) Setelah proses sterilisasi, media tersebut dikeluarkan dari autoklaf dan ditunggu hingga dingin \pm suhu 40- 45 °C.
- 5) Dituangkan ke dalam cawan petri (*Plate*) masing-masing plate sebanyak sebanyak 15 ml.

d. Pembuatan suspensi *Streptococcus mutans* 0,5 Mc Farlland

- 1) Diambil satu sampai tiga ose koloni *Streptococcus mutans* dari biakan murni dan disuspensikan kedalam tabung yang berisi 5 ml larutan Natrium Klorida fisiologis 0,9%.
- 2) Suspensi ini dibandingkan dengan kekeruhan standar 0,5 Mc Farlland menggunakan alat Mc Farlland densitometer.

e. Tahap pemeriksaan

- 1) Disiapkan cakram disk kosong dan diteteskan 20 μ l masing-masing konsentrasi ekstrak daun legundi hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram disk.
- 2) Digunakan cakram disk yang direndam ke dalam 20 μ l etanol 96% sebagai kontrol dan cakram disk kloramfenikol sebagai kontrol kerja.

- 3) Disiapkan suspensi *Streptococcus mutans* dengan kepekatan 0,5 Mc Farlland.
- 4) Disiapkan swab kapas steril dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah suspensi bakteri meresap, swab kapas steril diangkat dan diperas dengan cara menekankan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputas-putar.
- 5) Swab kapas yang telah dicelupkan digores-goreskan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan gores-goresan yang dilakukan secara merata.
- 6) Didiamkan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) selama 5 sampai 15 menit untuk memberikan waktu bagi bakteri menempel pada media.
- 7) Masing-masing cakram disk yang telah jenuh dengan konsentrasi ekstrak daun legundi dan kontrol yang berisi aquades kemudian ditempelkan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang sudah digoreskan suspensi bakteri sesuai dengan rancangan yang telah dibuat.
- 8) Cakram disk ditempelkan dan sedikit ditekan-tekan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah digoreskan suspensi bakteri tersebut.
- 9) Jarak antara cakram satu dengan cakram yang lain minimal 15 mm dan cakram yang telah ditempelkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan atau digeser.
- 10) Media yang telah ditanami cakram disk diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam dengan posisi terbalik.

f. Pelaporan hasil

- 1) Setelah inkubasi selama 24 jam dilihat zona hambat yang terbentuk dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong (satuan milimeter)

- 2) Diameter zona hambat yang diukur yaitu daerah jernih sekitar cakram disk (daerah yang tidak ada pertumbuhan bakteri) diukur dari ujung satu keujung yang lain melalui tengah-tengah cakram disk.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data primer merupakan data yang diperoleh melalui pengamatan langsung yang dilakukan oleh peneliti (Sugiyono, 2012). Data dari penelitian ini berupa diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun legundi dan kontrol yang diperoleh dari pengukuran di laboratorium.

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang digunakan adalah melalui pemeriksaan laboratorium dengan melakukan pengukuran diameter zona hambat menggunakan alat ukur penggaris. Pengukuran dilakukan pada diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun legundi dengan metode *Kirby-Bauer*. Hasil pengukuran diameter zona hambat dari masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun legundi yang menunjukkan aktivitas penghambatan dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun

Legundi *secara in vitro* yang dinyatakan dalam satuan mm (millimeter) diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating data yaitu data yang disajikan dalam bentuk tabel dan naratif.

2. Analisis data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan uji statistik dengan bantuan perangkat lunak komputer, dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Uji *Kolmogorof Smirnov*, uji ini digunakan untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak.
- b. Uji *One Way Anova*, uji ini digunakan apabila data berdistribusi normal, untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*, antara konsentrasi 30%, 50%, 70% dan 90%.
- c. Uji *Least Significant Deference (LSD)*, merupakan uji lanjutan dari *one way anova* yang digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*.
- d. Uji *Kruskal Wallis*, uji ini digunakan apabila data berdistribusi tidak normal, untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*, antara konsentrasi 30%, 50%, 70%, dan 90%.
- e. Uji *Mann Whitney*, merupakan uji lanjutan dari uji *Kruskal wallis* yang digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*.