

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

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

#### **B. Lokasi 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, Sampel dan Besar Sampel**

##### **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 Toksonomi Tumbuhan Fakultas Ilmu Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan metode maserasi dibuat di bagian

## 2. Bakteri Uji

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

## 3. Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan untuk penelitian tahap 1 berjumlah dua puluh dua terdiri dari enam kelompok yaitu empat kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun kersen (1%, 4%, 7% dan 10%), kelompok kontrol negatif (aquades steril) dan kelompok kontrol positif (antibiotik *eritromisin*) sedangkan untuk besar sampel yang digunakan untuk penelitian tahap 2 berjumlah tiga puluh lima terdiri dari tujuh kelompok yaitu lima kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun kersen (0,5%, 5%, 10%, 15% dan 20%), kelompok kontrol negatif (aquades steril), dan kelompok kontrol positif (antibiotik *eritromisin*). Setiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak lima kali yang dihitung menggunakan rumus Federer. Rumus Federer =  $(n-1)(t-1) \geq 15$  dengan  $t$

$t$  adalah jumlah kelompok perlakuan dan  $n$  adalah jumlah ulangan

$$6n \geq 21$$

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

$$n \geq 3,5$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, 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). Besar sampel dalam penelitian ada 35, terbagi menjadi 7 kelompok yaitu kelompok perlakuan yang berjumlah lima konsentrasi dengan 5 lubang sumuran dalam 1 cawan petri, kelompok kontrol positif dan negatif 2 lubang sumuran dalam 1 cawan petri, cawan pada kelompok perlakuan diulang sebanyak 5 kali sehingga dibutuhkan sebanyak 10 cawan petri.

#### **D. Variabel Penelitian**

##### **1. Variabel Pengaruh**

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

##### **2. Variabel Terpengaruh**

Bakteri *Lactobacillus acidophilus*.

##### **3. Variabel Terkendali**

a. Suhu inkubasi 37°C

b. Waktu inkubasi 24 jam

- d. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 1%, 4%, 7%, dan 10% (penelitian tahap 1) sedangkan konsentrasi 0,5%, 5%, 10%, 15% dan 20% (penelitian tahap 2)
  - e. Media pertumbuhan bakteri *Mueller Hinton Agar* (MHA)
  - f. Tumbuhan daun kersen (*Muntingia calabura* L.) diambil dari 1 pohon
4. Variabel tak terkendali
- a. Keterampilan operator

#### **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 50 $\mu$ 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 pada penelitian ini.
4. Maserasi adalah proses pengekstrakan dari simplisia menggunakan

5. Daya antibakteri adalah kemampuan suatu zat atau senyawa kimia yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau mematikan bakteri.
6. Metode difusi adalah suatu cara uji kepekaan bakteri yang menggunakan pembenihan padat yang diusapi dengan biakan bakteri.
7. 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.
8. *Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri asam laktat gram positif anaerob fakultatif. Bakteri tersebut diperoleh dari biakan yang tersedia di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.
9. Pertumbuhan adalah peningkatan jumlah semua komponen dari suatu organisme secara teratur.

## F. Instrumen Penelitian

### 1. Alat penelitian

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

### 2. Bahan Penelitian

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

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

## G. Cara Pengumpulan Data

### 1. Persiapan

Sebelum melakukan penelitian bersihkan alat – alat yang akan digunakan di bawah air mengalir lalu keringkan. Kemudian alat – alat tersebut di sterilisasi menggunakan *autoclave*. Siapkan alat yang sudah steril beserta bahan yang akan digunakan dalam penelitian di tempat yang mudah di jangkau.

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

Daun kersen dicuci sampai bersih dibawah air mengalir kemudian ditiriskan dan diproses menjadi simplisia. Daun kersen dikeringkan dalam oven dengan suhu 50 - 60°C selama 24 jam. Selanjutnya daun dibuat serbuk menggunakan mesin penyerbuk setelah itu serbuk daun kersen dimasukkan ke dalam maserator kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sampai seluruh serbuk terendam dan didiamkan selama 24 jam sambil terus diaduk. 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 dituangkan kedalam cawan penguap yang telah ditara lalu diuapkan di atas 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 dilakukan dengan tujuan untuk mencari konsentrasi minimal dari konsentrasi yang terdapat pada jurnal acuan untuk melakukan penelitian tahap 2, yaitu konsentrasi 1%, 4%, 7% dan 10%. Persiapan yang dilakukan mulai dari inkubasi bakteri *Lactobacillus acidophilus* pada suhu 37°C selama 24 jam. *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebagai media pertumbuhan bakteri yang sebelumnya disterilisasikan dalam labu dan didinginkan sampai suhu 40°-50°C, lalu dituangkan sebanyak 15 mL dalam cawan petri steril (diameter 6 mm) 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 *Mueller Hinton Agar* secara merata. Pindahkan bakteri dari satu tempat ke

meminimalkan media bakteri terkontaminasi oleh bakteri lain (Kartikasari *et al.*, 2008). Cawan petri yang berisi bakteri *Lactobacillus acidophilus* dibuat lubang sumuran menggunakan alat pelubang media. Siapkan dua cawan petri, cawan petri pertama berisi ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 1%, 4%, 7% dan 10% (pre penelitian) sebagai perlakuan, cawan petri kedua berisi aquades steril sebagai kontrol negatif dan antibiotik *eritromisin* 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 *eritromisin* 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 *eritromisin* sebagai kontrol positif.

#### b. Penelitian tahap 2

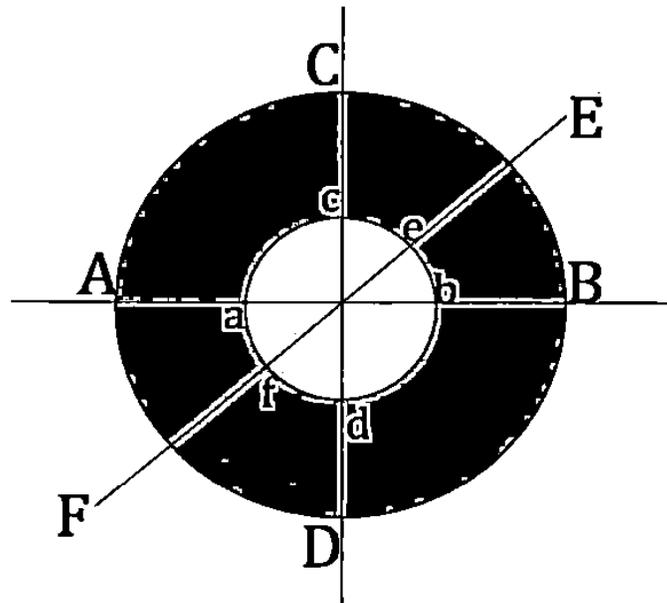
Penelitian tahap 2 bertujuan untuk mengetahui adanya daya antibakteri dan menentukan konsentrasi optimal dari konsentrasi 0,5%, 5%, 10%, 15%, dan 20% yang digunakan pada penelitian tahap 2. Inkubasi bakteri *Lactobacillus acidophilus* terlebih dahulu pada suhu 37°C selama 24 jam. Siapkan *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebagai

labu kemudian didinginkan sampai suhu 40°-50°C, lalu dituangkan sebanyak 15 mL dalam cawan petri steril (diameter 6 mm) 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 *Mueller Hinton Agar* secara merata. Pindahan bakteri dari satu tempat ke tempat yang lain dilakukan dekat dengan lampu spiritus agar meminimalkan media bakteri terkontaminasi oleh bakteri lain (Kartikasari *et al.*, 2008). Cawan petri yang berisi bakteri *Lactobacillus acidophilus* dibuat lubang sumuran menggunakan alat pelubang media. Dua cawan petri telah disiapkan, cawan petri pertama berisi ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 0,5%, 5%, 10%, 15% dan 20% (penelitian) sebagai perlakuan, cawan petri kedua berisi aquades steril sebagai kontrol negatif dan antibiotik *eritromisin* 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 µl per lubang sumuran, cawan petri kedua ditetesi 50 µl aquades sebagai kontrol negatif dan 50 µl antibiotik *eritromisin* sebagai kontrol positif. Cawan yang diisi dengan ekstrak. Cawan petri ditempatkan di inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan setelah itu akan

kemudian dibandingkan dengan aquades sebagai kontrol negatif dan antibiotik *eritromisin* 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 reliabel. 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,



Gambar 3. Pengukuran zona radikal

Keterangan gambar 3 :

A, B, C, D, E, dan F adalah titik terluar zona radikal

a, b, c, d, e, dan f adalah titik dalam zona radikal

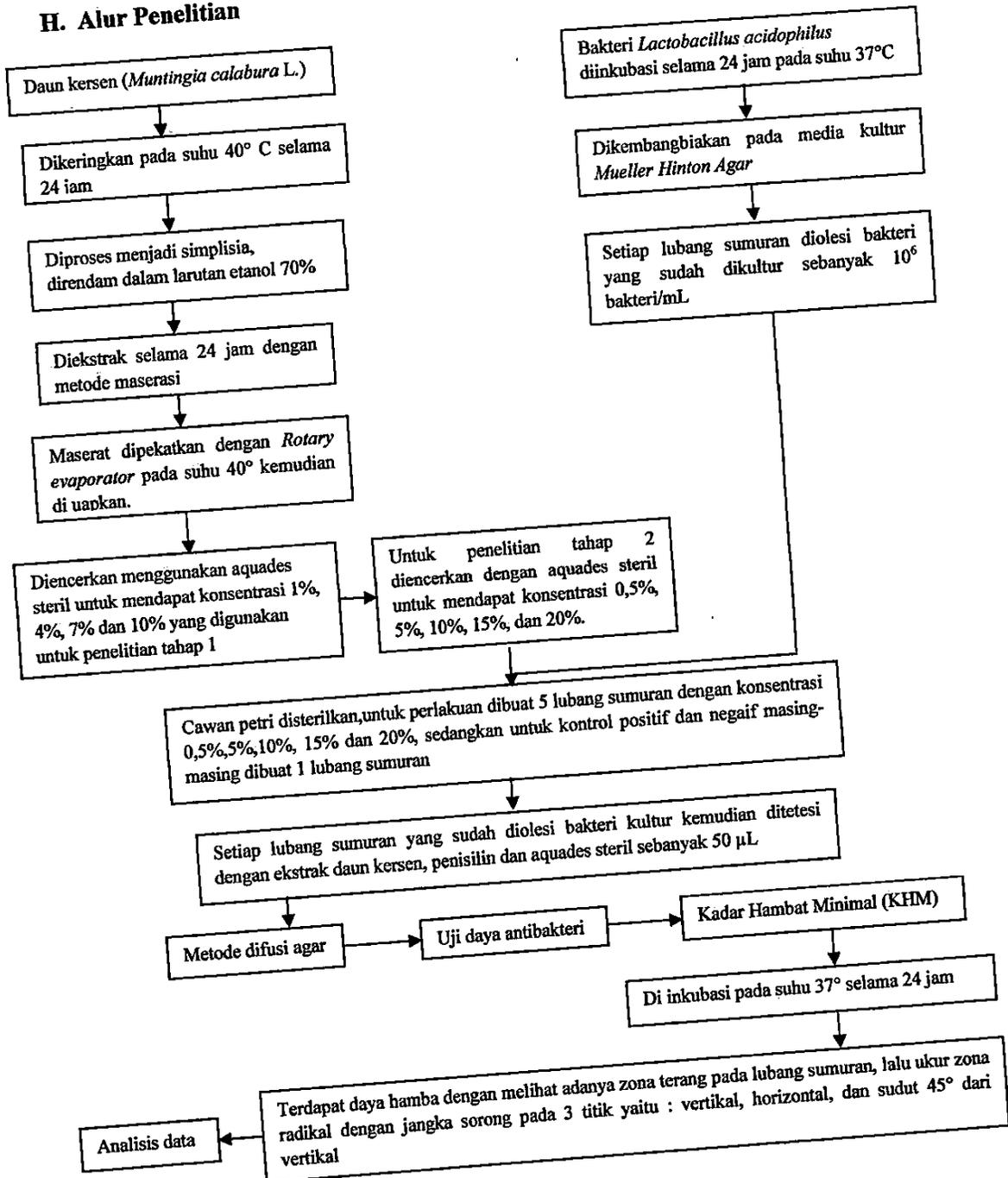
$$\text{Pengukuran pertama} = \frac{(AB-ab)}{2} \quad (1)$$

$$\text{Pengukuran kedua} = \frac{(CD-cd)}{2} \quad (2)$$

$$\text{Pengukuran ketiga} = \frac{(EF-ef)}{2} \quad (3)$$

... pengukuran (1)+(2)+(3)

## H. Alur Penelitian



Gambar 4. 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 *Lactobacillus acidophilus*.
3. Uji selanjutnya dari *one way ANOVA* adalah *Least Significant Difference*