

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan pemberian perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) sebagai daya antimikroba pada mikroba mulut. Rancangan penelitian eksperimental yang digunakan adalah *Post Test Only Control Design* (Sugiyono 2014).

B. Desain Penelitian

R	P1	O1
R	P2	O2
R	P3	O3
R	P4	O4
R	P5	O5
R	P6	O6

Gambar 3.1 Desain Post Test Only Control Design

Yang dimodifikasi (Sugiyono, 2014)

Keterangan:

R = Random

P1 = Perlakuan dengan Ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi 100%

P2 = Perlakuan dengan Ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi 75%

P3 = Perlakuan dengan Ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi 50%

P4 = Perlakuan dengan Ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi 25%

P5 = Perlakuan kontrol negatif dengan pemberiaan aquades steril tanpa menggunakan ekstrak daun kenikir

P6 = Perlakuan kontrol positif dengan pemberiaan antiseptic listerin tanpa menggunakan ekstrak daun kenikir

- O1 = Pengamatan pertumbuhan koloni mikroba mulut pada kelompok P1
- O2 = Pengamatan pertumbuhan koloni mikroba mulut pada kelompok P2
- O3 = Pengamatan pertumbuhan koloni mikroba mulut pada kelompok P3
- O4 = Pengamatan pertumbuhan koloni mikroba mulut pada kelompok P4
- O5 = Pengamatan pertumbuhan koloni mikroba mulut pada kelompok P5
- O6 = Pengamatan pertumbuhan koloni mikroba mulut pada kelompok P6

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Pengujian antimikroba mulut ini dilaksanakan di Laboratorium Universitas Muhammadiyah Surabaya, sedangkan pembuatan ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) ini dilaksanakan di Laboratorium ITD Universitas Airlangga Kampus C Jl. Mulyorejo Surabaya Jawa Timur.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada tanggal 14 Mei – 17 Mei 2018 untuk pembuatan ekstrak daun kenikir (*Cosmos Caudatus*) kemudian dilanjutkan pemeriksaan uji daya antimikroba mulut dari ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) pada tanggal 24 – 25 Mei 2018.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah mikroba mulut yang di tanam dalam Media Muler Hinton Agar. Mikroba biakan murni yang di peroleh dari rongga mulut. Dan daun kenikir (*Cosmos Caudatus*) yang diperoleh dari pasar gersikan Surabaya.

2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan mikroba mulut, pada Media Muler Hinton Agar sebanyak 24 cawan petri, dalam penelitian ini terdapat 4 kali pengulangan yang diperoleh dari perhitungan rumus (Alimul, 2010).

$$(r-1)(t-1) > 15$$

r = banyak pengulangan

t = perlakuan

$$(r-1)(t-1) \leq 15$$

$$(r-1)(6-1) \leq 15$$

$$(r-1)(5) \leq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 20/5$$

$$r = 4$$

Berdasarkan perhitungan dengan rumus diatas, maka diperoleh banyak pengulangan (r) = 6 dan jumlah perlakuan (t) = 4, maka jumlah sampel keseluruhan adalah 24 petridis.

E. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Variabel Bebas : Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dengan konsentrasi 100%,75%, 50%, dan 25%
- b. Variabel Terikat : Daya antimikroba mulut
- c. Variabel Kontrol :Volume suspensi mikroba, umur biakan mikroba, suhu dan lama inkubasi, sterilisasi alat, media pertumbuhan dan jangka waktu pengamatan

2. Definisi Operasional Variabel

Definisi Operasional Variabel dalam penelitian ini adalah:

- a. Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) adalah hasil ekstraksi daun kering yang telah di haluskan menggunakan blender dan ditambah dengan pelarut etanol 96% dengan menggunakan rotariepavorator sehingga diperoleh ekstrak daun kenikir Dalam bentuk kental, hasil dari ekstrak kental di anggap ekstrak daun kenikir 100%. Dari hasil penelitian ini menguanakan ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi 100%, 75%, 50% dan 25%. Konsentrasi ekstrak daun kenikir menggunakan skala ordinal sebagai berikut:

Konsentrasi ekstrak daun kenikir 100% tanpa mencampur aquades

Konsentrasi ekstrak daun kenikir 75% didapat dengan mencampur : 75 ml (Ekstrak 100%) +25 ml aquades

Konsentrasi ekstrak daun kenikir 50% didapat dengan mencampur : 50 ml (Ekstrak 100%) +50 ml aquades

Konsentrasi ekstrak daun kenikir 25% didapat dengan mencampur : 25 ml (Ekstrak 100%) +75 ml aquades

Konsentrasi ekstrak daun kenikir 0% diperoleh dengan pemberian aquades, tanpa pemberian ekstrak daun kenikir dan ini di jadikan sebagai control negatif.

b. Daya antimikroba

Daya antimikroba merupakan kemampuan yang dapat menghambat atau membunuh pertumbuhan mikroba mulut. Yang diukur berdasarkan jumlah koloni mikroba yang tumbuh pada media yang diberi ekstrak daun kenikir dengan berbagai konsentrasi (skala rasio). Dengan kriteria antara 0 – 5 koloni mikroba yang tumbuh memiliki daya antimikroba yang kuat, 6 – 29 koloni mikroba yang tumbuh memiliki daya antimikroba yang sedang, 30 – 300 koloni mikroba yang tumbuh memiliki daya antimikroba yang lemah. Karena secara statistik yang paling baik menghitung jumlah koloni hanya jika pada media agar terdapat koloni 30 – 300 (Asriyah, 2010). Daya antimikroba yang dimiliki ekstrak daun kenikir secara statistik sangat kuat.

F. Prosedur Penelitian

1. Persiapan

a. Menyiapkan Alat dan Bahan

Cawan petri, Pipet tetes, Autoklaf, Incubator, Enkas, Tabung reaksi, Aquades, Media MHA, Listerin, Erlenmeyer, Neraca analitik, Alumunium foil, Gelas ukur, Sendok, Rotaryepavorator, Toples kaca, Pengaduk, Daun kenikir, Kertas saring, Etanol 96%.

a. Pembuatan Ekstrak daun Kenikir

1). Prosedur kerja dalam pembuatan serbuk/simplisia adalah
(prosedur kerja Laboraturium satrep, ITD)

- a) Mengambil 3 kg daun kenikir dan dipisahkan dari kotoran – kotoran yang menempel
- b) Mencuci daun kenikir dengan air mengalir, kemudian mengeringkan daun dibawah terik matahari hingga daun berubah menjadi hijau kecoklatan
- c) Selanjutnya menghulskan daun yang sudah kering menggunakan blender, hingga menjadi serbuk. Serbuk disebut simplisia
- d) Serbuk yang digunakan sebanyak 300 gram

2). Prosedur kerja pembuatan ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) (prosedur kerja Laboraturium satrep, ITD)

- a) Memasukkan serbuk sebanyak 300 gram kedalam toples kaca
- b) Mengukur etanol 96% sebanyak 1 liter kedalam tabung dengan menggunakan gelas ukur. Dan memasukkan kedalam toples kaca yang berisi serbuk simplisia.
- c) Dibiarkan selama 24 jam kemudian disaring menggunakan corong buchner yang dialasi kertas saring. Hasil dari penyaringan disimpan dalam Erlenmeyer dan ditutup menggunakan alumenium foil.
- d) Setelah penyaringan, serbuk simplisia ditambahkan etanol 96% sebanyak 400 ml, kemudian mengaduk hingga homogen.
- e) Dibiarkan selama 24 jam kemudian disaring menggunakan corong buchner yang dialasi kertas saring. Hasil dari penyaringan disimpan dalam Erlenmeyer dan ditutup menggunakan alumenium foil.
- f) Melakukan langkah d dan e
- g) Dari semua hasil penyaringan, kemudian dimasukkan dalam rotaryevaporator agar menguap sehingga dihasilkan ekstrak kental daun kenikir yang siap digunakan.

h) Mengukur kembali ekstrak kental yang telah dibuat menggunakan gelas ukur

Perhitungan:

300 gram simplisia dilarutkan ke dalam etanol 96% sebanyak 1800 ml akan dihasilkan ekstrak kental daun kenikir sebanyak 75 ml

Menuang ekstrak kental dalam toples kaca kemudian memberi label pada toples tersebut.

3). Membuat berbagai konsentrasi ekstrak daun kenikir

a). Konsentrasi ekstrak daun kenikir 75% didapat dengan cara mencampur : 75 ml (Ekstrak 100%) + 25 ml aquades

1. Mengambil dengan menggunakan pipet volume, kemudian menuangkan kedalam petridisk
2. Memberi label pada permukaan luar tabung reaksi

b). Konsentrasi ekstrak daun kenikir 50% didapat dengan cara mencampur : 50 ml (Ekstrak 100%) + 50 ml aquades

1. Mengambil dengan menggunakan pipet volume, kemudian menuangkan kedalam petridisk
2. Memberi label pada permukaan luar tabung reaksi

c). Konsentrasi ekstrak daun kenikir 25% didapat dengan cara mencampur : 25 ml (Ekstrak 100%) + 75 ml aquades

1. Mengambil dengan menggunakan pipet volume, kemudian menuangkan kedalam petridisk
2. Memberi label pada permukaan luar tabung reaksi

d). Konsentrasi 0% sebagai kontrol negatif

1. Mengambil aquades steril menggunakan pipet volume dan menuangkannya kedalam petridisk sebagai kontrol negatif
2. Memberi label pada permukaan luar tabung reaksi

e). Konsentrasi positif

1. Mengambil listerin menggunakan pipet volume dan menuangkannya kedalam petridisk sebagai control positif
2. Memberi label pada permukaan luar tabung reaksi

b. Pembuatan Media Muller Hinton Agar

- 1) Menuang 17 gram media MHA kedalam panci dan menambahkan aquades sebanyak 500 ml
- 2) Homogenkan diatas kompor dengan nyala api yang kecil
- 3) Setelah itu masukkan media kedalam erlenmeyer
- 4) Kemudian menseterilkan media dengan autoclave suhu 121 C selama 15 menit
- 5) Menuang media MHA kedalam cawan petri steril hingga ketinggian suspense 15 cm
- 6) Kemudian media dibiarkan pada suhu kamar hingga dingin
- 7) Memberi label pada media
- 8) Simpan media pada incubator

d. Pembuatan Biakan dan Suspensi Mikroba Mulut

- 1) Mengambil sampel saliva pada seseorang yang belum makan makanan dan meminum apapun.
- 2) Menambahkan aquades steril pada saliva.
 - a). Mengambil saliva/air liur 1 ml dan tambahkan aquades sebanyak 9 ml (Tabung I)
 - b). Kemudian dilakukan pengenceran dengan mengambil 1 ml dari tabung 1 dan tambahkan aquades 9 ml (Tabung II)
- 3) Suspensi kuman yang digunakan adalah hasil pengenceran 10^2

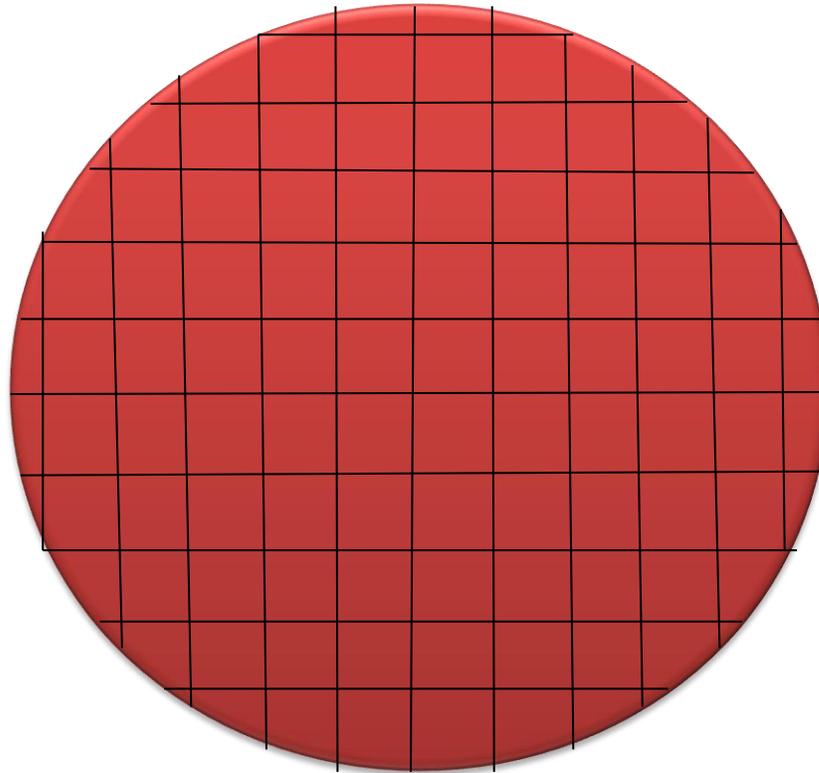
e. Pengujian Mikroba Mulut

1). Menyiapkan Alat dan Bahan

Cawan petri, Media MHA, ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dengan berbagai konsentrasi (100%, 75%, 50% dan 25%) dan suspensi kuman

2). Prosedur

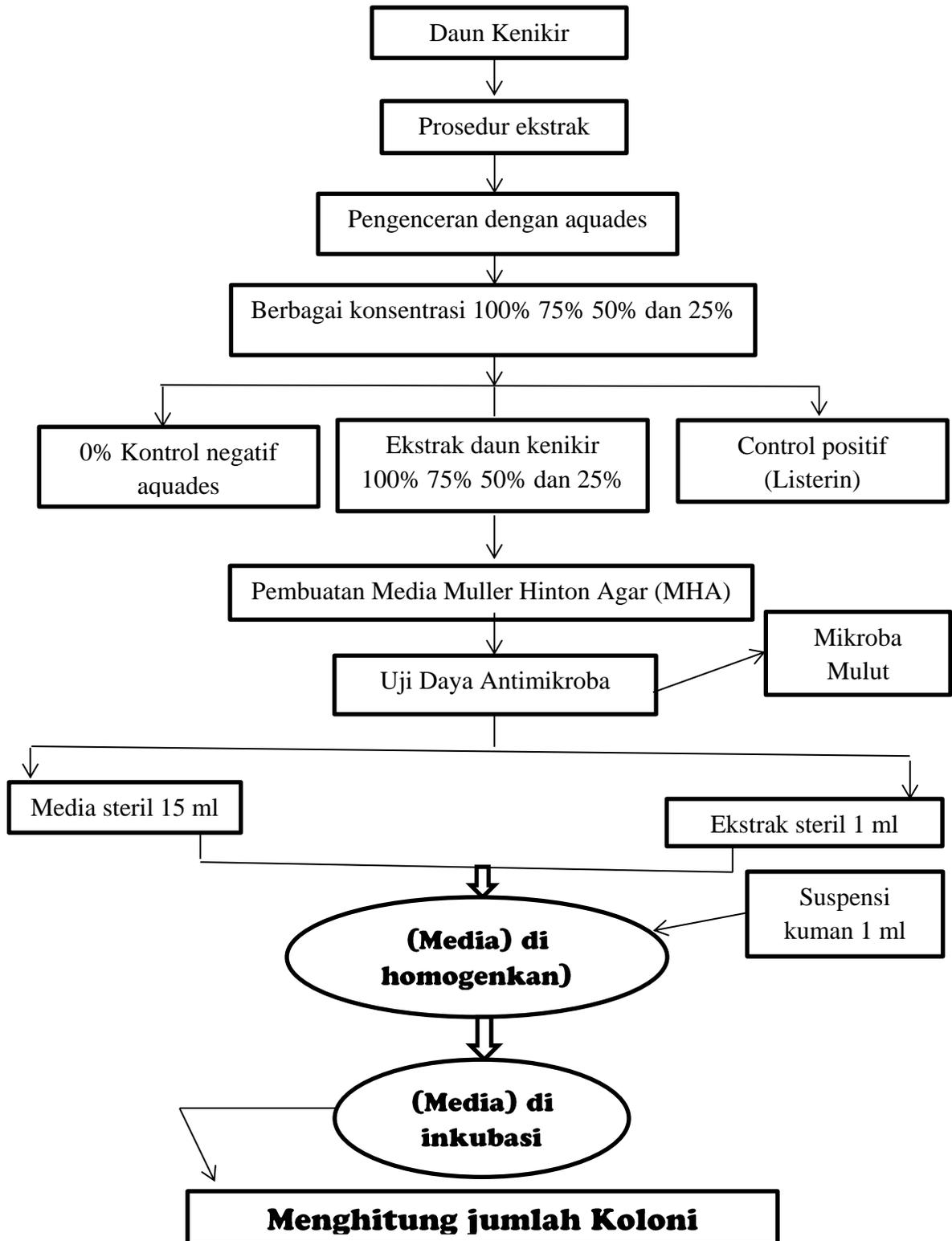
- a). Menuangkan suspensi kuman sebanyak 1 ml kedalam cawan petri
- b). Kemudian menambahkan ekstrak daun kenikir sebanyak 1 ml kedalam cawan petri dan menambahkan media MHA sebanyak 15 ml. Dan mencampur dengan suspensi kuman hingga homogeny
- c). Dan diinkubasi selama 24 jam
- d). Setelah itu menghitung jumlah koloni mikroba yang tumbuh dengan menggunakan colony counter



Gambar 3.2 Koloni Count

Tabel 3.1 Tabulasi Data Pada Tabel dibawah:

Pengamatan Koloni Yang Tumbuh Pada Pengenceran 10^{-2}						
24 JAM						
Perlakuan	100%	75%	50%	25%	Positif (Listerin)	Negatif
Pengulangan						
1.						
2.						
3.						
4.						
48 JAM						
1.						
2.						
3.						
4.						



Gambar 3.3 Bagan Prosedur Penelitian

G. Teknik Pengumpulan data

Data pertumbuhan mikroba mulut diperoleh dengan cara observasi langsung melalui uji laboratorium. Pemeriksaan daya antimikroba mulut ini dengan cara menghitung jumlah koloni yang tumbuh. Data tentang daya antimikroba ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*). Diorganisasikan dalam bentuk tabel berdasarkan jumlah koloni yang tumbuh

Tabel 3.2 Hasil pengamatan jumlah koloni mikroorganisme yang tumbuh pada berbagai perlakuan

Pengulangan	Perlakuan dengan berbagai konsentrasi						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1							
2							
3							
4							
<i>Jumlah</i>							
Rata – rata							
Sd							

Keterangan :

P1 : konsentrasi 100%

P2 : konsentrasi 75%

P3 : konsentrasi 50%

P4 : konsentrasi 25%

P5 : Kontrol Positif

P6 : Kontrol Negatif

H. Teknik Analisis Data

Penganalisisan data hasil pengukuran pertumbuhan mikroba mulut dari berbagai konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*). Dianalisis dengan aplikasi SPSS. Data pertama kali di uji Normalitas (Silmogorov – Smirnov). Jika data berdistribusi normal akan dilanjutkan menggunakan uji parametrik Anova untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap antimikroba. Dan jika data tidak berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji non parametrik Kruskal Wallis dengan α 0,005. Jika ada perbedaan dilanjutkan menggunakan uji Mann Whitney.