

BAB IV
METODELOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen murni (*true experiment*) dengan rancangan penelitian *Completely Randomized Design Nonfactorial* (Rancangan Acak Lengkap Nonfaktorial). Di dalam desain *true experimental*, peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen (Sugiyono, 2017). Rancangan ini digunakan untuk kondisi lingkungan, alat, bahan, dan media yang homogen. Kondisi ini hanya dicapai di ruang-ruang terkontrol seperti di laboratorium dan rumah kaca (Hanafiah, 2016). Bentuk rancangan ini berupa suatu ulangan yang dapat dilihat sebagai berikut :

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

Gambar 5. Bentuk Rancangan Acak Lengkap

Keterangan : ¹A3

- ¹ : Nomor unit analisis
- A : Tanda perlakuan
- 3 : Nomor pengulangan
- A : Kontrol
- B : Ekstrak daun secang 20%
- C : Ekstrak daun secang 40%
- D : Ekstrak daun secang 60%
- E : Ekstrak daun secang 80%

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

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

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai bulan Juni 2018.

C. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak daun secang (*Caesalpinia sappan* L) yang sudah dimaserasi. Daun secang diperoleh dari daun secang dengan kriteria inklusi daun secang segar berwarna hijau, berumur muda sampai sedang yang tumbuh dari tangkai ketiga sampai kelima dari pucuk dan tidak berlubang. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu daun secang yang tidak segar, layu, berwarna kuning kecoklatan, dan berlubang yang tidak sesuai dengan kriteria yang ditentukan peneliti. Ekstrak didapatkan dari tanaman secang yang diambil bagian daunnya pada tangkai ke tiga sampai ke lima. Sampel kemudian diekstraksi secara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Hasil ekstraksi tersebut digunakan sebagai stok sampel dengan konsentrasi 100%.

2. Besar sampel penelitian

Pada penelitian ini sampel diuji pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% yang dibuat dengan mengencerkan stok sampel menggunakan pelarut etanol. Sebagai kontrol negatif digunakan etanol, sehingga jumlah total perlakuan dalam penelitian adalah lima perlakuan. Pada masing-masing perlakuan tersebut

dilakukan pengulangan. Pengulangan masing-masing seri konsentrasi dalam penelitian ini dapat ditentukan dengan persamaan berikut :

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

Keterangan :

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75 = 5$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka pengulangan yang dilakukan adalah minimal sebanyak lima kali. Namun dalam penelitian ini peneliti akan melakukan pengulangan sebanyak enam kali terhadap setiap perlakuan, dengan demikian diperoleh 30 besar sampel atau unit analisis. Menurut Hanafiah (2008), jumlah minimal pengulangan untuk percobaan laboratorium adalah cukup tiga kali pengulangan, dengan demikian maka pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sudah memenuhi syarat.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Tempayan (1 buah), mortar dan pestel (1 buah), neraca analitik (Radwag)

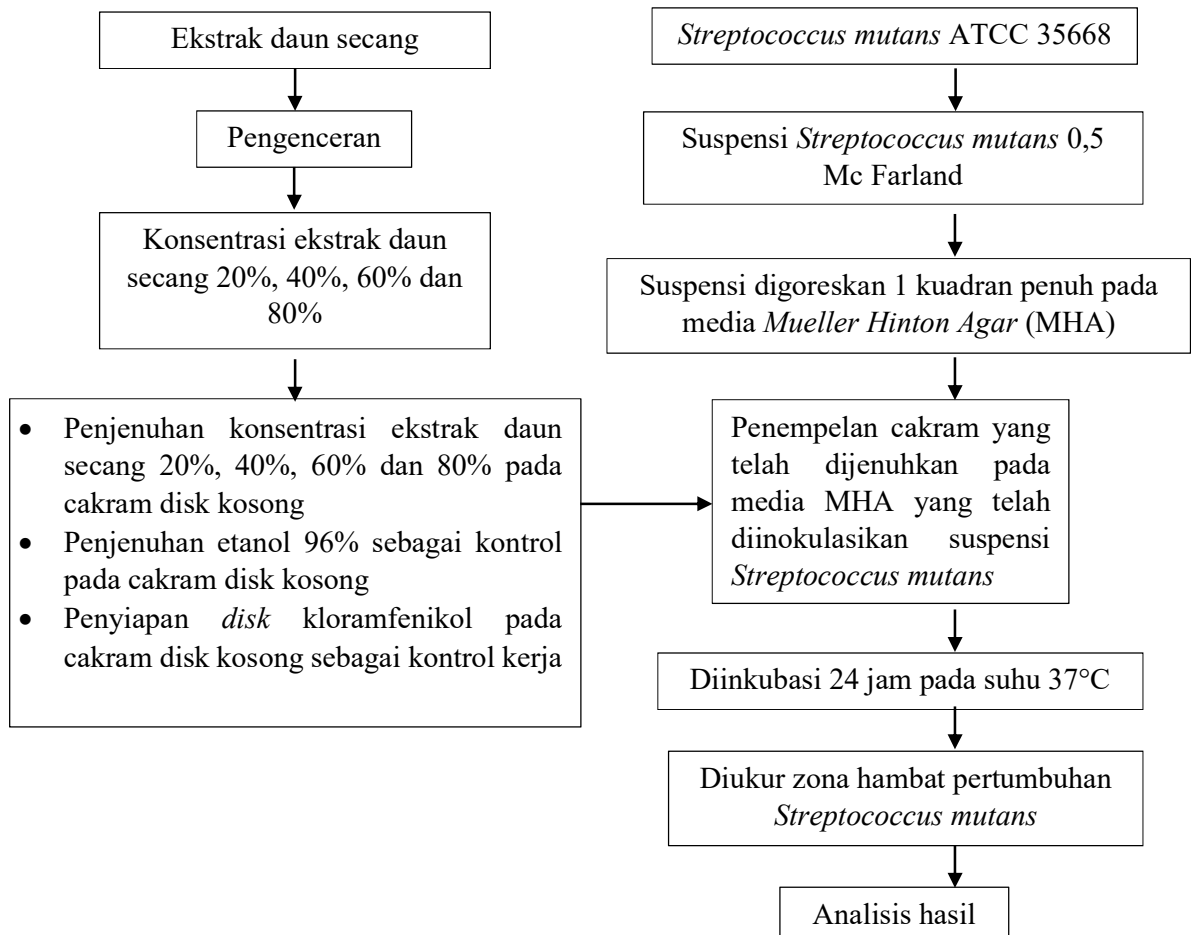
(1 buah), pipet ukur (Iwaki-Pyrex®) 1 ml dan 10 ml (1 buah), mikropipet 20µl – 1000 µl (socorex) dan tip (20 buah), ball pipet (1 buah), gelas ukur (Iwaki-Pyrex®) 100ml (1 buah), evaporator (IKA®RV 10 basic) (1buah), beaker glass (Iwaki-Pyrex®) 50 ml dan 500ml (1 buah), lampu spritus (1 buah), Petridisk steril (14 buah), biosafety cabinet (Biobase), Mc Farland densitometer (Biosan) (1 buah), Inkubator CO₂ (Esco) (1 buah), dan autoclave (Tomy Sx- 500).

2. Bahan

Daun secang, aquadest steril 1000 ml, bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 35668, media pertumbuhan *Muller Hinton Agar*, standar *Mac Farland 0,5%*, NaCl Fisiologis 0,9%, Cakram kosong (110 buah), cakram antibiotik kloramfenikol 30µg (10 buah), lidi kapas steril (2 buah), etanol 96%, tabung eppendorf, dan aluminium foil.

E. Kerangka Kerja dan Prosedur Kerja

1. Kerangka kerja



Gambar 6. Kerangka Kerja

2. Prosedur kerja

a. Persiapan sampel

- 1) Pembuatan simplisia dan ekstrak daun secang dengan metode maserasi
 - a) Daun secang dipetik dari tangkai tiga sampai kelima secukupnya sesuai dengan kebutuhan. Daun yang sudah dipetik kemudian dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci pada air mengalir.
 - b) Dilakukan proses sortasi basah, yaitu pemilihan daun berdasarkan kriteria yang digunakan dalam penelitian.
 - c) Daun secang ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.
 - d) Daun secang dipotong-potong menjadi bagian yang lebih kecil dan ditimbang terlebih dahulu menggunakan neraca analitik.
 - e) Daun secang dikeringkan dengan cara diangin-anginkan menggunakan kipas angin.
 - f) Dilakukan proses sortasi pada bahan yang sudah kering.
 - g) Simplisia diserbukkan terlebih dahulu (dihancurkan dengan diblender) kemudian ditimbang kembali.
 - h) Serbuk hasil blender diayak untuk memperoleh simplisia yang lebih halus dan mudah untuk dilarutkan.
 - i) Serbuk simplisia hasil ayakan kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker dan ditimbang menggunakan neraca analitik sebanyak 100 gram, kemudian dituangi dengan pelarut etanol 96% sampai simplisia terendam (± 700 ml). Ditungkup rapat dan dibiarkan selama 3 hari sambil dibantu pengadukan dengan *magnetic stirrer* selama 8 jam setiap harinya.
 - j) Sesudah 3 hari, hasil maserasi kemudian disaring, filtrat ditampung ke dalam

wadah (botol kaca) selanjutnya residu kembali dimaserasi dengan 500 ml etanol.

k) Semua filtrat digabung dan diuapkan menggunakan evaporator (suhu 40-60°C) sampai didapatkan ekstrak kental.

l) Ekstrak kental yang diperoleh kemudian ditimbang.

2) Pembuatan berbagai konsentrasi ekstrak daun secang

a) Konsentrasi ekstrak daun secang yang digunakan adalah 20%, 40%, 60% dan 80%. Masing-masing konsentrasi tersebut dibuat dengan cara penimbangan dan pengenceran ekstrak daun secang pekat (100%) dengan pelarut etanol. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak dibuat dalam tabung eppendorf dengan volume total 1 ml.

b) Pengenceran dilakukan dengan pembuatan variasi konsentrasi ekstrak daun secang menggunakan presentase perbandingan konsentrasi %b/v melalui rumus berikut :

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

Keterangan :

% : variasi konsentrasi dalam satuan persen

b : massa ekstrak daun secang (100%)

v : volume pengenceran

c) Perbandingan masing-masing konsentrasi dari ekstrak pekat (gram) dengan pelarut etanol 96% (ml) adalah sebagai berikut :

Adapun jumlah ekstrak daun secang konsentrasi 100% yang diperlukan untuk masing-masing konsentrasi adalah:

1. Konsentrasi 80% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,8 g ekstrak daun secang konsentrasi 100% dengan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
 2. Konsentrasi 60% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,6 g ekstrak daun secang konsentrasi 100% dengan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
 3. Konsentrasi 40% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,4 g ekstrak daun secang konsentrasi 100% dengan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
 4. Konsentrasi 20% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,2 g ekstrak daun secang konsentrasi 100% etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
- d) Campuran pada masing-masing konsentrasi dihomogenkan dan disimpan pada tabung eppendorf.
- 3). Prosedur pembuatan media uji sensitivitas MHA (*Mueller Hinton Agar*)
- a) Bubuk media *Mueller Hinton Agar* ditimbang sebanyak 3,4 g menggunakan neraca analitik.
 - b) Setelah proses penimbangan, bubuk media dipindahkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 100 ml akuades.
 - c) Media dipanaskan dengan hotplate dan diaduk hingga homogen.
 - d) Setelah bubuk media larut sempurna dan homogen, diukur pH media dengan menggunakan pH stick (pH optimal $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C).
 - e) Erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan aluminium foil.
 - f) Media disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dihitung dari tercapainya suhu 121°C .
 - g) Media yang telah disterilisasi, didiamkan sampai suhu media turun menjadi $\pm 40 - 50^{\circ}\text{C}$.

- h) Media dituangkan secara aseptis ke dalam *petridisk* ±15 ml, kemudian didiamkan hingga memadat.
 - i) Setelah media memadat, cawan petrik dibalik, dan apabila tidak langsung digunakan media yang sudah dituangkan pada cawan petri atau sisa media dalam tabung Erlenmeyer dapat dibungkus dengan kertas buram dan disimpan didalam *refrigerator*.
- 4). Proses penjuenan berbagai konsentrasi ekstrak daun secang dan kontrol negatif kedalam cakram kosong
- a) Cakram kosong yang berukuran 6 mm disiapkan. Masing-masing cakram direndam ke dalam masing-masing konsentrasi ekstrak daun secang hingga cairan meresap sempurna.
 - b) Untuk kontrol digunakan cakram kosong yang direndam kedalam etanol.
- 5). Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*
- a) Koloni bakteri *Streptococcus mutans* dari biakan murni diambil beberapa ose dan disuspensikan kedalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl Fisiologis 0,9% steril sampai memperoleh konsentrasi 0,5 *Mc Farland*.
 - b) Kekeruhan suspense bakteri dibaca dengan menggunakan *Mc Farland* densitometer, dimana 0,5% *Mc Farland* setara dengan $1,5 \times 10^8$ (*Coloni Forming Unit*) CFU/ml.
- b. Tahap Pemeriksaan
- 1) Lidi kapas steril disiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri 0,5 % *Mc Farland Streptococcus mutans*. Dibiarkan sebentar agar suspense meresap kedalam kapas kemudian lidi kapas diangkat dan diperas dengan menekankan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar.

- 2) Lidi kapas yang sudah berisikan suspensi bakteri 0,5% *Mc Farland Streptococcus mutans* tersebut digoreskan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) hingga tersebar merata pada seluruh permukaan media, kemudian media ditutup kembali.
- 3) Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah diinokulasikan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* didiamkan selama 5 sampai 15 menit agar suspensi bakteri meresap kedalam agar.
- 4) Setelah permukaan media kering, masing-masing konsentrasi ekstrak daun secang yang dibuat dalam konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan sudah dijenuhkan ke dalam cakram ditempelkan pada permukaan media MHA dan sedikit ditekan dengan pinset sampai cakram melekat sempurna pada permukaan media. Kontrol juga diletakkan pada bagian tersebut.
- 5) Sebagai kontrol kerja digunakan *disk* yang mengandung antibiotik kloramfenikol ditempelkan pada media MHA.
- 6) Jarak antara cakram satu dengan yang lainnya diletakkan dengan jarak ± 15 mm dan cakram yang sudah ditempelkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan ataupun digeser.
- 7) Media yang telah ditempelkan antibiotik diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan posisi *petridisk* terbalik untuk media yang diinokulasikan bakteri *Streptococcus mutans*.

c. Pelaporan Hasil

Dilihat dan diukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang terjadi dalam media *Mueller Hinton Agar* (MHA) menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat yang diukur merupakan

daerah bening pada cakram (tidak ada pertumbuhan bakteri) diukur dari sisi yang satu ke sisi yang lain melalui tengah-tengah cakram.

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, 2017). Data dari penelitian ini berupa diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* pada berbagai konsentrasi ekstrak daun secang yang diperoleh dari pengukuran di laboratorium.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan dengan pengukuran di laboratorium terhadap zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* pada berbagai konsentrasi ekstrak daun secang, kemudian dilakukan pengukuran dengan jangka sorong.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun secang 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 digunakan uji *kolmogorov smirnov*.
- b) Untuk mengetahui variasi zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan menggunakan ekstrak daun secang antara konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80% apabila data berdistribusi normal digunakan uji *one way anova*.
- c) Untuk mengetahui variasi zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan menggunakan ekstrak daun secang antara konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80% apabila data berdistribusi tidak normal digunakan uji *kruskal wallis*.
- d) Untuk mengetahui variasi zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*, uji statistik yang digunakan adalah LSD (*Least Significant Deference*).