

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Penelitian eksperimental bertujuan untuk menentukan hubungan sebab akibat antara dua fenomena dengan karakteristik utama yaitu peneliti mengontrol variabel bebas (Ratminingsih, 2010). Dalam penelitian ini, digunakan pendekatan secara kualitatif dan kuantitatif. Penelitian ini meliputi persiapan alat dan bahan, ekstraksi, analisis GC-MS, persiapan biakan bakteri *Streptococcus mutans*, *Disc Diffusion Assay* (DDA), pengukuran nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC). Dalam penelitian ini, parameter yang diamati yaitu diameter zona hambat pada uji *Disc Diffusion Assay* (DDA), kekeruhan suspensi pada uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan koloni yang tumbuh pada *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) yang kemudian dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif.

#### 3.2 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan enam perlakuan. Rancangan Acak Lengkap (RAL) digunakan karena penelitian dilakukan di laboratorium yang memiliki kondisi lingkungan relatif homogen. Rancangan ini dikatakan acak karena setiap satuan percobaan mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan sedangkan dikatakan lengkap karena seluruh perlakuan yang dirancang dalam percobaan tersebut digunakan (Lentner & Bishop, 1986). Banyaknya ulangan pada penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus Federer sebagai berikut.

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

Keterangan :

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

Pada penelitian ini, digunakan konsentrasi 82,5%, 85%, 87,5%, dan 90% ekstrak daun kecombrang (*Etlintera elatior*). Kemudian, digunakan juga antibiotik *clindamycin* 35 µg/ml (Poornachitra *et al.*, 2021) sebagai kontrol positif dan DMSO 15% (Brito *et al.*, 2017) sebagai kontrol negatif, sehingga jumlah total perlakuan adalah enam. Berdasarkan hal tersebut, maka perhitungan banyaknya ulangan dari setiap perlakuan berdasarkan rumus Federer pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

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

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas menggunakan rumus Federer, maka pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah minimal sebanyak empat kali. Menurut Hanafiah (2008), jumlah minimal pengulangan untuk penelitian eksperimental di laboratorium adalah cukup tiga kali pengulangan. Oleh karena itu, pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sudah memenuhi syarat.

### 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* dan sampel pada penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang diberi perlakuan ekstrak daun kecombrang dengan konsentrasi 82,5%, 85%, 87,5%, dan 90%. Konsentrasi ekstrak daun kecombrang (*Etlintera elatior*) yang digunakan pada penelitian ini merujuk pada penelitian Silalahi (2017) dimana pada ekstrak daun kecombrang dengan konsentrasi 80% sudah menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Ekstrak dibuat dengan mengencerkan menggunakan pelarut DMSO 15% dan pelarut ini juga digunakan sebagai kontrol negatif. Menurut Brito *et al.* (2017) konsentrasi DMSO di bawah 80% masih aman digunakan sebagai pelarut untuk pengujian antibakteri. Oleh karena itu, DMSO

15% dapat digunakan sebagai pelarut karena tidak memiliki aktivitas antibakteri. Kemudian sebagai kontrol positif digunakan antibiotik *clindamycin* 35 µg/ml, sehingga jumlah total perlakuan dalam penelitian ini adalah enam perlakuan. Penggunaan antibiotik *clindamycin* 35 µg/ml sebagai kontrol positif merujuk pada penelitian Poornachitra *et al.* (2021) dan Al-Shami *et al.* (2019). Menurut Poornachitra *et al.* (2021), antibiotik *clindamycin* 30 mcg mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan dapat menjadi alternatif antibiotik untuk pasien yang alergi terhadap antibiotik golongan *Penicillin*. Al-shami *et al.* (2019) melaporkan bahwa antibiotik *clindamycin* sensitif terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

### 3.4 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI dan Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Bandung. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Februari hingga Juni 2023.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

Pada tahap persiapan, seluruh alat dan bahan dipersiapkan secara aseptik. Alat dibersihkan terlebih dahulu kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Bahan yang akan digunakan ditimbang sesuai dengan kebutuhan. Media yang digunakan pada tahap pelaksanaan uji *disc diffusion assay* (DDA) dan uji *minimum bactericidal concentration* (MBC) adalah media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Media yang digunakan pada uji *minimum inhibitory concentration* (MIC) adalah media *Mueller Hinton Broth* (MHB).

Biakan bakteri *Streptococcus mutans* diperoleh dari Laboratorium Bakteriologi Poltekkes Kemenkes Bandung. Sampel daun kecombrang (*Etlingera elatior*) diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko Balitro Lembang, Jawa Barat. Daun kecombrang (*Etlingera elatior*) yang digunakan adalah daun muda dengan ciri daun berwarna hijau muda, dengan asumsi bahwa daun muda memiliki kandungan senyawa metabolit yang lebih tinggi dibandingkan daun yang sudah tua (Rohiqi *et al.*, 2021). Tingkat ketuaan daun berpengaruh terhadap biosintesis metabolit sekunder pada daun, dimana seiring bertambahnya tingkat ketuaan daun,

biosintesis metabolit sekunder baru semakin menurun bahkan dapat terjadi penghentian sehingga kadarnya lebih rendah pada daun yang lebih tua (Fawole & Opara, 2013).

### 3.5.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kecombrang

Pembuatan simplisia daun kecombrang didasari oleh penelitian yang dilakukan oleh Faradina (2020). Daun kecombrang yang sudah diperoleh kemudian dilakukan sortasi basah untuk mendapatkan simplisia yang sesuai dengan standar. Hal-hal yang perlu diperhatikan saat sortasi basah yaitu kemurnian dan kebersihan sampel. Setelah dilakukan sortasi basah, daun kecombrang kemudian dibersihkan kembali dari kotoran dengan cara dicuci pada air mengalir selanjutnya ditiriskan untuk menghilangkan sisa air. Daun kecombrang yang sudah ditiriskan kemudian dicacah menjadi bagian yang lebih kecil lalu ditimbang menggunakan neraca analitik. Pengeringan dilakukan dengan cara dikering anginkan selama 14 hari pada suhu ruang. Setelah dilakukan pengeringan, dilakukan sortasi kering guna mendapatkan simplisia yang diharapkan. Hal-hal yang diperhatikan saat sortasi kering yaitu sampel tidak rusak karena berjamur dan tidak terkontaminasi oleh bahan lain. Selanjutnya, sampel daun kecombrang dihaluskan menggunakan blender kemudian disaring menggunakan saringan 100 *mesh* hingga didapatkan serbuk simplisia. Sampel daun kecombrang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.

Serbuk simplisia daun kecombrang yang telah didapatkan kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik sebanyak 250 gram dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 2000 ml, kemudian ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 1000 ml, sehingga didapatkan perbandingan antara sampel dengan pelarut yaitu 1:4. Ekstraksi dibiarkan selama tiga hari sambil dibantu pengadukan dengan *shaker* selama 8 jam setiap harinya dengan kecepatan 150 rpm. Setelah tiga hari, hasil maserasi kemudian disaring menggunakan *Whattman filter paper* no.2. Filtrat ditampung ke dalam gelas erlenmeyer 500 ml kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C sampai didapatkan ekstrak kental, setelah itu ekstrak kental ditimbang. Ekstrak daun kecombrang yang akan dipakai disimpan terlebih dahulu dalam lemari es dengan suhu 4°C. Penyediaan konsentrasi ekstrak

daun kecombrang (*Etlingera elatior*) dilakukan dengan cara melarutkan ekstrak kental daun kecombrang dengan pelarut DMSO 15 %.

Penyediaan konsentrasi ekstrak daun kecombrang menggunakan pengukuran persen berat-volume (%b/v) yaitu gram zat terlarut dalam mL larutan. Pada penelitian ini, konsentrasi 82,5% dibuat dengan melarutkan sebanyak 4,125 gr ekstrak kental yang dilarutkan hingga 5 mL DMSO 15%. Konsentrasi 85% dibuat dengan melarutkan sebanyak 4,25 gr ekstrak kental yang dilarutkan hingga 5 mL DMSO 15%. Konsentrasi 87,5% dibuat dengan melarutkan sebanyak 4,375 gr ekstrak kental yang dilarutkan hingga 5 mL DMSO 15%. Konsentrasi 90% dibuat dengan melarutkan sebanyak 4,5 gr ekstrak kental yang dilarutkan hingga 5 mL DMSO 15%.

### **3.5.3 Analisis Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS)**

Metode GC-MS merupakan metode dengan mekanisme penggabungan pemisahan sifat kromatografi gas-cair dengan fitur deteksi spektrometri massa untuk mengidentifikasi suatu zat dalam pengujian sampel. Pada prinsipnya, GC-MS hanya dapat memisahkan suatu campuran yang mudah menguap (*volatile*) dalam rentang suhu tertentu dalam instrument GC-MS. Analisis GC-MS menggunakan alat GC-MS menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat dilihat dari puncak kromatogram sebagai identifikasi data hasil kromatografi dan spektrometri massa (MS) dilihat dari spektrum massa dengan masing-masing berat molekul senyawa bioaktif (Hotmian *et al.*, 2021). Pada penelitian ini, analisis GC-MS dilakukan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Bandung.

Pada penelitian ini, analisis GC-MS dimulai dengan preparasi ekstrak daun kecombrang. Sebanyak 30 µL ekstrak daun kecombrang dicampurkan dengan 3000 µL methanol, sehingga didapatkan perbandingan ekstrak dengan pelarut yaitu 1:100. Kemudian, hasil campuran ekstrak daun kecombrang dan methanol disaring. Hasil penyaringan tersebut kemudian diambil sebanyak 10 µL dan dicampurkan dengan larutan MTC (*Methyl Chloride*). Analisis GC-MS dilakukan pada sistem Agilent 7890A yang dilengkapi dengan 5975C EI-MS sistem dan 7693 Autosampler (Agilent Technologies, CA, USA). Analisis GC-MS dilakukan selama

30 menit dengan suhu injeksi yang digunakan yaitu 250°C dan suhu oven yang digunakan yaitu dimulai dari suhu 40°C hingga 280°C.

#### **3.5.4 Pembuatan Media**

Pembuatan media dilakukan sesuai kebutuhan dan berdasarkan *e-ticket* yang tertera pada kemasan. Untuk membuat media pertumbuhan NA dan MHA pada *Petri dish* digunakan 10 ml aquadest setiap 1 *plate* dan 7 ml untuk agar miring. Media NA dibuat dengan cara melarutkan bubuk media *agar bacteriological* dan bubuk media *nutrient broth* dengan aquadest ke dalam gelas Erlenmeyer kemudian dipanaskan di *magnetic stirrer*. Media MHA dibuat dengan cara melarutkan bubuk media *agar bacteriological* dan bubuk media *Mueller Hinton broth* dengan aquadest ke dalam gelas erlenmeyer kemudian dipanaskan di *magnetic stirrer*. Kemudian, media NB dan MHB dibuat dengan cara melarutkan bubuk *nutrient broth* dan *Mueller Hinton* dengan aquadest ke dalam gelas Erlenmeyer kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah itu, media NA, MHA, MHB, dan NB disterilkan di dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### **3.5.5 Peremajaan Bakteri *Streptococcus mutans***

Peremajaan bakteri bertujuan agar bakteri memulai metabolisme kembali setelah penyiapan (Wijayanti *et al.*, 2014). Biakan murni bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Laboratorium Bakteriologi Poltekkes Kemenkes Bandung diremajakan pada media *nutrient agar* (NA) dengan cara media NA dituang ke dalam tabung reaksi dan dimiringkan 45°. Setelah media NA memadat, bakteri diambil dengan jarum ose dari biakan murni dan digoreskan pada media NA kemudian biakan *Streptococcus mutans* diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### **3.5.6 Kurva Baku dan Kurva Tumbuh Bakteri *Streptococcus mutans***

Kurva baku bakteri digunakan untuk menghitung jumlah sel bakteri secara tidak langsung. Dalam kurva baku, terdapat grafik regresi antara nilai absorbansi (OD) dengan jumlah sel bakteri (CFU/mL). Pada penelitian ini, digunakan metode *turbidity count* untuk melihat tingkat kekeruhan bakteri (*Optical Density/OD*) dan metode *total plate count* (TPC) untuk menghitung jumlah koloni bakteri. Sebanyak 1 ose bakteri *Streptococcus mutans* diinokulasikan ke dalam 100 mL medium NB

dalam tabung erlenmeyer 250 ml, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm dan suhu 37°C. Setelah 24 jam, dilakukan pengenceran kultur bakteri *Streptococcus mutans* dengan perbandingan antara kultur dan media yaitu 2:8, 5:5, 3:7, dan 8:2. Kemudian, nilai absorbansi (OD) dari masing-masing pengenceran diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 625 nm. Untuk menghitung jumlah koloni bakteri, kultur bakteri dari masing-masing pengenceran diinokulasikan pada media NA dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C. Setelah 24 jam, koloni bakteri yang tumbuh dihitung menggunakan *colony counter*.

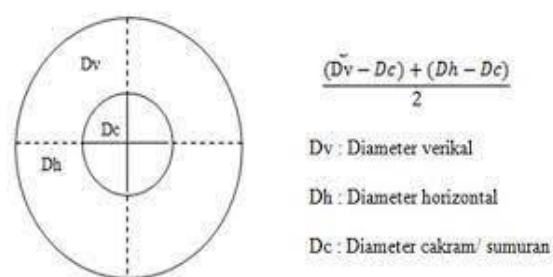
Kurva tumbuh bakteri digunakan untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan sel bakteri dalam rentang waktu tertentu. Pengamatan kurva tumbuh bakteri *Streptococcus mutans* bertujuan untuk mengetahui umur dan fase pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Pengamatan kurva tumbuh bakteri pada penelitian ini merujuk pada buku “Microbiology: A Laboratory Manual Twelfth Edition” (Cappucino & Welsh, 2019). Sebanyak 1 ose bakteri *Streptococcus mutans* diinokulasikan ke dalam 100 mL medium NB dalam tabung erlenmeyer 250 ml, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm dan suhu 37°C. Kepadatan sel diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 625 nm. Pengukuran nilai absorbansi dilakukan selama 24 jam dengan interval waktu setiap 60 menit.

### 3.5.7 Uji *Disc Diffusion Assay* (DDA)

Uji *disc diffusion assay* (DDA) dilakukan untuk menentukan nilai sensitivitas bakteri terhadap senyawa antimikroba dimana pada penelitian ini bertujuan untuk menentukan sensitivitas bakteri *Streptococcus mutans* terhadap ekstrak etanol daun kecombrang (*Etligeria elatior*) pada beberapa konsentrasi perlakuan. Tahapan uji antibakteri dengan metode *disc diffusion assay* pada penelitian ini merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Rollando (2019) dan Faradina (2020). Alat dan bahan yang dibutuhkan disiapkan dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm. Isolat murni bakteri *Streptococcus mutans* disiapkan kemudian diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi media *Mueller Hinton Agar* (MHA) menggunakan *cotton swab* steril.



Kertas cakram (*disk paper*) steril berukuran 6 mm direndam ke dalam masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun kecombrang dengan konsentrasi 82,5%; 85%; 87,5%; dan 90%. Kemudian, kertas cakram tersebut diletakan di atas media agar MHA yang telah diinokulasikan bakteri uji. Dalam penelitian ini digunakan kontrol positif antibiotik Clindamycin 35 µg/ml dan kontrol negatif digunakan DMSO 15%. Cawan Petri diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Parameter yang diamati pada tahap ini yaitu zona bening yang terbentuk menunjukkan zona hambat pertumbuhan bakteri, kemudian diameter zona bening *vertical* dan *horizontal* diukur dalam skala milimeter (mm) menggunakan penggaris. Rumus perhitungan diameter zona hambat disajikan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Rumus Perhitungan Diameter Zona Hambat

(Harti, 2015)

Berdasarkan perhitungan luas zona hambat yang diamati pada media, zona hambat dapat dikategorikan dalam Tabel 3.3 berikut (Susanto, *et al.*, 2015).

Tabel 3.1 Kategori Zona Hambat yang Terbentuk

Diameter	Kekuatan Daya Hambat
≤ 5 mm	Lemah ( <i>weak</i> )
6-10 mm	Sedang ( <i>moderate</i> )
11-20 mm	Kuat ( <i>strong</i> )
≥ 21 mm	Sangat kuat ( <i>very strong</i> )



### 3.5.8 Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Pada penelitian ini, uji *minimum inhibitory concentration* (MIC) dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimal dari ekstrak etanol daun kecombrang yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Penentuan nilai MIC pada penelitian ini merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Rollando (2019) yaitu menggunakan 2 ml media *Mueller Hinton Broth* (MHB) yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan larutan uji ekstrak daun kecombrang dengan konsentrasi 82,5%, 85%, 87,5%, dan 90% sebanyak 1 ml, lalu ditambahkan 1 ml biakan bakteri *Streptococcus mutans*. Kontrol positif dibuat dengan menggunakan media MHB sebanyak 2 ml kemudian ditambahkan 1 ml antibiotik *clindamycin* 35 µg/ml dan ditambahkan 1 ml biakan bakteri *Streptococcus mutans*. Kontrol negatif dibuat dengan menggunakan 2 ml media MHB, 1 ml DMSO 15%, dan 1 ml bakteri *Streptococcus mutans*. Selanjutnya, seluruh tabung uji dihomogenkan menggunakan *vortex* dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dalam inkubator.

Penentuan nilai MIC didasarkan pada nilai absorbansi (OD) pra dan pasca inkubasi yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 625 nm. Penurunan nilai absorbansi menunjukkan bahwa jumlah sel bakteri yang hidup mulai menurun. Jika terdapat penurunan nilai absorbansi antara pra inkubasi dengan pasca inkubasi, maka dapat dikatakan bahwa senyawa antibakteri yang diujikan mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Selanjutnya, hasil pengujian MIC yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dilanjutkan dengan uji *minimum bactericidal concentration* (MBC) untuk menganalisis pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus mutans* pada media MHA.

### 3.5.9 Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Hasil pengujian MIC yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya dilanjutkan dengan uji *minimum bactericidal concentration* (MBC) untuk mengetahui konsentrasi terkecil ekstrak etanol daun kecombrang (*Etligeria elatior*) yang dapat membunuh bakteri *Streptococcus mutans*. Uji penentuan nilai MBC dilakukan dengan cara menggoreskan sebanyak satu ose larutan uji pada media

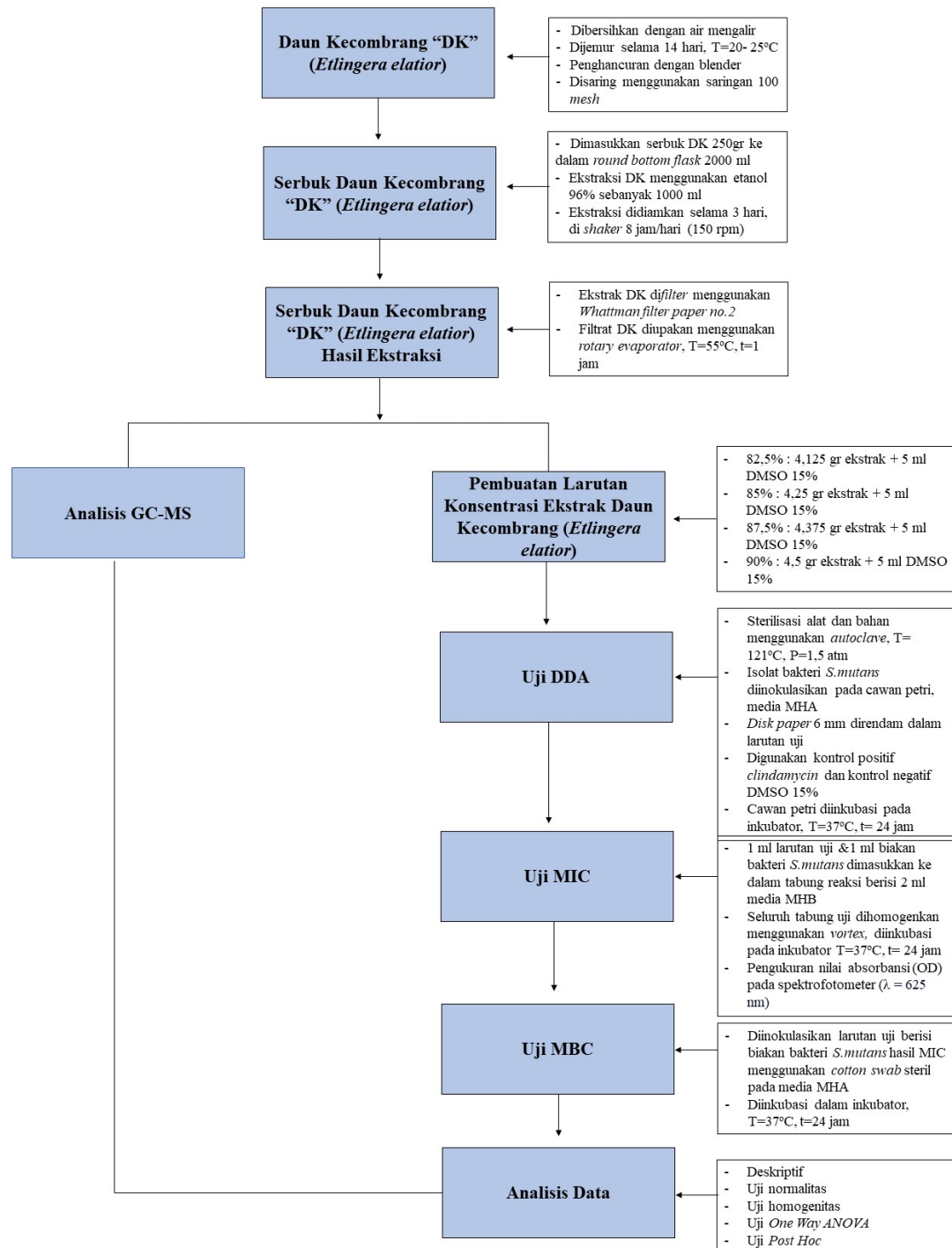
*Mueller Hinton Agar* (MHA) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator. Larutan uji yang digunakan pada tahap ini yaitu larutan hasil uji MIC yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. MBC ditandai dengan tidak ada koloni yang tumbuh pada media agar setelah dilakukan penggosokan dari tiap sumuran *microplate* atau tabung *macroplate* hasil MIC setelah diinkubasi selama 18-24 jam (Migliato *et al.*, 2010).

### 3.5.10 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji normalitas, uji homogenitas, uji *one way* ANOVA, dan uji *post hoc* menggunakan *software* SPSS IBM *Statistic*. Uji *one way* ANOVA bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun kecombrang (*Etilingera elatior*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Jika hasil uji *one way* ANOVA menunjukkan adanya pengaruh ekstrak daun kecombrang (*Etilingera elatior*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* maka dilanjutkan uji *post hoc*. Jika data berdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD, sedangkan *post hoc* Games-Howell digunakan jika data berdistribusi normal tetapi tidak homogen. Uji *post hoc* bertujuan untuk mengetahui signifikansi perbedaan rata-rata daya hambat tiap kelompok perlakuan. Kemudian, jika data berdistribusi tidak normal dan tidak homogen digunakan uji *Kruskal-Wallis* (uji non parametrik) untuk menguji apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok variabel *independent* dengan variabel *dependent* (Jamco, 2022).

### 3.6 Alur Penelitian

Alur dalam penelitian ini disajikan pada diagram alur berikut (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 Diagram Alur Penelitian