

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Metode kuantitatif eksperimental diterapkan dalam penelitian ini. Strategi ini dipilih karena melibatkan melakukan eksperimen di lingkungan yang terkendali dan melakukan analisis kuantitatif dengan bantuan perangkat lunak statistik. Efek terapi selektif dapat ditentukan dengan penelitian eksperimental. Dalam konteks penyelidikan ilmiah istilah metode penelitian kuantitatif mengacu pada pendekatan yang berakar pada tradisi positivis dan digunakan untuk mempelajari populasi besar atau kecil, sampel yang representatif melalui penggunaan instrumen penelitian, prosedur pengambilan sampel acak, dan analisis statistik dari data yang dikumpulkan (Sugiyono, 2016).

Penelitian dilakukan dengan membuat ekstrak etanol daun sintrong dengan konsentrasi (10%,30%, 50%, 70%, 90% dan 100%) kemudian dilakukan uji eradikasi biofilm terhadap bakteri *streptococcus mutans*, kelompok kontrol negatif adalah kelompok yang tidak dapat perlakuan berupa pemberian ekstrak, kelompok kontrol positif adalah kelompok yang mendapatkan perlakuan berupa pemberian chlorhexidine 2% beserta ekstrak etanol daun sintrong dengan konsentrasi yang ditetapkan.

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek

Subjek dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sintrong yang dibuat oleh peneliti di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

2. Objek

Objek penelitian ini adalah aktivitas eradikasi biofilm dari ekstrak etanol daun sintrong terhadap *Streptococcus mutans*.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai dengan Januari 2022. Tempat penelitian dilaksanakan di Laboratorium

Teknologi Farmasi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Konsentrasi ekstrak etanol daun sintrong.

2. Variabel Terikat

Aktivitas eradikasi biofilm dari ekstrak etanol daun sintrong yang dapat dilihat dari nilai MBEC.

3. Variabel Terkendali

Suhu inkubasi, kepadatan media, lama waktu inkubasi, waktu penumbuhan bakteri uji.

E. Definisi Operasional

1. *Streptococcus mutans* adalah mikroorganisme yang berperan besar dalam pembentukan karies gigi. *Streptococcus mutans* yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Streptococcus mutans* yang didapatkan dari universitas muhammadiyah kalimantan timur.
2. Biofilm adalah koloni mikroba yang terbentuk di permukaan dan terdiri dari sel-sel yang melekat satu sama lain oleh matriks zat polimer ekstraseluler. Pada penelitian ini eradikasi atau degradasi biofilm akan diuji dengan menggunakan metode microtiter plate.
3. Ekstrak etanol daun sintrong adalah hasil maserasi di laboratorium kimia bahan alam fakultas farmasi universitas muhammadiyah kalimantan timur menggunakan pelarut etanol 96%.
4. Metode microtiter plate digunakan untuk mendeteksi pembentukan biofilm dan menguji efek ekstrak etanol daun sintrong dalam mendegradasi biofilm *streptococcus mutans*. Pada penelitian ini menggunakan 96-well plate.
5. Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC) MB EC50 adalah merupakan konsentrasi minimal suatu senyawa yang dapat mengeradikasi 50 % biofilm yang terbentuk yang nilai rerata optical densitasnya berada dibawah nilai cut off point MC50 (Pierce *et al.* , 2010).

F. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat-alat yang digunakan yaitu pipet mikro, neraca analitik, pipet mikro, autoklaf, oven, labu takar, alat-alat gelas, cawan petri, inkubator, jarum ose, bunsen, cawan porselin, *rotary evaporator*, kertas saring, toples kaca, kertas coklat, batang pengaduk, *water bath*, *centrifuge*, *centrifuge tube*, *vortex mixer* dan *Laminar Air Flow* (LAF).

2. Bahan

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur *streptococcus mutans* yang merupakan koleksi dari Laboratorium umkt dan daun sintrong yang diperoleh dari provinsi Kalimantan timur. Bahan lain yang digunakan Etanol 96%, crystal violet 1%, akuades, media NA, media nutrient NB air suling steril, kristal violet (1% dalam aquades), BaCl₂ dan H₂S₀₄.

G. Metode Pengumpulan Data

1. Pengambilan Sampel Daun

Sampel yang digunakan yaitu daun sintrong dari Kebun, Kabupaten Kutai Timur, Kalimantan Timur. Daun yang diambil adalah daun hijau yang segar.

2. Pengolahan Sampel

Daun sintrong yang dipetik dibersihkan, dibuang kotorannya, dicuci dengan air mengalir, dan dikeringkan di tempat yang gelap dan sejuk serta terhindar dari sinar matahari langsung. Bahan tersebut kemudian siap untuk diekstraksi setelah dikeringkan dan dijadikan bubuk.

3. Ekstraksi Sampel

Etanol 96% digunakan sebagai pelarut. Serbuk daun sintrong yang telah kering dimasukkan ke dalam wadah maserasi (toples kaca) dan ditimbang sebanyak 500 gram sebelum digenangi dengan etanol 96% dan ditutup rapat. Aduk sesekali selama tiga periode 24 jam. Filter digunakan untuk menghilangkan sedimen dari cairan.

Pulp diproses ulang dengan maserasi melalui filter yang sama. Itu terjadi tiga kali berturut-turut. Rotary evaporator digunakan untuk mengkonsentrasikan ekstrak daun sintrong yang diperoleh. Selain itu, ekstrak yang diisolasi adalah ekstrak etanol kental yang diperoleh melalui aerasi.

4. Pengujian Eradikasi biofilm dari Ekstrak Etanol Daun Sintrong

Pengujian dilakukan dengan microtiter plate flat bottom polystyrene 96 wells. Media yang digunakan adalah nutrient broth kemudian ditambahkan suspensi bakteri *streptococcus mutans* dan diinkubasi selama 48 jam setelah diinkubasi ditambahkan ekstrak daun sintrong dengan variasi konsentrasi 0,10,30,50,70,90 dan 100% (v/v) yang dimasukkan pada masing masing well. Suspensi uji kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah inkubasi, microplate dibilas tiga kali dengan air mengalir, kemudian ditambahkan 125 µL larutan Crystalviolet 1% ke setiap sumur dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Setelah inkubasi, microplate dibersihkan tiga kali dengan air mengalir dengan cara yang sama seperti sebelumnya. Masing-masing well diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu kamar setelah ditambahkan 200 µL larutan etanol 96%. Pengukuran *Optical Density* (OD) dilakukan pada panjang gelombang 620 nm. Hasil pengujian *Optical Density* (OD) dibaca dengan menggunakan Bio-rad microplate reader Benchmark (Hamzah, 2020).

H. Teknik Analisis Data

Pembacaan optical density (OD) dilakukan dengan iMark Bio Rad microplate reader pada panjang gelombang 595 nm.

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{\text{OD kontrol negatif} - \text{OD perlakuan}}{\text{OD kontrol negatif}} \times 100\%$$

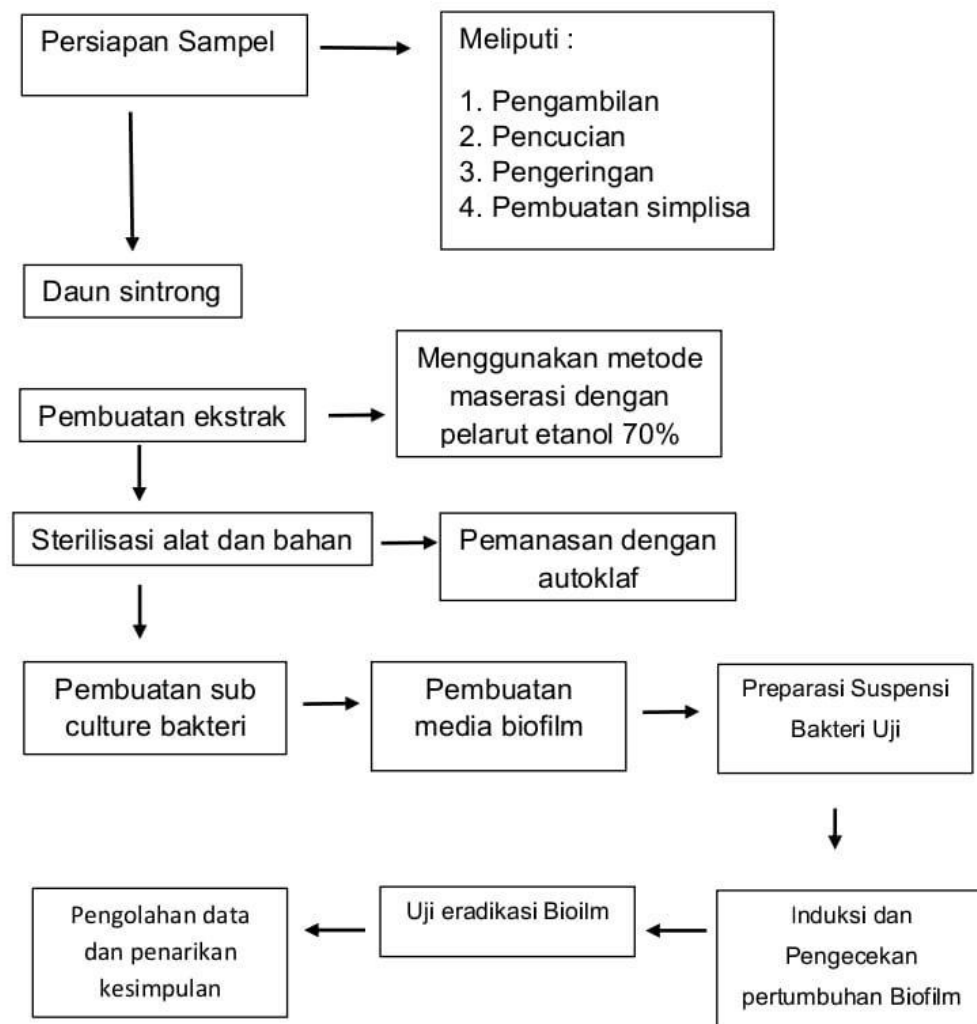
Data hasil dianalisis menggunakan perangkat lunak Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) menggunakan uji ANOVA. Semua nilai dinyatakan sebagai mean ± standar deviasi (SD) dari percobaan rangkap tiga.

Pada pengujian spss dilakukan 4 uji yaitu pengujian normalitas, homogenitas, anova dan post hoc test. Signifikansi statistik data ditentukan dengan menggunakan ANOVA, dilanjutkan dengan uji Normalitas menggunakan uji Shapiro - Wilk. Perbedaan dianggap signifikan dengan nilai P 0,05 atau kurang (Hamzah *et al.*, 2018).

I. 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.

J. Alur Jalannya Penelitian



Gambar 3. 1. Alur Jalannya Penelitian

