

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Jenis dari penelitian ini adalah eksperimental laboratoris secara *in vitro* metode difusi.

#### **B. Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **1. Populasi Penelitian**

Populasi pada penelitian menggunakan akar putri malu yang didapat dari pekarangan di daerah sekitar selokan Mataram dan bakteri *Streptococcus mutans* didapat dari isolat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

##### **2. Sampel Penelitian**

Banyaknya sampel pada penelitian ini sebanyak 6 cawan petri berdasarkan pada penelitian sebelumnya (Wulandari dkk, 2011). Akar putri malu yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 3 kg.

#### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **1. Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah

akar putri malu di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada. Verifikasi bakteri *Streptococcus mutans* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

## 2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2012-Januari 2013.

## D. Variabel Penelitian

### 1. Variabel Pengaruh

Ekstrak akar putri malu dengan konsentrasi 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%.

### 2. Variabel Terpengaruh

Pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* pada media TSA (*Tryptone Soya Agar*).

### 3. Variabel Terkendali

a. Konsentrasi ekstrak etanol akar putri malu 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%.

b. Volume ekstrak etanol akar putri malu 50  $\mu$ l.

c. Diameter lubang sumuran 6 mm dan kedalaman 3 mm.

d. Media pertumbuhan bakteri menggunakan media TSA (*Tryptone Soya Agar*).

e. Konsentrasi bakteri  $10^8$  CFU/ml.

f. Suhu inkubasi  $37^{\circ}\text{C}$ .

- g. Waktu inkubasi 24 jam.
4. Variabel Tak Terkendali
- a. Penyebaran bakteri yang tidak merata.

#### **E. Definisi Operasional**

1. *Streptococcus mutans* adalah bakteri gram positif, bersifat nonmotil (tidak bergerak), bakteri anaerob fakultatif. Memiliki bentuk kokus yang sendirian berbentuk bulat atau bulat telur yang tersusun dalam rantai (Nugraha, 2008).
2. Ekstrak etanol akar putri malu merupakan ekstrak yang didapat dari proses pensarian akar putri malu dengan cara maserasi menggunakan etanol sebagai bahan penyari (Depkes, 2000).
3. Zona radikal adalah daerah di sekitar sumbu yang sama sekali tidak

- g. Kapas lidi steril
  - h. Mikropipet 50  $\mu$ l
  - i. *Waterbath*
  - j. Jangka sorong (*sliding calipers*)
  - k. Masker
  - l. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi
  - m. Neraca timbangan
  - n. Sarung tangan
  - o. *Vaccum Rotary Evaporator*
  - p. Mesin penyerbuk
  - q. Perforator (alat pelubang media)
2. Bahan penelitian
- a. Ekstrak akar putri malu konsentrasi 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%
  - b. Bakteri *streptococcus mutans*
  - c. Media *Brain Heart Infusion* (BHI)
  - d. Media TSA (*Tryptone Soya Agar*)
  - e. Air aquades steril
  - f. Larutan etanol 70%
  - g. Larutan NaCl

## G. Pengumpulan Data

### 1. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak akar putri malu dilakukan dengan teknik maserasi. Akar putri malu dicuci sampai bersih kemudian dikeringkan di dalam almari pengering pada temperatur 45<sup>0</sup>C selama 48 jam. Setelah kering kemudian diserbuk menggunakan mesin penyerbuk dan disaring, kemudian dimaserasi menggunakan etanol 70%, diaduk selama 30 menit kemudian didiamkan selama 24 jam. Tahap berikutnya disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat dan residu. Filtrat diuapkan sampai etanol menguap dan didapatkan ekstrak akar putri malu yang kental kemudian diuapkan sekali lagi dengan *waterbath*, sehingga didapat ekstrak akar putri malu dengan berat konstan (Kartikasari dkk, 2008).

### 2. Pengenceran Ekstrak

Ekstrak akar putri malu dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% diperoleh dengan cara pengenceran menggunakan aquades steril dengan rumus:

$$N1.V1 = N2.V2$$

Keterangan rumus:

N1 = konsentrasi ekstrak etanol akar putri malu.

N2 = konsentrasi ekstrak etanol akar putri malu dengan konsentrasi

V1 = volume ekstrak akar putri malu yang ditambahkan dengan aquades (ml).

V2 = volume ekstrak akar putri malu yang diinginkan (ml).

Maka didapatkan hasil perhitungan sebagai berikut :

Konsentrasi ekstrak 0% = 10 ml aquades steril sebagai kontrol negatif.

Konsentrasi ekstrak 10% = 0,1 ml larutan ekstrak kental + 9,9 ml aquades steril.

Konsentrasi ekstrak 20% = 0,2 ml larutan ekstrak kental + 9,8 ml aquades steril.

Konsentrasi ekstrak 30% = 0,3 ml larutan ekstrak kental + 9,7 ml aquades steril.

Konsentrasi ekstrak 40% = 0,4 ml larutan ekstrak kental + 9,6 ml aquades steril.

Konsentrasi ekstrak 50% = 0,5 ml larutan ekstrak kental + 9,5 ml aquades steril.

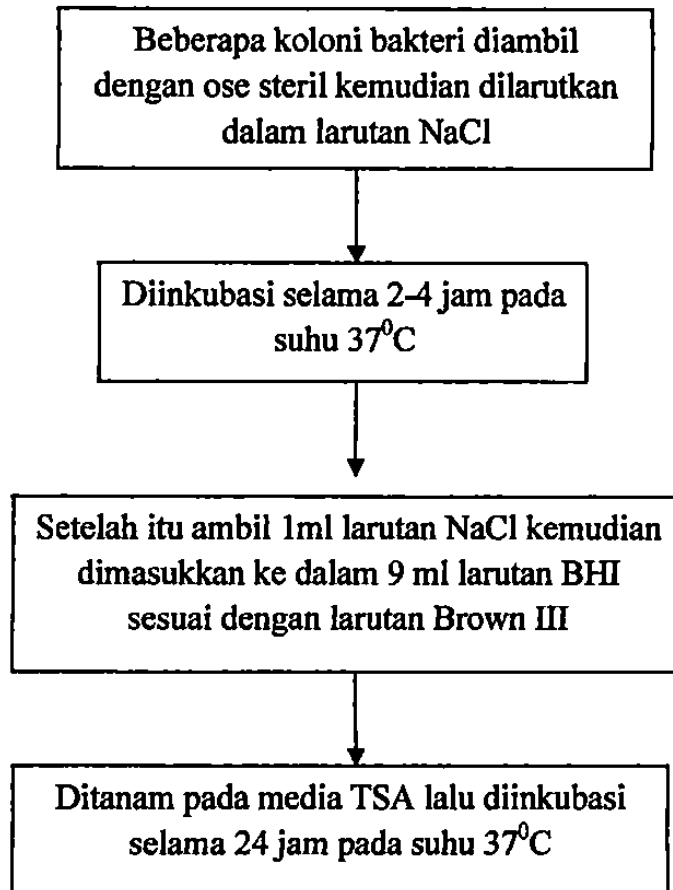
Konsentrasi ekstrak 60% = 0,6 ml larutan ekstrak kental + 9,4 ml aquades steril.

Konsentrasi ekstrak 70% = 0,7 ml larutan ekstrak kental + 9,3 ml aquades steril.

Konsentrasi ekstrak 80% = 0,8 ml larutan ekstrak kental + 9,2 ml aquades steril.

Konsentrasi ekstrak 90% = 0,9 ml larutan ekstrak kental + 9,1 ml aquades steril.

### 3. Pembiakan Bakteri *Streptococcus mutans*

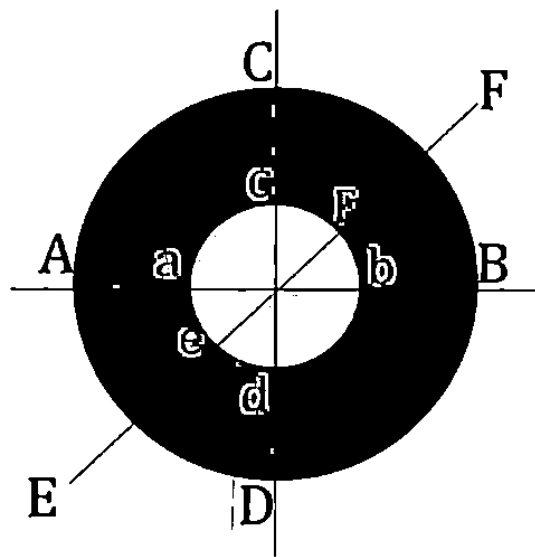


(Kartikasari dkk, 2008).

### 4. Pengukuran Zona Hambat

Zona irradikal adalah daerah sumuran yang pertumbuhan bakterinya dihambat tetapi tidak dimatikan sedangkan zona radikal adalah daerah sumuran sama sekali tidak ditemukan pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini pengukuran dilakukan di zona radikal yaitu dengan mengambil 3 garis yang melalui titik pusat lubang sumuran. Pada pengukuran satu menggunakan diameter daerah hambat (A-B) dikurangi diameter sumuran (a-b) dibagi dua. Pengukuran dua menggunakan diameter daerah hambat (C-D) dikurangi diameter sumuran (c-d) dibagi dua. Pengukuran tiga menggunakan diameter

daerah hambat (E-F) dikurangi diameter sumuran (e-f) dibagi dua. Kemudian diperoleh data pengukuran satu, dua, tiga yang diambil reratanya, maka diperoleh data daerah hambat. Pengukuran minimal dilakukan sebanyak dua kali (Kartikasari dkk, 2008).



$$\text{Pengukuran satu (1)} = (AB - ab) : 2$$

$$\text{Pengukuran satu (2)} = (CD - cd) : 2$$

$$\text{Pengukuran satu (3)} = (EF - ef) : 2$$

Pengukuran zona radikal satu lubang sumuran :

$$\frac{\text{Pengukuran 1} + 2 + 3}{3}$$

Keterangan :

Aa, Bb, Cc, Dd, Ee, Ff : zona radikal

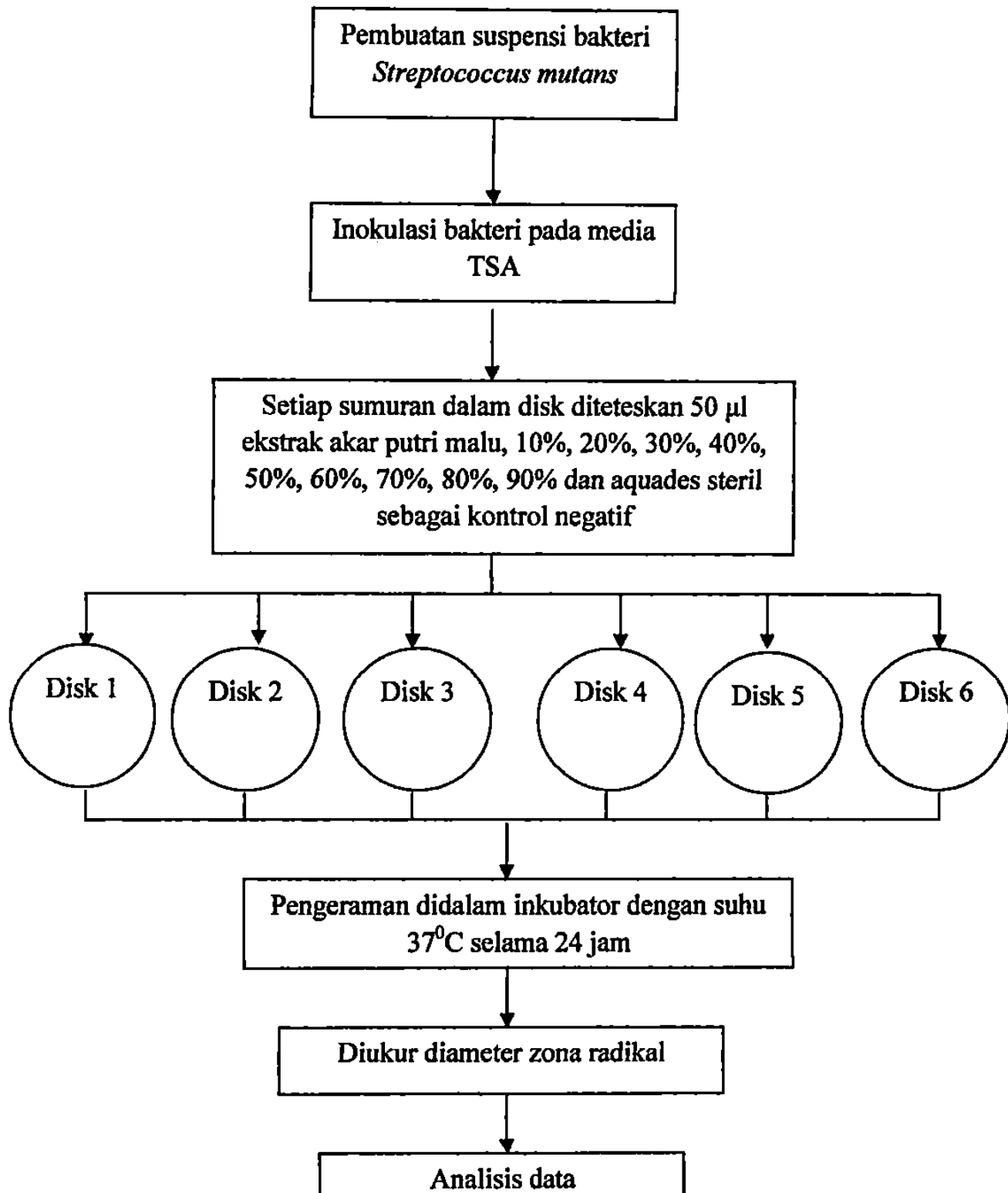
ab, cd, ef : diameter lubang sumuran



## H. Analisis Data

Data penelitian ini dilakukan analisis data parametrik dengan uji One-Way Anova untuk mengetahui daya hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* terhadap ekstrak etanol akar putri malu dan uji Post-hoc  $LSD_{0,05}$  dilakukan untuk mengetahui perbedaan rerata ekstrak etanol akar putri malu konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

## I. Alur Penelitian



## **J. Etik Penelitian**

Berdasarkan surat keterangan kelayakan etika penelitian nomor : 313/EP-FKIK UMY/IX/2012, komisi etika penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta telah mengkaji permohonan kelayakan etika penelitian “ Pengaruh Efek Antibakteri Ekstrak Akar Putri Malu (*Mimosa pudica* L.) terhadap *Streptococcus mutans* (*in vitro*) pada Konsentrasi yang Berbeda” pada tanggal 21 September 2012 dengan hasil layak etik