

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris *post test only* yang dilakukan secara *in vitro*.

4.2. Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

4.2.1. Kriteria Sampel

Stok bakteri dibiakkan menggunakan media BHIB

4.2.2. Besar Sampel

Besar sampel dihitung menggunakan rumus besar sampel Federer (1977):

$$(n-1)(r-1) \geq 15$$

$$(8-1)(r-1) \geq 15$$

$$7r \geq 22$$

$$r \geq 3,1$$

Keterangan:

n = jumlah perlakuan

r = jumlah sampel/replikasi yang dibutuhkan

Maka, penelitian ini membutuhkan replikasi sebanyak 3 kali.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu ekstrak daun eceng gondok dengan konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,56%; dan 0,78%.

4.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

4.3.3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah:

1. Alat, bahan, dan media
2. Suhu inkubasi
3. Waktu inkubasi

4.4. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun eceng gondok adalah ekstrak yang didapatkan dari proses ekstraksi daun eceng gondok dengan etanol 70%. Konsentrasi yang digunakan yaitu 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; dan 0,78%.
2. Daya hambat ekstrak daun eceng gondok yaitu kemampuan yang dimiliki oleh ekstrak daun eceng gondok untuk mengurangi jumlah bakteri pada media cair BHIB.
3. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* adalah bakteri yang dapat tumbuh di media BHIB dalam kondisi tertentu sehingga pertumbuhan bakteri dapat diukur dengan pembacaan spektrofotometri.

4.5. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.5.1. Lokasi Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di *Research Center* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dan ekstraksi akan dilakukan di Universitas Widya Mandala.

4.5.2. Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Juli – Oktober 2020

4.6. Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1. Alat Penelitian

1. Rak tabung reaksi
2. Tabung reaksi
3. Spektrofotometer
4. Mikropipet
5. Inkubator
6. Oese

4.6.2. Bahan Penelitian

1. Ekstrak daun eceng gondok
2. Stok bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277
3. Media BHIB

4.7. Cara Kerja

4.7.1. Persiapan Ekstrak Daun Eceng Gondok

1. Tanaman eceng gondok dicuci dengan air mengalir hingga bersih.
Kemudian daun dipisahkan dari batang dan dipotong.

2. Daun eceng gondok yang telah dipotong dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C. Daun eceng gondok dikeringkan hingga daun mudah disobek.
3. Daun yang telah kering dihancurkan hingga halus dan diayak untuk memperoleh serbuk yang halus.

4.7.2. Ekstraksi Daun Eceng Gondok

1. Serbuk daun eceng gondok ditimbang sebanyak 600 gram lalu maserasi dilakukan dengan etanol 70% sebanyak 2,5 L.
2. Filtrat etanol 70% dipisahkan dari residu menggunakan corong Buchner dan kertas saring. Filtrat ditampung dalam erlenmeyer dan disimpan dalam suhu ruang.
3. Residu diberi etanol 70% lagi sebanyak 2,5L hingga residu terpendam dalam toples.
4. Toples diletakkan pada *shaker* digital, kecepatan diatur pada 50 rpm dan dilakukan selama 24 jam.
5. Ekstrak disaring dengan saringan dan ditampung dalam erlenmeyer.
6. Hasil ekstrak pertama dan kedua dicampur dan diuapkan dengan *rotary evaporator*. Waktu untuk evaporasi adalah 4 jam.
7. Ekstrak yang diperoleh dievaporasi dengan *waterbath* selama 2 jam.
8. Ekstrak yang dihasilkan dari 600 g daun eceng gondok dengan etanol 70% sebanyak 5L yaitu sebesar 40 ml.

4.7.3. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Eceng Gondok Terhadap Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Uji daya hambat pada penelitian ini menggunakan metode dilusi dengan pengenceran seri dengan tahapan sebagai berikut:

1. Tabung reaksi sebanyak 9 buah dan 1 buah berisi suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis* disiapkan dan diberi label.
2. Tabung reaksi no. 1 diisi ekstrak daun eceng gondok 100% sebanyak 10 ml. 8 tabung reaksi lainnya diberi BHIB sebanyak 5 ml.
3. Tabung reaksi no. 2 yang telah diisi oleh BHIB diberi 5 ml ekstrak daun eceng gondok dan diaduk. Kemudian, tabung reaksi no. 3 diberi 5 ml dari cairan tabung reaksi no. 2 dan diaduk. Setelah itu, tabung reaksi no. 4 diberi 5 ml dari cairan tabung reaksi no. 3 dan diaduk. Tahapan tersebut dilakukan hingga tabung reaksi no. 8. Cairan pada tabung no. 8 dibuang sebanyak 5 ml agar setiap tabung mempunyai volume yang sama.
4. Sebanyak 0,1 ml suspensi bakteri ditambahkan ke dalam masing-masing tabung yang berisi BHIB dan ekstrak daun eceng gondok.
5. Terdapat 1 sisa tabung reaksi yang berisi 5 ml BHIB digunakan sebagai kontrol negatif dan 1 tabung yang berisi suspensi bakteri sebagai kontrol positif.
6. Tahapan nomor 1-5 diulang sebanyak 3 kali agar mendapatkan besar sampel yang adekuat
7. Tabung diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.

8. Sebelum melakukan pembacaan dengan spektrofotometer dilakukan optimisasi untuk menentukan panjang gelombang.
9. Tabung dilakukan pembacaan dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang sesuai hasil optimalisasi. Setelah pembacaan, dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus (Meletiadis *et al.*, 2017):

$$\left(\frac{\text{OD tabung yang mengandung ekstrak}}{\text{OD tabung yang tidak mengandung ekstrak}} \right) \times 100\%$$

10. Setelah pembacaan dan perhitungan dilakukan analisis data.

4.8. Alur Penelitian

