

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam jenis penelitian mix method yakni penelitian yang merupakan gabungan atau kombinasi antara metode eksperimen dan deskriptif (Masrizal, 2011). Metode ini dilakukan agar data yang dihasilkan saling mendukung antara satu sama lain.

Desain penelitian yang digunakan untuk metode eksperimen pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana setiap perlakuan dalam percobaan dirancang dalam kondisi yang relatif homogen. Adapun prosedur penelitian dengan metode eksperimen meliputi *Disc Diffusion Assay* (DDA) pada bakteri dan pada saliva. Pemberian perlakuan pada tahapan ini dilakukan tiga kali pengulangan sesuai dengan rumus menurut Federer (1977) yaitu:

$$\begin{aligned}(n-1)(t-1) &\geq 15 \\(n-1)(9-1) &\geq 15 \\(n-1)8 &\geq 15 \\8n - 8 &\geq 15 \\8n &\geq 23 \\n &\geq 2,875 \sim 3\end{aligned}$$

Sedangkan prosedur untuk metode deskriptif seperti penelitian Mazlan dkk. (2006) meliputi *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), aplikasi dan reduksi aroma *djenkolic acid* pada biji julang-jaling. Parameter yang di amati dalam penelitian ini adalah pertumbuhan dan kematian bakteri kariogenik dengan parameter zona hambat pada uji aktivitas antikariogenik metode difusi (DDA) sesuai dengan pernyataan Hermawan dkk. (2007), kekeruhan suspensi pada uji aktivitas metode dilusi cair (MIC) seperti pernyataan Purwoko (2007), nilai MBC dilihat dari tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media agar seperti pernyataan Taslihan dkk. (2001), dan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada setiap konsentrasi dalam metode aplikasi serta banyaknya reduksi *djenkolic acid* berdasarkan perbedaan waktu.

Rancangan penelitian untuk uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) yang dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan seperti terdapat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1

*Rancangan Uji Minimum Inhibitory Concentration*

Bakteri uji	Perlakuan											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MHB	Bakteri A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A	10A	11A	12A
B	MHB	Bakteri B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
C	MHB	Bakteri C	3C	4C	5C	6C	7C	8C	9C	10C	11C	12C
D	MHB	Bakteri D	3D	4D	5D	6D	7D	8D	9D	10D	11D	12D
E	MHB	Bakteri E	3E	4E	5E	6E	7E	8E	9E	10E	11E	12E
F	MHB	Bakteri F	3F	4F	5F	6F	7F	8F	9F	10F	11F	12F
G	MHB	Bakteri G	3G	4G	5G	6G	7G	8G	9G	10G	11G	12G
H	MHB	Bakteri H	3H	4H	5H	6H	7H	8H	9H	10H	11H	12H

## Keterangan

A : *Streptococcus mutans* + ekstrak

B : *Streptococcus sobrinus* + ekstrak

C : *Actinomyces viscosus* + ekstrak

D : *Streptococcus mutans* + DMSO

E : *Actinomyces viscosus* + DMSO

F : *Streptococcus mutans* + *Chlorhexidine*

G : *Streptococcus sobrinus* + *Chlorhexidine*

H : *Actinomyces viscosus* + *Chlorhexidine*

1 : Medium MHB (*Mueler Hinton Broth*)

2 : Kultur bakteri

3-12 : Kultur bakteri + medium MHB ( pengenceran dengan konsentrasi tertinggi dimulai dari no 12)

### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2018 sampai Maret 2019. Ekstraksi sampel tanaman dilakukan di Laboratorium Biokimia dan kultur bakteri serta uji antikariogeniknya dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas *Food Science and Technology* Universiti Putra Malaysia. Sedangkan untuk reduksi *djenkolic acid* biji julang-jaling (*Archidendron microcarpum* L.), uji DDA dan uji organoleptik ekstrak biji julang-jaling hasil reduksi dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, FPMIPA UPI.

### **3.3 Populasi, Sampel dan Partisipan**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah populasi bakteri kariogenik pada saliva manusia. Sampel yang digunakan adalah bakteri kariogenik *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* dan *Actinomyces viscosus*. Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* dan *Actinomyces viscosus* yang sudah diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak biji julang-jaling (*Archidendron microcarpum* L.). Partisipan yang terlibat dalam penelitian ini terdiri dari 30 orang responden penelitian.

### **3.4 Alat dan Bahan**

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat dan bahan yang terdapat di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas *Food Science and Technology* Universiti Putra Malaysia dan Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, FPMIPA UPI (Lampiran I).

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Pembuatan Medium**

Medium yang akan digunakan dibuat dan disiapkan. Untuk mengkultur bakteri, uji DDA (*Disc Diffusion Assay*), dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) menggunakan medium MHA (*Muller Hinton Agar*). Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) menggunakan medium MHB (*Muller Hinton Broth*) dan uji aplikasi menggunakan medium PCA (*Plate Count Agar*).

### 3.5.2 Sterilisasi

Semua alat, bahan dan medium yang akan digunakan dalam penelitian ini disiapkan dan disterilisasi dengan sterilisasi basah menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

### 3.5.3 Preparasi Sampel

Biji julang - jaling diperoleh dari pasar tradisional Metro Lampung dan diidentifikasi oleh Dr. Achyani Soebadi dari Departemen Pendidikan Biologi Universitas Muhammadiyah Metro Lampung. Biji yang sudah diidentifikasi kemudian dikupas kulitnya dan hanya diambil bagian biji saja. Setelah itu biji dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C selama 1 jam.

### 3.5.4 Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan menggunakan metode maserasi seperti terdapat dalam Rukayadi dkk. (2013), biji julang-jaling yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender, setelah menjadi *powder*, simplisia biji julang - jaling tersebut ditimbang sebanyak 100 gram dan dilarutkan dengan etanol absolut sebanyak 400 ml di dalam labu Erlenmyer. Setelah itu dilakukan maserasi dengan cara disimpan dalam *waterbath shaker* selama 24 jam dengan suhu 40°C dan kecepatan 80 rpm. Setelah 24 jam dimaserasi, larutan sampel disaring menggunakan kertas saring Whatman no 1 yang disimpan pada filter funnel, filter funnel tersebut diletakkan di atas filter flask, dan filter flask disambungkan pada aspirator pump yang sudah diisi air untuk mempercepat penyaringan.

*Round bottom flask* disimpan di dalam oven selama 30 menit dengan suhu 105°C supaya kering (sesuai dengan standar AOAC), setelah itu dipindahkan ke dalam desikator selama 15 menit dan berat awal *round bottom flask* ditimbang. Larutan sampel hasil saringan dimasukkan ke dalam *round bottom flask* yang kemudian diletakkan pada rotary evaporator untuk dipisahkan senyawa etanolnya. *Rotary evaporator* ini disambungkan dengan aspirator untuk membantu mempercepat pemisahan etanol dari ekstraknya. Kecepatan yang digunakan adalah 90 rpm dengan suhu 65°C. Evaporasi ini dilakukan hingga etanol benar-benar habis atau terpisah dari ekstrak dan sampel ekstraknya menjadi pekat. Setelah ekstrak di dapatkan, ekstrak tersebut disimpan ke dalam oven selama 15 menit dengan suhu 60°C. Kemudian *round bottom flask* berisi ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam

desicator, setelah itu *round bottom flask* berisi ekstrak ditimbang kembali dan dicatat hasilnya. Untuk mengetahui rendemen hasil ekstraksi digunakan rumus menurut Rukayadi dkk., (2013):

$$\text{Hasil ekstraksi} = \frac{\text{Berat akhir botol} - \text{berat awal botol}}{100 \text{ ml}} \times 100 \%$$

Hasil akhir dari ekstrak berupa pasta, kemudian sampel hasil ekstraksi dibuat menjadi konsentrasi 10% dengan melarutkan 100 mg sampel hasil ekstraksi dalam 1 mL DMSO 100%. Penggunaan 10% ekstrak untuk uji aktivitas antibakteri mengacu pada penggunaan obat dan makanan untuk penggunaan klinis dalam panduan *Clinical and Laboratory Standard Institute 2017*.

### 3.5.5 Pembuatan Inokulum Bakteri

Medium MHA (*Muller Hinton Agar*) dan stok kultur murni bakteri disiapkan. Stok bakteri kultur merupakan bakteri ATCC (*American Type Culture Collection*) dan KCCM (*Korean Culture Center of Microorganisms*). Bakteri yang digunakan adalah *Actinomyces viscosus* (ATCC 15987), *Streptococcus mutans* (KCCM 3309), dan *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478). Ujung dari ose disterilisasi dengan cara dibakar di atas bunsen sampai ose terlihat menyala, setelah itu ditunggu hingga agak dingin agar tidak membunuh bakterinya. Kemudian bakteri diambil dari kultur murni dengan menggunakan ose, lalu bakteri di *streak* pada medium MHA dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37°C.

### 3.5.6 Disc Diffusion Assay (DDA)

Bakteri hasil inokulum yakni *Actinomyces viscosus* (ATCC 15987), *Streptococcus mutans* (KCCM 3309), dan *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) diisolasi ke dalam cawan petri yang berisi media MHA dengan menggunakan metode cawan sebar (*spread plate*). Lima *paper disk* ditanam pada media MHA yang sudah diinokulasi bakteri, kemudian *paper disk* pertama diberi larutan CHX (*Chlorhexidine*) 0,1% sebagai kontrol positif, *paper disk* kedua diberi DMSO 10% sebagai kontrol negatif, dan tiga *paper disk* lainnya diberi ekstrak sampel 10% (Mazlan dkk., 2016). Masing-masing volume larutan adalah 10 µL. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya

zona bening atau zona hambat (*clear zone*) pada paper disk yang ditetesi ekstrak sampel dan kontrol positif (CLSI, 2017).

### **3.5.7 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)**

MIC dilakukan untuk mengetahui nilai konsentrasi terendah suatu zat antimikroba (antikariogenik) yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba tersebut. Metode yang digunakan seperti terdapat dalam petunjuk CLSI (2017) yakni *microbroth dilution* di dalam 96 sumur. Langkah pertama yang harus dilakukan adalah menambahkan medium MHB atau broth agar ke dalam 3 *microtube*, masing-masing *microtube* diisi 1 ml broth agar. Bakteri hasil inokulum diambil menggunakan *cutton bud* lalu masing-masing bakteri dimasukkan ke dalam MHB yang ada dalam *microtube*. Bakteri yang sudah ada dalam 1 ml broth agar tersebut kemudian diencerkan kembali dengan menambahkannya 10 µl kedalam 10 ml MHB dalam botol kecil dan divortex. Selanjutnya 990 µl PBS dimasukkan ke dalam dua *microtube*, lalu *microtube* pertama ditambahkan 10 µl kultur bakteri yang sudah diencerkan dalam 10 ml MHB dan divortex sehingga menjadi pengenceran  $10^{-2}$ . Setelah itu ambil 10 µl bakteri dari *microtube* untuk kemudian ditambahkan kedalam *microtube* kedua yang berisi 990 µl PBS untuk membuat pengenceran  $10^{-4}$ . Masing-masing pengenceran di streak ke dalam cawan petri dan diinkubasi dalam suhu 37°C. Hal ini dilakukan untuk mengetahui bakteri yang diinokulasikan kedalam broth agar yang akan di MIC.

Selanjutnya microtiter disiapkan, sumur 1A sampai 1H diisi MHB saja dan sumur 2A sampai 2H hanya diisi oleh inokulum bakteri. Kemudian 100 µl inokulum bakteri yang sudah diencerkan dalam 10 ml MHB didistribusikan ke dalam mikrotiter kecuali sumur 1A sampai 1H. Setelah itu pada kolom sumur A, B dan C inokulum bakteri dimikrodilusi menggunakan 10% ekstrak julang-jaling sebanyak 100 µl, kolom sumur C dan D dimikrodilusi menggunakan DMSO 10%, dan kolom sumur F, G, H dimikrodilusi menggunakan *chlorhexidine* 0,1% dengan masing-masing volume DMSO dan CHX sebanyak 100 µl. Mikrotiter kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

### **3.5.8 Minimum Bactericidal Concentration (MBC)**

MBC digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah yang dapat membunuh 99,9% inokulum akhir bakteri setelah inkubasi selama 24 jam (Balouiri,

Sadik dan Ibnusouda., 2016). Metode yang digunakan seperti terdapat dalam petunjuk CLSI (2017), yakni nilai MBC dapat diketahui dengan menggunakan metode lempeng agar. Langkah yang harus dilakukan adalah dengan mengambil 10 µl kultur hasil MIC di mikrotiter, dihomogenkan terlebih dahulu kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri berisi MHA. Masing-masing kultur dari satu sumur diteteskan ke dalam cawan petri dengan alur tetesannya dibuat melingkar, dimana satu *line* sumur di mikrotiter dimasukkan ke dalam satu cawan petri berisi MHA sehingga terdapat 8 cawan petri untuk melihat nilai MBC. Kemudian cawan petri diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C, dan dilihat nilai MBC nya.

### 3.5.9 Aplikasi Zat Uji Antibakteri terhadap Saliva

Karies gigi merupakan proses multifaktor yang disebabkan oleh interaksi antara gigi dan saliva sebagai host, bakteri dalam mulut serta makanan yang mudah difermentasikan (Preethi, Dodawa dan Pyati., 2010). Ke empat faktor tersebut saling berkaitan satu sama lain sehingga untuk dapat mengetahui ada tidaknya pengaruh suatu zat antibakteri terhadap bakteri penyebab karies gigi dapat dilakukan melalui aplikasi antibakteri terhadap saliva. Bakteri kariogenik merupakan mikroflora normal yang biasanya terdapat di dalam mulut dan saliva, namun jumlah yang berlebihan dapat menjadi agen utama karies gigi. Sehingga dilakukan uji aplikasi terhadap saliva untuk melihat pengaruh ekstrak terhadap populasi bakteri dalam saliva tersebut. Uji aplikasi zat antibakteri ini dilakukan seperti metode penelitian Ramli dkk. (2017), dalam penelitian ini sampel saliva diambil dari dua orang panelis, yakni seorang perempuan dan laki-laki berusia 22 tahun masing-masing sebanyak 10 µl diencerkan ke dalam 990 µl PBS (*Phosphate Buffer Saline*) kemudian divortex dan diambil 10 µl lalu dimasukkan kembali ke dalam 990 µl PBS untuk pengenceran  $10^{-2}$ , dan selanjutnya dari pengenceran  $10^{-2}$  diambil 10 µl lalu dimasukkan kembali ke dalam 990 µl PBS untuk pengenceran  $10^{-4}$ . Masing-masing pengenceran diambil 10 µl lalu disebar ke dalam cawan petri berisi medium PCA (*Plate Count Agar*) dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama 24 jam. Hal ini dilakukan untuk mengetahui bakteri yang diinokulasikan dari saliva tersebut. Selain itu dilakukan pula uji DDA untuk mengetahui aktivitas antikariogenik terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* dan *Actinomyces viscosus*, yakni dengan menambahkan 20 µl saliva ke dalam cawan

petri berisi MHA, lalu letakkan 3 paper disk yang kemudian ada yang ditetesi oleh CHX 0,1%, DMSO 10% dan ekstrak julang-jaling 10% diinkubasi dalam suhu 37°C selama 24 jam.

Uji aplikasi, 20 µl saliva diencerkan dalam 5 ml larutan PBS. Saliva hasil pengenceran tersebut kemudian dicampur dengan 10% ekstrak untuk dibuat menjadi beberapa konsentrasi yakni konsentrasi 0%; 0,05%; 0,5% dan 5% dengan volume total setiap konsentrasi 500 µl. Masing-masing konsentrasi dibuat pengenceran  $10^{-2}$  dan  $10^{-4}$ . Kemudian masing-masing pengenceran pada setiap konsentrasi tersebut diambil 10 µl lalu diinokulasikan dan distreak dalam cawan petri berisi medium PCA (*Plate Count Agar*) sebanyak 10 µl dalam setiap rentang waktu inkubasi 5 menit, 10 menit, 15 menit dan 30 menit lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah bakteri pada setiap pengenceran dan waktu inkubasi dihitung, kemudian hasilnya dapat dilihat melalui grafik pertumbuhan bakteri selama waktu yang sudah ditentukan.

#### **3.5.10 Reduksi *Djenkolic acid* Biji Julang-Jaling (*Archidendron microcarpum* L.)**

Biji julang-jaling (*Archidendron microcarpum* L.) disiapkan sebanyak 400 gram. Biji julang-jaling (*Archidendron microcarpum* L.) yang akan direndam dikupas terlebih dahulu dan dipisahkan dari kulitnya. Biji julang-jaling ini kemudian diberi perlakuan untuk mengurangi senyawa *djenkolic acid* yang terkandung di dalam biji tersebut. Metode yang digunakan untuk reduksi senyawa *djenkolic acid* ini melalui perendaman dengan menggunakan  $\text{Ba(OH)}_2$  berdasarkan pernyataan Van Veen dan Hyman dalam (Vincent, Vigneaud dan Wilbur., 1936) dimana *djenkolic acid* berhasil dipisahkan dari biji dengan menggunakan  $\text{Ba(OH)}_2$ . Metode yang dilakukan yaitu dengan memberikan 4 perlakuan berbeda terhadap waktu perendaman biji julang – jaling (*Archidendron microcarpum* L.) oleh  $\text{Ba(OH)}_2$  pada suhu 30°C sebelum di ekstraksi. Uji reduksi *djenkolic acid* merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Yenrina, Kasim dan Winda. (2015) mengenai pengaruh *pre-treatment* jengkol terhadap kandungan sulfur. Pada penelitian ini, dari 400 gram biji julang–jaling, 100 gram tidak diberi perlakuan dan langsung diekstraksi. Sedangkan 300 gram lainnya dilakukan perendaman oleh  $\text{Ba(OH)}_2$  terlebih dahulu. Perendaman yang dilakukan terhadap biji julang – jaling oleh  $\text{Ba(OH)}_2$  ini dibedakan lama perendamannya, dimana dari



300 gram biji julang – jaling ini dibagi menjadi tiga perlakuan waktu perendaman. Perlakuan yang diberikan:

Kontrol: 100 gram biji julang-jaling kontrol yang tidak dilakukan perendaman

Perlakuan 1: 100 gram biji julang-jaling direndam selama 24 jam

Perlakuan 2: 100 gram biji julang-jaling direndam selama 48 jam

Perlakuan 3: 100 gram biji julang-jaling direndam selama 72 jam

Sebelum dilakukan perendaman, konsentrasi dari  $\text{Ba(OH)}_2$  ditentukan terlebih dahulu, dimana untuk perendaman setiap 100 gram biji julang-jaling dibutuhkan 25 gram  $\text{Ba(OH)}_2$  yang dilarutkan dalam 1000 mL akuades. Setelah larutan  $\text{Ba(OH)}_2$  siap digunakan, larutan ini dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi biji julang-jaling yang sudah dikupas sebanyak 100 gram lalu disimpan *waterbath shaker* dengan suhu  $30^\circ\text{C}$  dan kecepatan 90 rpm. Perendaman dilakukan di dalam *waterbath* selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam.

Setelah selesai perendaman, biji julang-jaling dikeringkan kembali dengan dibiarkan ditempat terbuka sampai biji mulai mengering selama 24 jam. Untuk memastikan agar biji tersebut benar-benar kering, biji di keringkan didalam oven dengan suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 2 jam. Setelah proses pengeringan biji julang-jaling yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender. Setelah menjadi *powder*, serbuk biji tersebut ditimbang sebanyak 100 gram dan dilarutkan dengan etanol absolut sebanyak 400 ml di dalam labu Erlenmyer. Kemudian ekstrak dimaserasi selama 24 jam dan dilakukan evaporasi etanol hingga didapatkan rendemen hasil ekstrak dari masing-masing sampel. Hasil ekstraksi tersebut dibuat menjadi konsentrasi 10% dengan melarutkan 100 mg hasil ekstraksi dalam 1 mL DMSO 100%.

Hasil yang akan didapatkan adalah empat jenis ekstrak biji julang-jaling dengan waktu perendaman yang berbeda. Ke empat ekstrak yang sudah didapatkan kemudian dilakukan uji organoleptik untuk melihat reduksi senyawa *djenckolic acid* dari setiap perlakuan dan dicatat hasilnya.

### **3.5.11 Uji Organoleptik Ekstrak Biji Julang-Jaling Hasil Reduksi (*Djenckolic acid*)**

Uji organoleptik merupakan uji yang menggunakan panca indera sebagai alat untuk mengukur mutu (dalam hal ini tingkat aroma *djenkloic acid*). Dalam uji organoleptik ini panelis menguji aroma dan menilai tingkat kesukaan terhadap

aroma ekstrak biji julang-jaling hasil penelitian (hasil reduksi aroma bau *djenkolic acid*) dengan pembanding berupa ekstrak biji julang-jaling kontrol yang tidak diberi perlakuan reduksi *djenkloic acid*. Analisis skala hedonik ditransformasikan menjadi skala numerik menurut tingkat kesukaan (Rahayu, 1994). Uji organoleptik dilakukan untuk mengetahui tingkat kesukaan panelis terhadap aroma ekstrak, hal ini bermanfaat dalam pembuatan produk, apabila ekstrak akan diaplikasikan dalam bentuk obat secara oral seperti obat kumur, maka tingkat kesukaan terhadap aroma ekstrak perlu diketahui.

### **3.5.12 Disk Difussion Assay (DDA) Ekstrak Hasil Reduksi *Djenkolic acid* terhadap Bakteri Uji**

Bakteri kariogenik *Streptococcus mutans* diisolasi ke dalam cawan petri yang berisi media MHA dengan menggunakan metode cawan sebar (*spread plate*). Uji DDA dilakukan sesuai dengan petunjuk CLSI (2017), lima paper disk ditanam pada media MHA yang sudah diisolasi bakteri, kemudian *paper disk* pertama diberi larutan CHX (*Chlorhexidine*) 0,1% sebagai kontrol positif, *paper disk* kedua diberi DMSO 10% sebagai kontrol negatif, dan tiga paper disk lainnya diberi ekstrak sampel 10% yang merupakan hasil reduksi aroma *djenkolic acid*. Masing-masing volume larutan adalah 10  $\mu$ L. Selanjutnya inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening atau zona hambat (*clear zone*) pada *paper disk* yang ditetesi ekstrak sampel dan kontrol positif.

## **3.6 Analisis Data**

Analisis data yang digunakan untuk uji eksperimen menggunakan program SPSS 22 *for windows* sedangkan untuk analisis data uji deskriptif melalui pengamatan visual dan organoleptik.

### **3.6.1 Analisis Uji Aktivitas Antibakteri (*Disc Diffusion Assay*)**

Data hasil uji antibakteri melalui DDA dianalisis hasil pengukuran zona hambatnya untuk mengetahui signifikansi pengaruh ekstrak etanolik biji julang-jaling terhadap bakteri uji. Adapun tahapan uji yang dilakukan sebagai berikut:

#### 1) Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan terhadap masing-masing bakteri uji yakni *Actinomyces viscosus* (ATCC 15987), *Streptococcus mutans* (KCCM 3309),

dan *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478). Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui sebaran data sebagai salah satu asumsi dasar dalam uji statistik.

#### 2) Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan terhadap masing-masing bakteri uji yakni *Actinomyces viscosus* (ATCC 15987), *Streptococcus mutans* (KCCM 3309), dan *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478). Variansi data dapat diketahui melalui uji homogenitas sebagai salah satu asumsi dasar dalam uji statistik. Uji statistik parametrik dapat dilakukan apabila sebaran data normal dan homogen. Jika salah satu syarat tidak terpenuhi maka harus dilakukan uji statistik non-parametrik.

#### 3) Uji *One Way Anova*

Uji statistik pada bakteri uji yang memiliki sebaran data normal dan homogen dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *One Way Anova* yang bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perbedaan konsentrasi terhadap diameter zona hambat bakteri uji.

#### 4) Uji Tukey

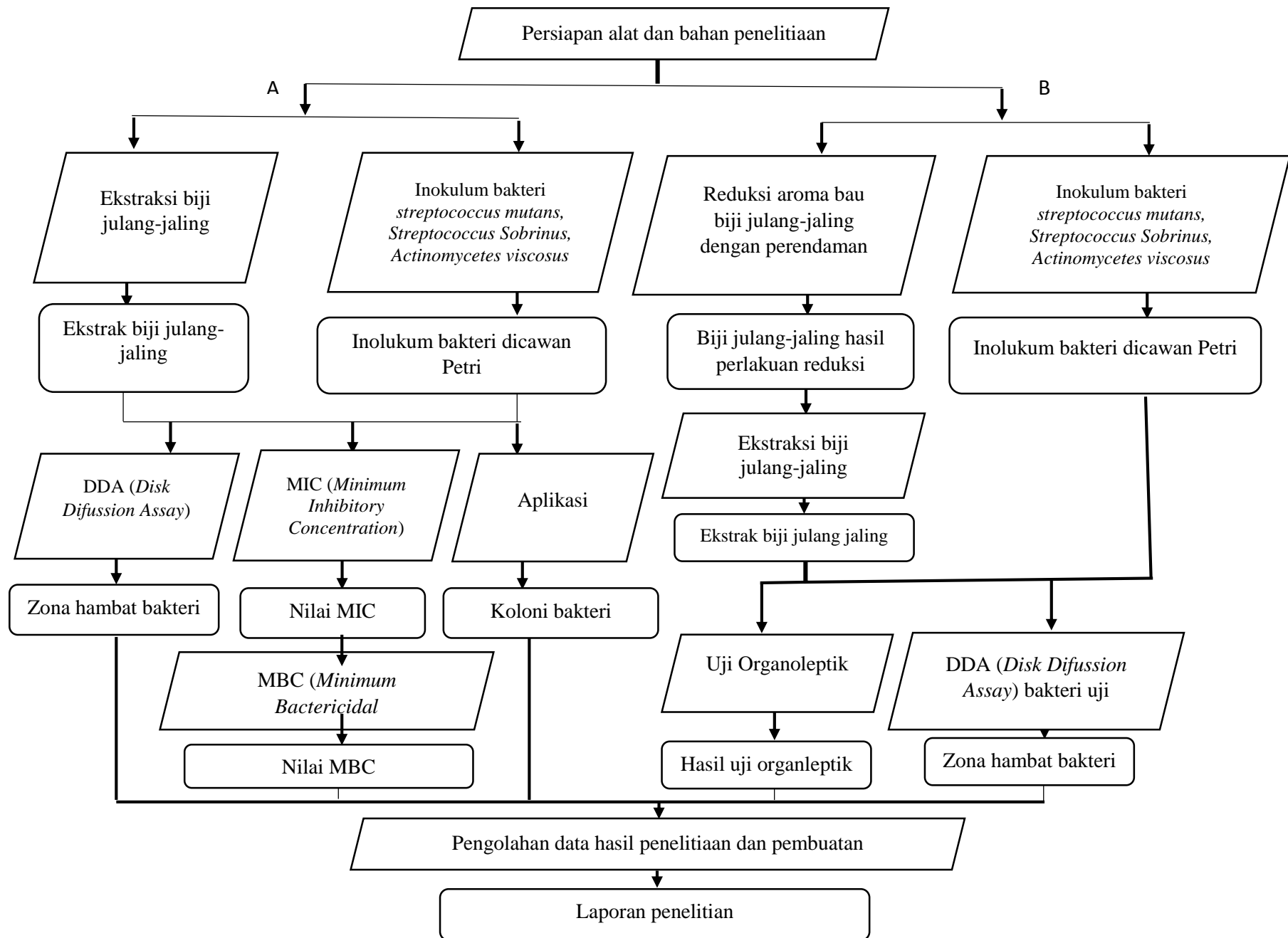
Uji Tukey dilakukan untuk mengetahui perbedaan rata-rata diameter zona hambat dari setiap perlakuan.

### **3.6.2 Analisis Data Uji Deskriptif MIC, MBC, Aplikasi Ekstrak Biji Julang-Jaling terhadap Saliva dan Uji Organoleptik**

Uji deskripsi berupa nilai MIC, MBC, uji aplikasi ekstrak biji julang-jaling dilakukan dengan mendeskripsikan hasil pengamatan secara visual data yang diperoleh dan uji organoleptik diolah dari data responden hasil uji organoleptik yang didapatkan.

### **3.7 Alur Penelitian**

Alur penelitian pada uji aktivitas anikariogenik ekstrak etanolik biji julang-jaling (*Archidendron microcarpum* L.) terdapat pada Gambar 3.1 di bawah ini.



Gambar 3.1 Alur Penelitian