

## **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

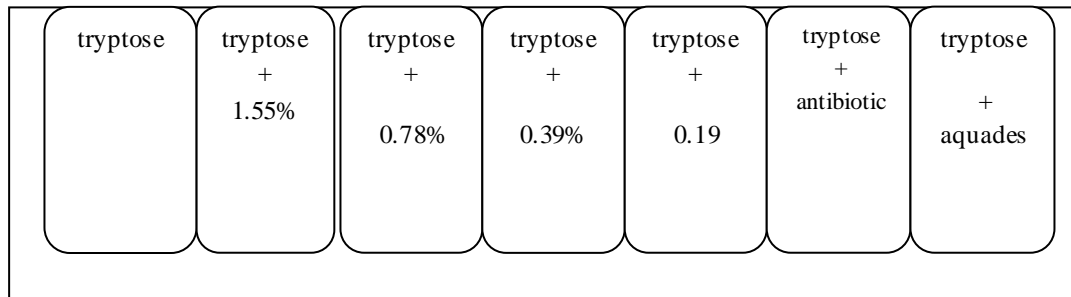
koloni *Porphyromonas gingivalis* dibiakan murni dengan menggunakan cakram agar darah diperoleh dari tersedia di Laboratorium Mikrobiologi balai laboratorium Kesehatan Yogyakarta. Bakteri dibiakan konsentrasi Bakteri  $10^6$ CFU/mm di inkubator selama 24 jam dengan suhu  $37^\circ\text{C}$ .

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri diambil dengan kawat ose steril kemudian diinokulasikan pada *Tryptose Phosphate Broth*. Bakteri dimasukkan ke dalam incubator dengan suhu  $37^\circ\text{C}$  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.

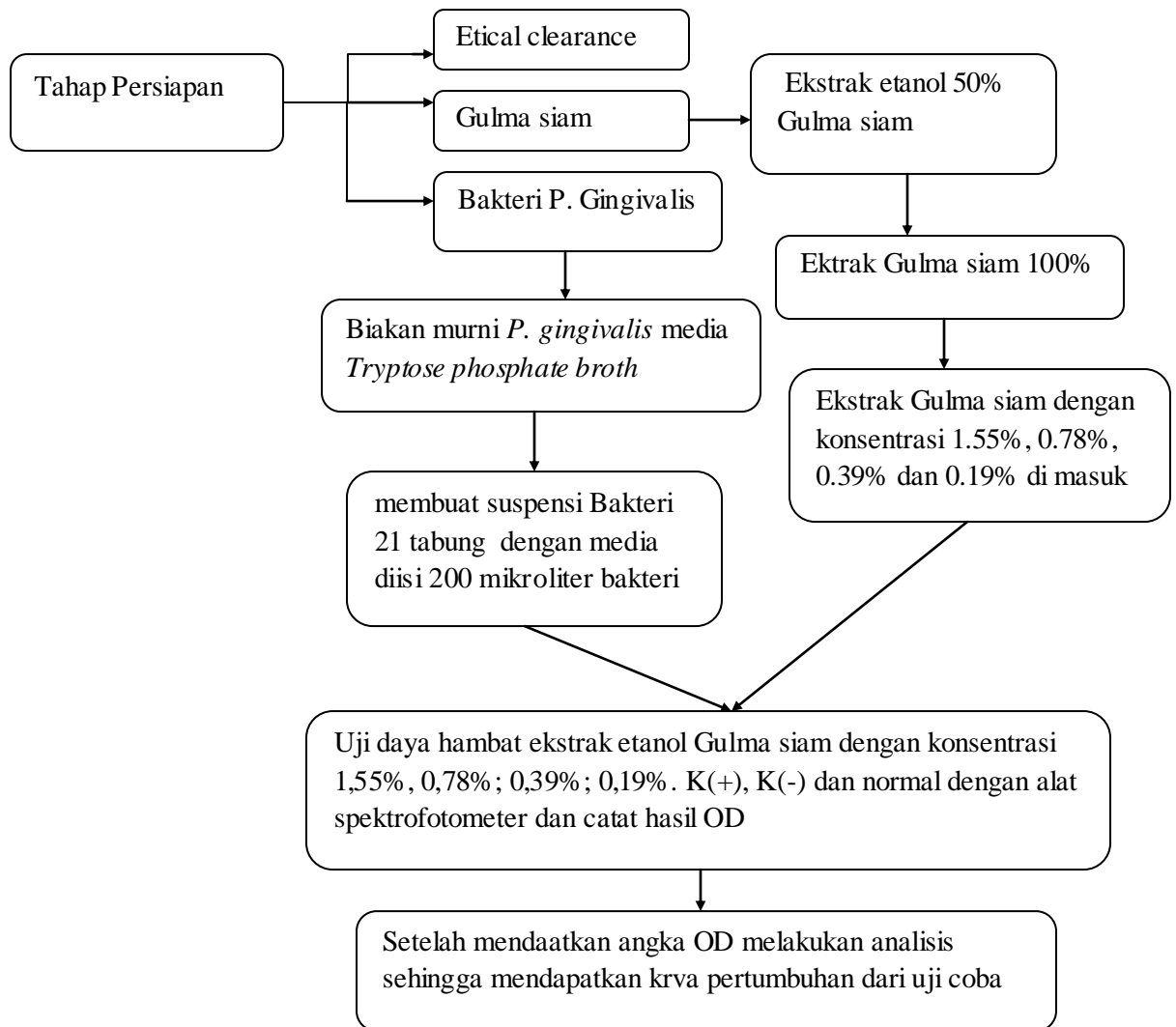


Gambar 4. Kontrol normal

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. Ujicoba 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*.

