

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris murni secara *in vitro*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta Ngadinegaran MJ III/62 Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada tanggal 18 Juni – 24 Juli 2013.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Bahan Uji

Daun kersen (*Muntingia calabura L.*) yang diperoleh dikawasan kampus Universitas Gadjah Mada. Identifikasi dan determinasi tanaman kersen (*Muntingia calabura L.*) dilakukan di bagian Taksonomi Tumbuhan Fakultas Ilmu Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dengan metode maserasi dibuat di bagian

2. Bakteri Uji

Bakteri *Streptococcus mutans* yang digunakan sebagai subyek penelitian diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta Ngadinegaran MJ III/62 Yogyakarta.

Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan untuk penelitian tahap 1 berjumlah 22 terdiri dari 6 kelompok yaitu 4 kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun kersen (1%, 4%, 7% dan 10%), kelompok kontrol negatif (aquades steril) dan kontrol positif (antibiotik *amoksisilin*) sedangkan besar sampel yang digunakan untuk penelitian tahap 2 berjumlah 35 terdiri dari 7 kelompok yaitu 5 kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun kersen (0,5%, 5%, 10%, 15% dan 20%), kelompok kontrol negatif (aquades steril) dan kelompok kontrol positif (antibiotik *amoksisilin*). Setiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali yang dihitung menggunakan rumus federer. Rumus Federer = $(n-1)(t-1) \geq 15$ dengan t adalah jumlah kelompok perlakuan dan n adalah jumlah ulangan

$$n \geq \frac{21}{6}$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka jumlah pengulangan minimal tiap kelompok perlakuan adalah 4 kali pengulangan. Kemudian dari hasil tersebut ditambah dengan *drop out* 10% sehingga jumlah pengulangan tiap kelompok perlakuan yang diperlukan adalah 5 kali pengulangan (Tanjong, 2011).

Jumlah besar sampel dalam penelitian tahap 2 ada 35 sampel, terbagi menjadi 7 kelompok yaitu kelompok perlakuan yang berjumlah 5 konsentrasi dan lubang sumuran dalam satu cawan petri, kelompok kontrol positif dan negatif dua lubang sumuran dalam satu cawan petri. Setiap cawan petri diulang sebanyak lima kali sehingga dibutuhkan 10 cawan petri.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.)

2. Variabel Terpengaruh

Bakteri *Streptococcus mutans*

3. Variabel Terkendali

a. Suhu inkubasi 37°C

b. Waktu inkubasi 24 jam

- c. Konsentrasi bakteri suspensi 10^6 CFU/ml (standar Brown III)
- d. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 0,5%, 5%, 10%, 15% dan 20%
- e. Media pertumbuhan bakteri *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- f. Tumbuhan daun kersen (*Muntingia calabura* L.) diambil dari satu pohon

E. Definisi Operasional

1. *Muntingia calabura* L. adalah tanaman berbunga yang dapat berkembang dengan cepat serta menghasilkan buah yang banyak.
2. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah sediaan kental yang diperoleh dengan cara mengekstraksi daun kersen (*Muntingia calabura* L.) menggunakan metode maserasi dengan pelarut ethanol. Sebanyak 20 μ l ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) diteteskan pada lubang sumuran.
3. *Aquades* adalah larutan yang digunakan untuk mengencerkan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang akan dibagi menjadi 5 konsentrasi yaitu 0,5%, 5%, 10%, 15% dan 20%. *Aquades* digunakan sebagai kontrol negatif di penelitian ini.
4. *Streptococcus mutans* adalah bakteri gram positif, biasanya terdapat berpasangan dan dalam rantai, bersifat nonmotil (tidak bergerak), tidak berkapsul, tidak berspora, bakteri anaerob fakultatif dan di temukan pada

plak gigi. Bakteri tersebut diperoleh dari biakan yang tersedia di Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Yogyakarta.

5. Daya antibakteri adalah kemampuan suatu zat atau senyawa kimia yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau mematikan bakteri.
6. Pertumbuhan adalah peningkatan jumlah semua komponen dari suatu organisme secara teratur.
7. Metode difusi adalah suatu cara uji kepekaan bakteri yang menggunakan pembenihan padat yang diusapi dengan biakan bakteri.
8. Zona radikal adalah daerah sekitar lubang sumuran dimana sama sekali tidak ditemukan pertumbuhan bakteri yang diukur dari lubang sumuran ke bagian terluar yang tidak ditumbuhi bakteri.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat penelitian

Cawan petri, inkubator, ose steril, kapas lidi steril, lampu spiritus, alat pelubang media, maserator, alat pengaduk kaca, kertas saring, rotary evaporator, jangka sorong, autoklaf, vortex mixer, pipet ukur, mikropipet, pinset, rak dan tabung reaksi, oven, gelas ukur, erlenmeyer, timbangan, corong buchner, wajan sterilis, kompor, aluminium foil dan kertas label.

2. Bahan Penelitian

Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.), bakteri

Streptococcus mutans, media Muller Hinton Agar (MHA), media cair

Brain Heart Infusion (BHI), aquades steril, antibiotik *amoksisilin*, *handscoon* dan masker, pelarut ethanol 70%.

G. Cara Pengumpulan Data

1. Persiapan

Sebelum melakukan penelitian alat-alat yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dibawah air mengalir, lalu dikeringkan. Setelah itu, alat-alat tersebut disterilkan dengan menggunakan autoklaf. Kemudian alat yang sudah disterilkan disiapkan bersama bahan yang akan digunakan untuk penelitian ditempat yang mudah dijangkau.

2. Pembuatan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.)

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang masih segar dicuci sampai bersih dibawah air mengalir kemudian ditiriskan dan diproses menjadi simplisia. Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dikeringkan dalam oven dengan suhu 50-60°C selama 24 jam. Daun kersen dibuat serbuk menggunakan mesin penyerbuk, setelah itu serbuk daun kersen dimasukkan ke dalam maserator kemudian ditambahkan pelarut ethanol 70% sampai seluruh serbuk terendam dan didiamkan selama 24 jam sambil terus diaduk. Selanjutnya, untuk memisahkan antara maserat dan ampas, supernatan yang pertama disaring menggunakan kapas kemudian kertas saring. Maserat ditampung dan dilakukan maserasi ulang sebanyak 3 kali. Setelah itu diekstraksi dalam rasio 1:20 (berat/volume) selama 24 jam menggunakan metode maserasi dingin. Maserat yang diperoleh dipekatkan menggunakan

ekstrak kental. Ekstrak tersebut dituang kedalam cawan penguap yang telah ditara, lalu di uapkan diatas penangas air. Hasil akhirnya berupa ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 100%. Kemudian dilakukan pengenceran dengan menggunakan aquades untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yaitu 1%, 4%, 7%, dan 10% untuk penelitian tahap 1, sedangkan konsentrasi 0,5%, 5%, 10%, 15% dan 20 % untuk penelitian tahap 2.

3. Uji kepekaan bakteri

a. Penelitian tahap 1

Penelitian tahap 1 bertujuan untuk mencari konsentrasi minimal dari konsentrasi 1%, 4%, 7%, dan 10% terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Persiapan yang dilakukan dimulai dari inkubasi bakteri *Streptococcus mutans* pada suhu 37°C selama 24 jam setelah diinjeksikan kaldu nutrisi. MHA sebagai media pertumbuhan bakteri, disterilisasikan dalam labu dan didinginkan sampai 40-50°C, lalu dituangkan sebanyak 15 mL dalam cawan petri steril (diameter 6 cm) dan dibiarkan mengeras dalam suhu ruangan. Selanjutnya masukkan 0,1 mL kultur bakteri (10^6 CFU per mL) ke medium cawan petri dengan menggunakan kapas lidi steril dan dioleskan pada permukaan MHA secara merata. Pindahan bakteri dari satu tempat ke tempat yang lain dilakukan dekat dengan lampu spirtus agar meminimalkan media bakteri terkontaminasi bakteri lain (Kartikasari, *et al.*, 2008). Cawan petri yang berisi MHA dibuat lubang sumuran menggunakan alat pelubang media. Terdapat dua cawan petri yang telah dipersiapkan

cawan petri pertama berisi ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dengan konsentrasi 1%, 4%, 7% dan 10%. (penelitian tahap 1) sebagai perlakuan dan cawan petri kedua berisi aquades steril sebagai kontrol negatif dan antibiotik *amoksisilin* sebagai kontrol positif. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dengan konsentrasi 1%, 4%, 7%, dan 10% diteteskan ke masing-masing lubang sumuran pada cawan petri pertama tempat media pertumbuhan bakteri sebanyak 50 µl per lubang sumuran, cawan petri kedua ditetesi 50 µl aquades sebagai kontrol negatif dan 50 µl antibiotik *amoksisilin* sebagai kontrol positif. Cawan yang diisi dengan ekstrak, diposisikan pada medium agar padat dengan sedikit penekanan. Cawan petri ditempatkan di inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan setelah itu akan terbentuk zona hambat dengan ukuran mm. Zona hambat yang terbentuk akan dibandingkan dengan aquades sebagai kontrol negatif dan antibiotik *amoksisilin* sebagai kontrol positif.

b. Penelitian tahap 2

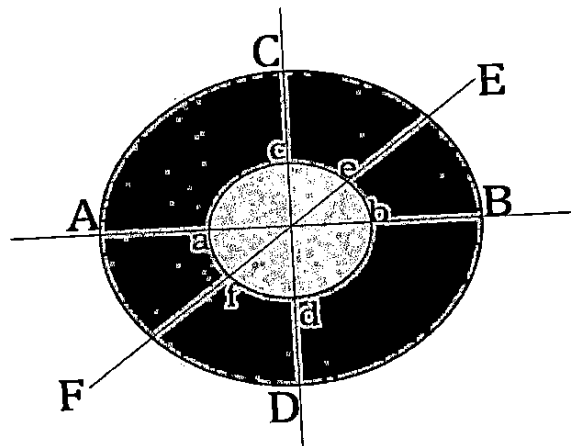
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya daya antibakteri serta menentukan konsentrasi optimal dari konsentrasi 0,5%, 5%, 10%, 15% dan 20%. Inkubasi bakteri *Streptococcus mutans* terlebih dahulu pada suhu 37°C selama 24 jam setelah diinjeksikan kaldu nutrisi. Siapkan MHA sebagai media pertumbuhan bakteri, disterilisasikan dalam labu dan didinginkan sampai 40-50°C, lalu dituangkan sebanyak

dalam suhu ruangan. Selanjutnya masukkan 0,1 mL kultur bakteri (10^6 CFU per mL) ke medium cawan petri dengan menggunakan kapas lidi steril dan dioleskan pada permukaan MHA secara merata. Pindahkan bakteri dari satu tempat ke tempat yang lain dilakukan dekat dengan lampu spirtus agar meminimalkan media bakteri terkontaminasi bakteri lain (Kartikasari, *et al.*, 2008). Cawan petri yang berisi MHA dibuat lubang sumuran menggunakan alat pelubang media. Terdapat dua cawan petri yang telah dipersiapkan, cawan petri pertama berisi ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 0,5%, 5%, 10%, 15% dan 20% (penelitian tahap 2) sebagai perlakuan dan cawan petri kedua berisi aquades steril sebagai kontrol negatif dan antibiotik *amoksisilin* sebagai kontrol positif. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 0.5%, 5%, 10%, 15% dan 20% diteteskan ke masing-masing lubang sumuran pada cawan petri pertama tempat media pertumbuhan bakteri sebanyak 50 μ l per lubang sumuran, cawan petri kedua ditetesi 50 μ l aquades sebagai kontrol negatif dan 50 μ l antibiotik *amoksisilin* sebagai kontrol positif. Cawan petri ditempatkan di inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan setelah itu akan terbentuk zona hambat dengan ukuran mm. Zona hambat yang terbentuk akan dibandingkan dengan aquades sebagai kontrol negatif dan antibiotik *amoksisilin* sebagai kontrol positif

4. Pembacaan hasil

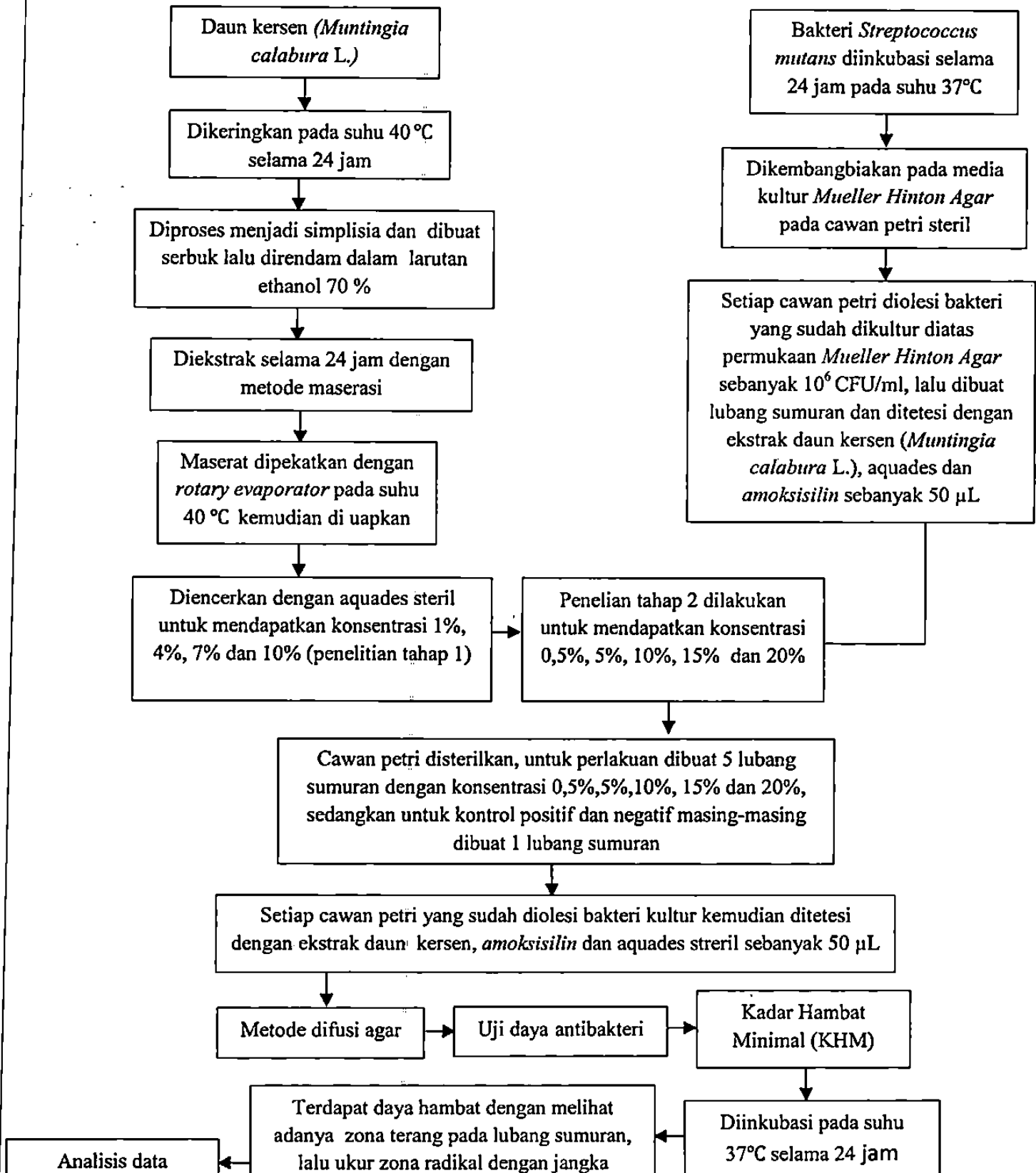
Zona radikal diukur dengan menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,02 mm. Tiap sumuran dalam cawan petri dilakukan pengulangan pengukuran sebanyak 3 kali dan hasilnya merupakan angka rata-rata dari pengulangan tersebut. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan data yang reliable.

Cara pengukuran zona radikal yaitu dengan mengambil 3 garis yang melalui titik pusat lubang sumuran. Pada Pengukuran pertama menggunakan diameter daerah hambat (A-B) dikurangi diameter lubang sumuran (a-b) kemudian hasilnya dibagi 2. Pengukuran kedua menggunakan diameter daerah hambat (C-D) dikurangi diameter lubang sumuran (c-d) hasilnya dibagi 2. Pengukuran ketiga menggunakan diameter daerah hambat (E-F) dikurangi diameter lubang sumuran (e-f) hasilnya dibagi 2. Data pengukuran pertama, kedua, dan ketiga diambil rata-ratanya, maka akan diperoleh data zona radikal (Kartikasari, *et al.*, 2008).



Gambar 4. Pengukuran Zona Radikal

H. Alur Penelitian



I. Analisis Data

Metode analisis statistik yang digunakan adalah

1. Uji normalitas dan uji variansi data.
2. Uji parametrik *one way* ANOVA, untuk mengetahui ada atau tidak efek dari ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.
3. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference (LSD)*