

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah jenis penelitian eksperimental laboratorium.

B. POPULASI DAN SAMPEL

- a. Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol Gulma siam (*Eupatorium odoratum L.*) dengan 4 konsentrasi yaitu 1,55%; 0,78%; 0,39% dan 0,19%.
- b. Mikroorganisme yang digunakan adalah *Porphyromonas gingivalis* strain lokal kultur cakram agar darah yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Yogyakarta.

C. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

- a. Tempat penelitian
 1. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
 2. Pembuatan kultur bakteri *Porphyromonas gingivalis* dan uji efektivitas antibakteri dilakukan di laboratorium mikrobiologi FKIK UMY.
- b. Waktu penelitian
Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Agustus 2017.

D. IDENTIFIKASI VARIABEL DAN DEFINISI OPERASIONAL

- a. Identifikasi variabel
 1. Variabel Pengaruh

Ekstrak etanol daun Gulma siam (*Eupatorium odoratum L.*) konsentrasi 1,55%, 0,78%, 0,39 dan 0,19%.

2. Variabel Terpengaruh

Bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang di kultur pada media *Tryptose Phosphate Broth*.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah:

- Waktu inkubasi 24 jam
- Suhu inkubasi 37° C
- Bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277.
- Ekstrak etanol 50% daun Gulma siam (*Eupatorium odoratum L.*) dibuat konsentrasi 1,55%; 0,78%; 0,39 dan 0,19%.
- Kontrol positif (+) berupa antibiotik *Clindamycin*
- Kontrol negatif (-) berupa aquades steril

4. Variabel tak Terkendali

- Senyawa aktif ekstrak daun Gulma siam.
- Suhu lingkungan ketika pengambilan tumbuhan untuk di ekstrak.

b. Definisi operasional penelitian

1. Daya anti bakteri ekstrak etanol Gulma siam (*Eupatorium odoratum L.*) adalah kadar hambat minimal ekstrak etanol 50% daun gulma siam dengan konsentrasi 1,55%, 0,78%, 0,39% dan 0,19%.

2. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan
3. Interval waktu pengukuran daya hambat *P. gingivalis*

t0 = jam 08.00 a.m

t1 = 8 jam setelah t0 (16.00 p.m.)

t2 = 16 jam setelah t1 (8.00 a.m)

t3 = 8 jam setelah t2 (16.00 p.m)

t4 = 16 jam setelah t3 (8.00 a.m)
4. Kontrol positif yang digunakan adalah *Clyindamycin*.
5. Gelombang sinar UV-vis dengan panjang gelombang 600 nm dari spektrofotometer untuk mengukur kekeruhan dari pertumbuhan bakteri.
6. Panjang gelombang pada penelitian ini adalah 600 nm.
7. Media *Tryptose Phosphate Broth* merupakan media kultur bakteri anerob.

E. KRITERIA INKLUSI DAN KRITERIA EKSKLUSI

a. Kriteria inklusi

- Daun warna hijau.
- Daun yang pertengahan dari pohon.
- Daun gulma siam yang berdiameter 2x3 cm ke atas.

- Daun yang tumbuh dari daerah Kasihan, Bantul.

b. Kriteria eksklusi

- Daun Gulma siam yang sudah kuning, layu dan jatuh dari pohon.

- Daun Gulma siam yang robek sebelum pengambilan.

- Daun Gulma siam yang berdiameter kurang dari 2x3 cm.

F. BAHAN DAN ALAT PENELITIAN

1. Bahan penelitian

a. Ekstrak Gulma siam (*Eupatorium odoratum L.*)

b. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* stain lokal

c. Media *Tryptose Phosphate Broth*

d. Aquades steril

e. Larutan NaCl

f. Etanol 50%

g. Antibiotic *Clindamycin*

2. Alat penelitian

a. Tabung reaksi

b. Tabung enlermeyer

c. Rak tabung

d. Kapas steril

e. Cawan petri

f. Ose steril

g. Blender

- h. Timbangan digital
- i. Baskom
- j. Rotary Evaporation
- k. Spektrofotometer
- l. Baskom
- m. Inkubator
- n. Pipet
- o. Lampu spiritus
- p. Kertas saring
- q. Vortex
- r. Handscoon
- s. Masker
- t. Anaerobic jar
- u. Timbangan digital
- v. *Stirrer*

G. JALANNYA PENELITIAN

- a. Tahap persiapan

Pada tahap persiapan adalah sebelum tumbuhan Gulma siam

- 1) Gulma siam (*Eupatorium odoratum L.*) diambil pada pagi hari supaya dapat daun Gulma siam yang masih subur dan hijau.

- 2) Sebelum di ekstrak tumbuhan di cuci serta dikeringkan, dan alatnya dicuci bersih dan steril supaya menghindari dari kontaminasi bakteri.

b. Pembuatan ekstrak

- 1) Pengambilan daun Gulma siam (*Eupatorium odoratum L.*) menentukan ke ahli pertanian. Pada penelitian ini bagian yang digunakan dari Gulma siam adalah daun.
- 2) Setelah diambil daun Gulma siam berat 1000 g dicuci dan dikeringkan di lemari pengering selama 24 jam lalu dihaluskan hingga menjadi serbuk.
- 3) Serbuk Gulma siam (*Eupatorium odoratum L.*) direndam dalam etanol 50% sebanyak 2.000 ml. selama 24 jam kemudian diaduk dengan menggunakan erlenmeyer selama 20 menit.
- 4) Ekstrak Gulma siam di saringkan dengan menggunakan corong buchner di lapisi dengan kertas saring untuk memisahkan filtrat dengan residu dan di tampung dalam erlenmyer.
- 5) melakukan penguapan etanol dari filtrat dengan Vacuum Rotari Evaporator dengan suhu 40°C dan tekanan kurang dari 1 atm atau sekitar 36-46mmHg sehingga dapatkan ekstrak kental.

6) Setelah dapat ekstrak kental Gulma siam di encerkan menjadi larutan menurut konsentrasi 1,55%; 0,78%; 0,39% dan 0,19% dengan menggunakan aquades.

c. Persiapan bakteri uji

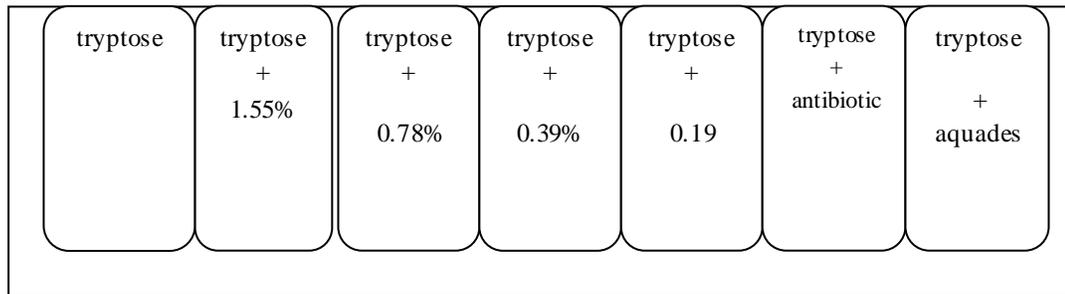
koloni *Porphyromonas gingivalis* dibiakan murni dengan menggunakan cakram agar darah diperoleh dari tersedia di Laboratorium Mikrobiologi balai laboratorium Kesehatan Yogyakarta. Bakteri dibiakan konsentrasi Bakteri 10^6 CFU/mm di inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C .

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri diambil dengan kawat ose steril kemudian diinokulasikan pada *Tryptose Phosphate Broth*. Bakteri dimasukkan ke dalam incubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

e. Pembuatan alikuot dan pengujian Bakteri

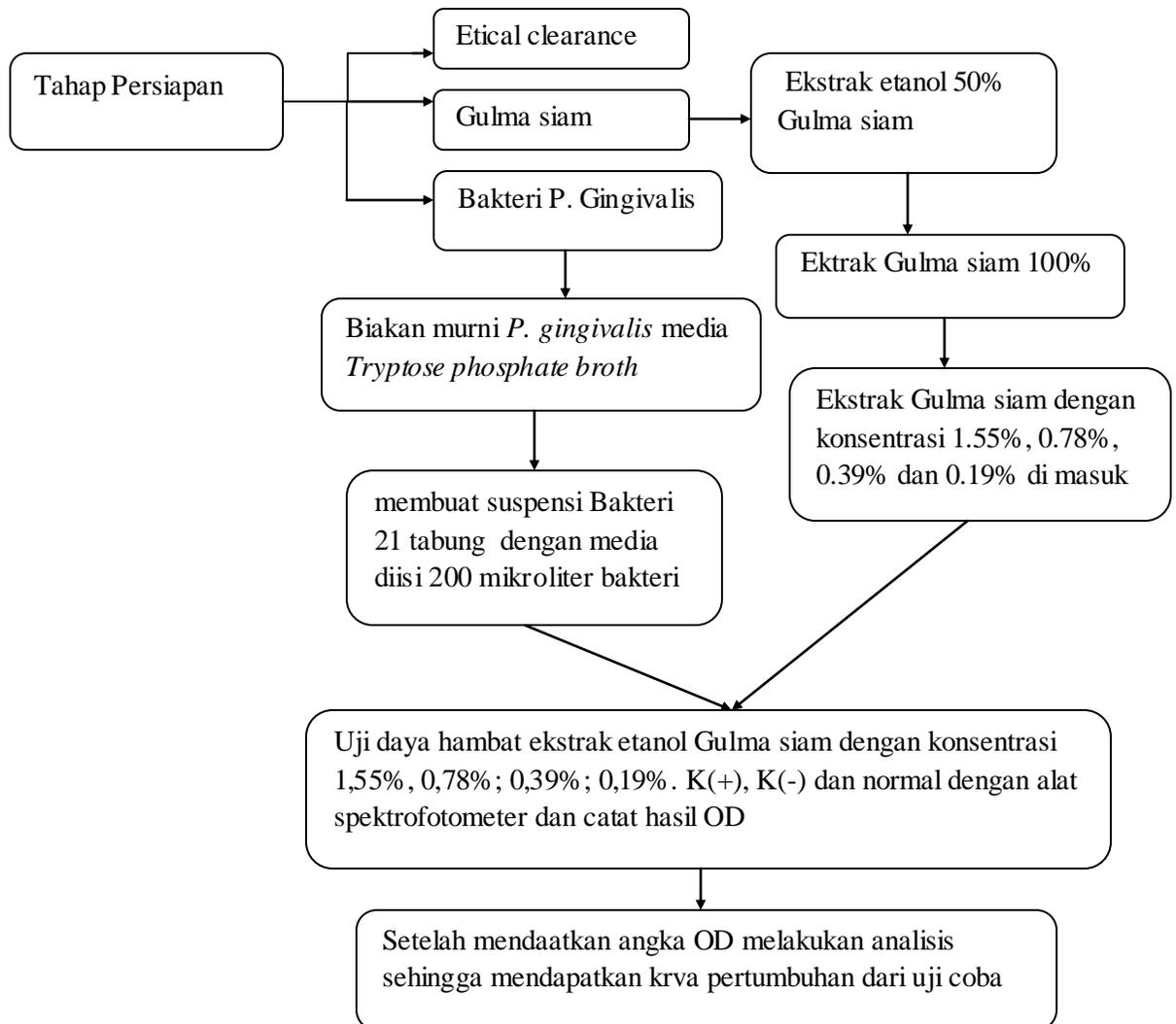
Sejumlah 7 tabung berisi media dan masing-masing konsentrasi serta membuat tabung normal yang berisi media dan bakteri, tabung kontrol + serupa antibiotik *Clindamycin* dan tabung kontrol negatif yang berisi media dan aquades steril.



Gambar 4. Kontrol normal

Sejumlah 21 tabung disiapkan lalu diisi dengan media *Tryptose phosphate broth* sebanyak 4.8 ml. Ke dalam masing-masing 4 tabung ditambahkan ekstrak dengan konsentrasi 1,5%; 0,78%; 0,39% dan 0,19% kontrol positif berupa *Clindamycin*, dan kontrol negative berupa aquades steril. Tiga tabung terakhir tidak diberikan ekstrak dengan tujuan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri dalam kondisi tanpa intervensi. Uji coba dilaksanakan dengan tiga kali (*Triplicate*) sehingga didapatkan 21 tabung untuk uji coba. Uji coba bakteri dilakukan dengan cara menambahkan 200 mikroliter suspensi dalam 21 tabung aliquot kemudian diukur pertumbuhan dan penghambatan dari pertumbuhan awal (t_0) dengan menggunakan gelombang UV 600 nm. pada setiap jam 08.00 dan jam 16.00 kemudian dimasukkan dalam kurva x yang menggambarkan waktu (t) dan kurva y adalah hasil *Optical Density*.

H. ALUR PENELITIAN



Gambar 5. Alur penelitian

I. ANALISA DATA

Data hasil penelitian adalah nilai Optical Density (OD) yang akan disajikan dalam bentuk tabel dan kurva. Data dari kelompok perlakuan tersebut dianalisis normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk* karena sampel yang diujikan <50 . Dan melakukan perbandingan diantara konsentrasi dengan menggunakan *one way ANOVA* serta melakukan uji *post hoc*.

