

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Desain penelitian eksperimental murni merupakan desain yang digunakan pada penelitian ini. Uji aktivitas penghambatan biofilm ekstrak etanol daun sintrong dilakukan menggunakan metode *tissue culture plate/microtiter plate biofilm essay*. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan *microplate reader* untuk mengetahui nilai OD yang didapatkan pada penelitian ini dengan menggunakan 6 konsentrasi dan 3 kontrol.

B. Subjek dan Objek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah ekstrak daun sintrong yang berasal dari Kalimantan Timur. Objek penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* dan biofilm.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam rentang waktu Februari hingga Juni 2022, yang dilaksanakan di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

D. Definisi Operasional

1. *Streptococcus mutans* merupakan bakteri gram positif yang menyebabkan kerusakan gigi.
2. Ekstrak etanol daun sintrong merupakan hasil produk dari pengambilan zat aktif daun sintrong melalui proses maserasi dengan pelarut etanol.
3. Uji penghambatan terhadap pembentukan biofilm daun sintrong dilakukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun sintrong dalam menghambat *Streptococcus mutans*
4. MBIC merupakan konsentrasi terendah yang dimiliki ekstrak etanol daun sintrong yang dapat menghambat pertumbuhan biofilm *Streptococcus mutans*.

E. Instrument Penelitian

Alat-alat yang digunakan meliputi neraca analitik, blender, corong kaca, *beaker glass*, erlenmayer, *rotary evaporator*, cawan porselen, *waterbath*, spatel, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, autoklaf, bunsen, gelas ukur, pipet, mikropipet, *blue and yellow tip*, batang pengaduk, *hotplate*, inkubator, *microplate 96 wells*, *microplate reader*, *laminar air flow*.

Bahan-bahan yang digunakan meliputi daun sintrong, etanol 96%, bakteri *Streptococcus mutans*, media NA, media NB, Aquadest, Crystal violet 1%, Klorheksidin 0,2%.

F. Metode Pengumpulan Data

1. Pengumpulan dan Pengolahan Bahan Uji

a. Pengumpulan Bahan Uji

Pengumpulan bahan uji dilakukan secara purposif yaitu tanpa membandingkan dengan tumbuhan dari daerah lain. Bahan tumbuhan yang digunakan adalah daun sintrong yang berasal dari Kalimantan Timur (Sari, 2020).

b. Determinasi Tanaman Uji

Tanaman uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun sintrong dideterminasi di Laboratorium Ekologi dan Konservasi Biodiversitas Hutan Tropis Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman (Sari, 2020).

c. Pengolahan Bahan Uji

- 1) Diambil bagian daun sintrong dan dipisahkan dari batang dan tangkai daunnya.
- 2) Daun sintrong dicuci bersih untuk menghilangkan kotoran-kotoran menggunakan air mengalir dan diletakkan dalam wadah.
- 3) Dikeringkan daun sintrong dengan menjemur dibawah sinar matahari.

4) Setelah dipastikan daun sintrong tersebut kering, dihaluskan daun sintrong menggunakan blender hingga menjadi serbuk (simplisia).

5) Disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup rapat (Suci, 2020).

2. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sintrong

a. Disiapkan alat dan bahan yang digunakan.

b. Ditimbang serbuk daun sintrong sebanyak 500 gram lalu dimasukkan kedalam toples kaca.

c. Ditambahkan etanol 96% sebanyak 3 liter dimasukkan kedalam toples kaca.

d. Toples kaca ditutup dengan alumunium foil.

e. Diekstraksi secara maserasi selama 3 hari dengan suhu kamar dan dilakukan pengadukan secara berkala.

f. Disaring menggunakan kain agar terpisah dari ampasnya.

g. Dilakukan remaserasi selama 3 hari dengan suhu kamar.

h. Disaring menggunakan kertas saring.

i. Filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* lalu dipekatkan menggunakan *waterbath* (Suci, 2020).

3. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sintrong

- 10% : 0,02 gram ekstrak + 1,98 ml Aquadest

- 30% : 0,06 gram ekstrak + 1,94 ml Aquadest

- 50% : 0,10 gram ekstrak + 1,90 ml Aquadest

- 70% : 0,14 gram ekstrak + 1,86 ml Aquadest

- 90% : 0,18 gram ekstrak + 1,82 ml Aquadest

- 100% : 0,20 gram ekstrak + 1,80 ml Aquadest (Sulistiyarsi, 2018).

4. Persiapan dan Uji Aktivitas Penghambatan Biofilm

a. Sterilisasi Alat

1) Alat-alat yang akan digunakan dicuci dan dikeringkan.

- 2) Alat-alat gelas dibungkus menggunakan kertas sampul berwarna coklat, sedangkan bagian mulut erlenmayer yang berisi media ditutup menggunakan aluminium foil.
- 3) Semua alat yang ingin disterilkan dimasukkan kedalam autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit.
- 4) Sterilkan jarum ose dengan pemijaran pada Bunsen.
- 5) Dibersihkan *Laminar Air Flow* dan disemprotkan etanol 70%, sebelum *Laminar Air Flow* digunakan didiamkan terlebih dahulu selama 15 menit (Suci, 2020).

b. Pembuatan Media

1) Media NA (*Nutrient Agar*)

- a) Ditimbang NA sebanyak 2,4 gram.
- b) Dimasukkan NA kedalam erlenmayer dan ditambahkan Aquadest sebanyak 120 ml.
- c) Dipanaskan diatas *hot plate* aduk hingga terlarut homogen dan mendidih.
- d) Erlenmayer ditutup dengan aluminium foil dan disterilkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Mpila, 2012).

2) Media NB (*Nutrient Broth*)

- a) Ditimbang NB sebanyak 0,8 gram.
- b) Dimasukkan NB kedalam erlenmayer dan ditambahkan Aquadest sebanyak 100 ml.
- c) Dipanaskan diatas *hot plate* aduk hingga terlarut homogen dan mendidih.
- d) Erlenmayer ditutup dengan aluminium foil dan disterilkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Mpila, 2012).

c. Pembuatan Subkultur Bakteri

- 1) Media NA yang telah steril dan dingin dituang kedalam cawan petri.
- 2) Dibiarkan hingga media memadat.

- 3) Kultur murni bakteri *Streptococcus mutans* diosekan ke permukaan media NA.
 - 4) Media yang terisi bakteri diinkubasi didalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Aviantina, 2019).
- d. Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan *Mc Farland*
- 1) Larutan H₂SO₄ sebanyak 99,5 ml dicampur dengan larutan BaCl₂.2H₂O sebanyak 0,5 ml ke dalam erlenmayer.
 - 2) Dikocok hingga terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan selanjutnya digunakan sebagai standar pada kekeruhan suspensi bakteri uji (Dima, 2016).
- e. Pembuatan Suspensi Bakteri
- 1) Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah di inkubasi diambil dengan jarum ose.
 - 2) Dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang terdapat 2 ml NaCl 0,9% (0,18 gram dilarutkan dalam 20 ml air) lalu di vortex.
 - 3) Diamati kekeruhan pada tabung reaksi dan dibandingkan dengan standar *Mc Farland* (Dima, 2016).
- f. Uji Aktivitas Penghambatan Biofilm
- 1) Disiapkan alat dan bahan.
 - 2) Dimasukkan media NB sebanyak 75 µl ke tiap *wells*.
 - 3) Dimasukkan ekstrak etanol daun sintrong dengan berbagai macam konsentrasi (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%) sebanyak 20 µl, kontrol positif (Klorheksidin 0,2%) sebanyak 20 µl, kontrol negatif (tanpa penambahan ekstrak) sebanyak 20 µl kedalam *wells* sesuai ketentuan.
 - 4) Dimasukkan bakteri *Streptococcus mutans* sebanyak 5 µl ke tiap *wells* kecuali pada kontrol media.
 - 5) Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan 48 jam.
 - 6) Setelah diinkubasi dicuci *microplate* menggunakan Aquadest sebanyak 3 kali dan biarkan mengering.
 - 7) Dimasukkan Crystal violet 1% sebanyak 125 µl kedalam tiap *wells* dan biarkan selama 15 menit.

8) Dicuci *microplate* menggunakan Aquadest sebanyak 3 kali dan biarkan mengering.

9) Dimasukkan etanol 96% sebanyak 200 µl kedalam tiap *wells* dan dilakukan pembacaan OD pada panjang gelombang 620 nm menggunakan *microplate reader* (Hamzah, 2021).

5. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Minimal Penghambatan Biofilm

Konsentrasi ekstrak minimal penghambatan biofilm yang dihitung pada penelitian ini terdiri dari MBIC₅₀. MBIC₅₀ ditentukan dari konsentrasi ekstrak daun sintrong terendah yang dapat menghambat pertumbuhan 50% biofilm *Streptococcus mutans*. MBIC dihitung untuk mengetahui konsentrasi ekstrak minimal penghambatan biofilm. Dalam menentukan konsentrasi ekstrak terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri 50% disebut MBIC₅₀ (Abidah, 2020).

G. Teknik Analisis Data

1. Perhitungan MBIC

$$\% \text{Penghambatan} = \frac{OD_{kn} - OD_{uji}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

$$MBIC_{50} = 50\%$$

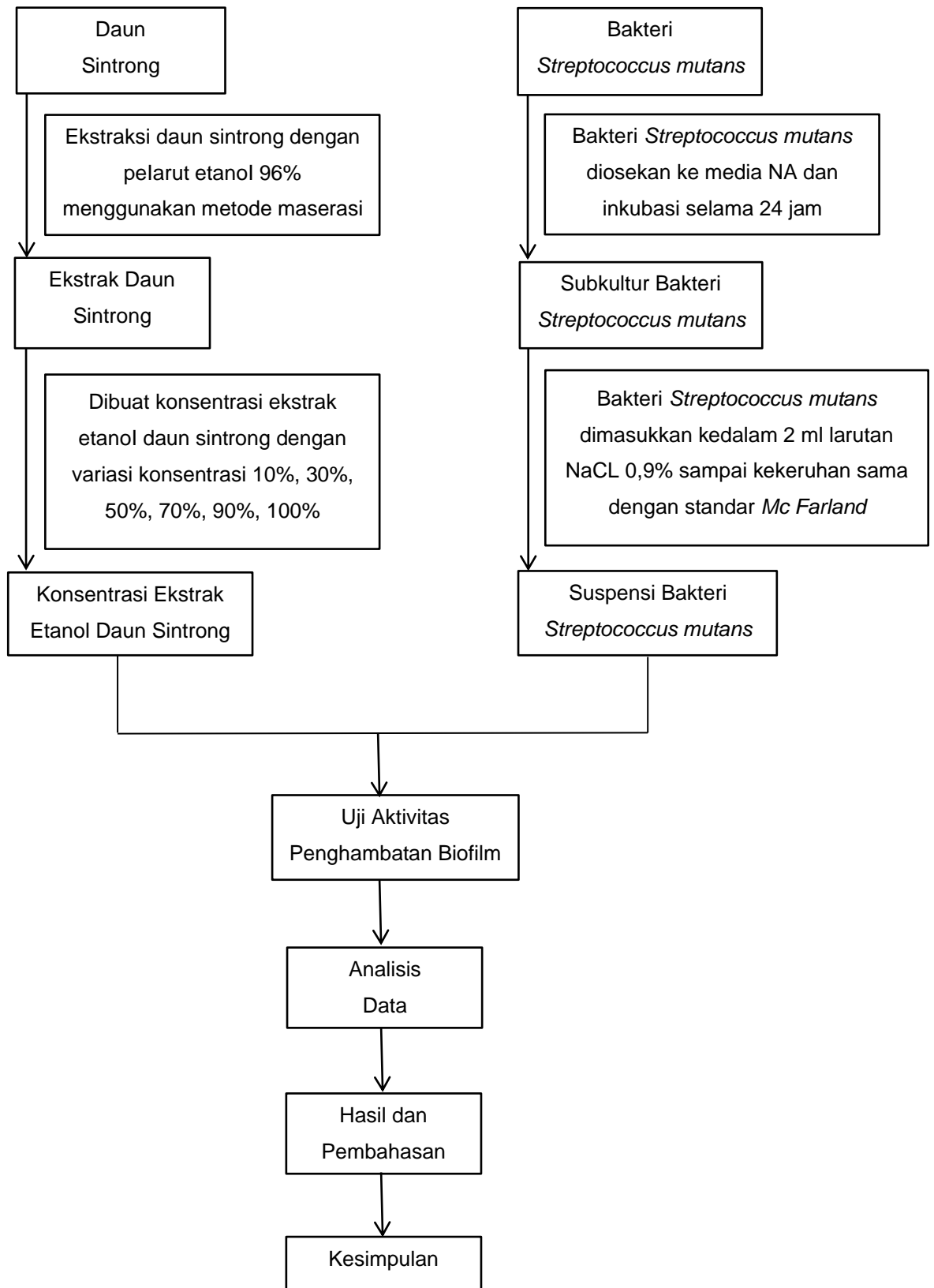
2. Analisis Menggunakan SPSS

SPSS merupakan aplikasi analisis data yang digunakan pada penelitian ini. Analisis data dilakukan untuk menguji normalitas, setelah itu dilakukan uji homogenitas lalu dilakukan uji Anova. Jika nilai $p < 0,05$ dilanjutkan dengan melakukan uji *Post Hoc* (Cahyono, 2018).

H. Etika Penelitian

Penelitian ini mengikuti kaidah yang sesuai dengan etika penelitian yang telah ditetapkan dan sampel pada penelitian ini tidak menggunakan hewan uji maupun manusia.

I. Alur Jalannya Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

