

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *true experimental* dengan menggunakan desain penelitian *post test control group desain*.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.2.1 Lokasi penelitian

1. Identifikasi daun kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) di Herbarium Universitas Andalas.
2. Ekstrak daun kelapa sawit dibuat di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.
3. Pembiakan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
4. Pengamatan uji hambatan pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

4.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2025 – Januari 2026

4.3 Populasi, Sampel, dan Besar Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah menggunakan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

4.3.2 Sampel

Penelitian ini menggunakan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang di ambil dari biakan murni di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

4.3.3 Besar Sampel

Pada penelitian ini terdapat 6 kelompok perlakuan, yaitu:

- Kelompok 1 : perlakuan dengan ekstrak daun kelapa sawit 25%
- Kelompok 2 : perlakuan dengan ekstrak daun kelapa sawit 50%
- Kelompok 3 : perlakuan dengan ekstrak daun kelapa sawit 75%
- Kelompok 4 : perlakuan dengan Media BHI-B sebagai kontrol negatif
- Kelompok 5 : perlakuan dengan *clorheksidin gluconate* 0,2% sebagai kontrol positif
- Kelompok 6 : perlakuan dengan etanol 96%

Besar sampel ditentukan menggunakan rumus penentuan sampel uji eksperimen menurut Federer, 1963 (Muslih dan Rafhani., 2020):

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

Keterangan:

t = Jumlah kelompok perlakuan

n = Jumlah sampel minimal

Pada penelitian ini diketahui jumlah kelompok perlakuan (t) = 6, maka perhitungan jumlah sampel menjadi:

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

$$(6 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$5(n - 1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan rumus perhitungan di atas, diperoleh jumlah sampel (n) adalah sebanyak 4. Untuk menghindari kemungkinan *drop out* selama penelitian, maka dilakukan koreksi dengan rumus:

$$n' = \frac{n}{1 - f}$$

Keterangan:

n' = jumlah sampel koreksi

n = jumlah sampel awal

f = perkiraan subyek drop out = 10% (0,1)

$$n' = \frac{4}{1 - 0,1}$$

$$n' = \frac{4}{0,9}$$

$$n' = 4,4$$

$$n' = 5 \text{ (dibulatkan)}$$

Berdasarkan perhitungan di atas, didapatkan jumlah sampel yang digunakan pada tiap 6 kelompok eksperimen adalah 5 sampel dengan total keseluruhan sebanyak 30 sampel.

4.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 diambil dengan menggunakan teknik *purposive sampling*. Dengan kriteria sebagai berikut:

a. Kriteria inklusi

1. Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175
2. Koloni tunggal
3. Bentuk bulat oval
4. Tidak kontaminan dengan bakteri lain

b. Kriteria eksklusi

1. Bakteri selain *Streptococcus mutans* ATCC 25175
2. Berkelompok

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

a. Variabel Independen

Variabel independen pada penelitian ini adalah ekstrak daun kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.).

b. Variabel Dependen

Variabel dependen pada penelitian ini adalah pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

4.4.2 Definisi Operasional

a. Ekstrak daun kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

1. Definisi : ekstrak daun kelapa sawit diperoleh dari daun kelapa sawit segar yang berwarna hijau tua yang berada di tengah antara ujung dan pangkal pelepah dengan usia berkisar 5-20 tahun menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% sehingga diperoleh ekstrak kental daun kelapa sawit dengan konsentrasi 100%, kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 25%, 50%, dan 75%.

2. Cara ukur : menghitung massa dan volume larutan etanol 96% menggunakan rumus (Butts, 2004):

$$\% = \frac{m}{v} \times 100$$

Keterangan:

m = massa (g)

v = volume (ml)

3. Alat ukur : neraca analitik dan gelas ukur
4. Hasil ukur : ekstrak daun kelapa sawit
5. Skala ukur : skala nominal

b. Pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* ATCC 25175

1. Definisi : Pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* dilihat dengan mengukur absorbansi pewarna *crystal violet* yang berikatan dengan komponen biofilm menggunakan *microplate reader*. Absorbansi yang lebih tinggi menunjukkan lebih banyak biofilm yang terbentuk dan absorbansi yang lebih rendah menunjukkan pembentukan biofilm yang lebih sedikit.

2. Cara ukur : mengukur nilai penghambatan pembentukan biofilm yang diperoleh dari *optical density* (absorbansi) pewarna *crystal violet* melalui rumus (Rollando, 2017)

$$\% \text{ penghambatan} = \left\{ 1 - \left(\frac{OD \text{ sampel uji} - OD \text{ blanko sampel}}{OD \text{ kontrol negatif} - OD \text{ blanko kontrol negatif}} \right) \right\} \times 100\%$$

3. Alat ukur : *microplate reader*
4. Hasil ukur : nilai penghambatan pembentukan biofilm
5. Skala ukur : rasio

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

1. Neraca analitik
2. Timbangan digital
3. *Food dehydrator*
4. Blender/grinder
5. Bejana maserasi
6. *Rotary evaporator*
7. *Hot plate stirrer*
8. Gelas ukur
9. Erlemenyer
10. Botol kaca steril
11. Autoklaf
12. *Laminar air flow*
13. Inkubator
14. Anaerob jar



15. Cawan petri
16. Jarum ose
17. Tabung reaksi dan rak
18. Spuit injeksi
19. *Micropipet*
20. *Micropipet tips*
21. Bunsen
22. *Centrifuge*
23. *Microplate flat-bottom 96 wells*
24. *Microplate rounds bottom 96-wells*
25. *Microplate reader (microELISA)*
26. *Conical tube*
27. *Vortex*
28. pH meter
29. *Breaker glass*
30. Pinset
31. Gunting



4.5.2 Bahan Penelitian

1. Daun kelapa sawit segar sebanyak 3000 g
2. Biakan murni bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175
3. *Aquadest*
4. NaCl 0,9%
5. *Phosphate Buffered Saline (PBS)*
6. Etanol 96%

7. Media *Brain Heart Infusion* (BHI)
8. *Cristal violet* 0,1%
9. *Clorhexidine gluconate* 0,2%
10. Standar 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL)
11. Kertas saring
12. Masker
13. *Handscoon*
14. Kasa steril
15. Kapas steril
16. *Cotton bud* steril
17. Tisu
18. Aluminium foil

4.6 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari identifikasi tanaman dan bakteri, sterilisasi alat, pembuatan ekstrak daun kelapa sawit dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75%, pembuatan media pertumbuhan bakteri, pembuatan suspensi dan kultur bakteri, dan uji penghambatan pembentukan biofilm.

4.6.1 Identifikasi Tanaman dan Bakteri

Identifikasi daun kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) di Herbarium Universitas Andalas dan identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

4.6.2 Sterilisasi Alat

Semua alat yang digunakan harus disterilisasi agar tidak terkontaminasi oleh jamur dan bakteri. Peralatan yang terbuat dari plastik dan kaca disterilkan menggunakan metode sterilisasi basah dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 10-15 menit. Peralatan yang terbuat dari logam dapat disterilkan menggunakan api bunsen yang dilakukan di dalam *laminar air flow* dengan alat dicelupkan terlebih dahulu ke dalam etanol 70% (Wulandari *et al.*, 2022; Sulistiani *et al.*, 2021).

4.6.3 Pembuatan Estrak Daun Kelapa Sawit

Daun kelapa sawit sebanyak 3000 g dibersihkan dengan air mengalir lalu dipotong kecil-kecil dan dikeringkan menggunakan *food dehydrator* dengan suhu 45°C selama 4 jam. Daun yang kering dihaluskan menggunakan grinder hingga berbentuk serbuk sebagai simplisia. Serbuk daun kelapa sawit dicampur dengan pelarut berupa etanol 96% dengan perbandingan 1:4 di dalam bejana sambil sesekali diaduk dan diamkan pada suhu ruang selama 48 jam. Hasil maserasi tersebut disaring dan dipisahkan dengan ampas untuk mendapatkan filtratnya (Nugroho, 2017). Maserat tersebut dikonsentrasikan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C hingga diperoleh ekstrak kental dengan konsentrasi 100% lalu dilakukan pengenceran menggunakan etanol 96% sampai didapatkan konsentrasi 25%, 50%, dan 75% (Onakurhefe *et al.*, 2019; Priyadi *et al.*, 2025)

4.6.4 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

Media pertumbuhan digunakan *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B) dengan campuran 3,7 gram media BHI-B bersama 100 ml *aquadest* steril di erlenmeyer.

Media BHI diaduk hingga homogen, dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Firkani *et al.*, 2025).

4.6.5 Persiapan Suspensi dan Kultur Bakteri

Persiapan suspensi bakteri dimulai dengan pengambilan *Streptococcus mutans* dari penyimpanan gliserol kemudian dengan jarum ose steril digoreskan zig-zag ke seluruh permukaan agar darah. Media agar darah disimpan dengan ditutup kapas dan aluminium foil lalu diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator bersuasana anaerob. *Streptococcus mutans* yang hidup di media agar darah ditandai dengan adanya koloni berwarna hijau (Maharani *et al.*, 2021).

Koloni tunggal bakteri *Streptococcus mutans* diambil menggunakan jarum ose steril dari media agar darah untuk diinokulasi ke tabung reaksi yang berisi 8 ml BHI broth. Selanjutnya inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. BHI dalam tabung dibuang sehingga tersisa bakteri yang mengendap lalu ditambahkan larutan natrium klorida 0,9% sebanyak 2 ml. Suspensi dihomogenkan dengan menggunakan vortex lalu diambil 30 µl dan ditambahkan ke tabung reaksi berisi 3 ml NaCl 0,9%, setelahnya disesuaikan kekeruhannya dengan standar *McFarland* 0,5 yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Yılmaz *et al.*, 2019).

4.6.6 Penghambatan Pembentukan Biofilm *Streptococcus mutans*

Uji penghambatan pembentukan biofilm dilakukan menggunakan *microplate* 96 wells dengan ekstrak daun kelapa sawit diberbagai konsentrasi yaitu 25%, 50%, dan 75%. Kelompok kontrol positif diberi perlakuan dengan memakai *chlorexidine gluconat* 0,2% sedangkan kontrol negatif menggunakan BHI-B. Perlakuan menggunakan etanol 96% untuk memastikan tidak ada keterlibatannya

dalam pembentukan biofilm. Sumuran *blank* digunakan pada pengujian untuk memastikan bahwa hasil yang didapat merupakan aktivitas bahan yang diuji, NaCl fisiologis digunakan pada sumuran *blank* (Kırmusaoglu, 2019).

Setiap perlakuan pada sumuran uji dan *blank* dilakukan 5 kali pengulangan. Sebanyak 50 µl ekstrak daun kelapa sawit ditambahkan pada setiap sumur uji *microplate* dan tambahkan sebanyak 10 µl suspensi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang telah diinokulasi ke dalam sumuran uji. Tambahkan 40 µl media BHI-B pada setiap sumur. Sebagai kontrol positif dimasukkan 50 µl *chlorexidine gluconate* 0,2%, dan kontrol negatif dimasukkan sebanyak 90 µl media BHI-B seperti pada tabel 4.1 (Lanagusti *et al.*, 2024).

Tabel 4. 1 Desain Kelompok dan Perlakuan

Kelompok	Perlakuan
Kontrol negatif	90 µl media BHI-B + 10 µl suspensi bakteri <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175
Kontrol positif	50 µl <i>chlorexidine gluconate</i> 0,2% + 10 µl suspensi bakteri <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 + 40 µl media BHI-B
Ekstrak daun kelapa sawit konsentrasi 75%	50 µl ekstrak daun kelapa sawit 75% + 10 µl suspensi bakteri <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 + 40 µl media BHI-B
Ekstrak daun kelapa sawit konsentrasi 50%	50 µl ekstrak daun kelapa sawit 50% + 10 µl suspensi bakteri <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 + 40 µl media BHI-B
Ekstrak daun kelapa sawit konsentrasi 25%	50 µl ekstrak daun kelapa sawit 25% + 10 µl suspensi bakteri <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 + 40 µl media BHI-B
Etanol 96%	50 µl etanol 96% + 10 µl suspensi bakteri <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 + 40 µl media BHI-B

Inkubasi *microplate* 96 wells selama 24 jam dengan suhu 37°C kemudian sumuran dicuci sebanyak 2 kali dengan 200 µl *phosphate buffer saline* (PBS).

Lakukan proses pewarnaan dengan 200 μ l larutan *crystal violet* 0,1% dan didiamkan 15 menit pada suhu ruang. Pewarnaan oleh *crystal violet* 0,1% dibilas dengan PBS sebanyak 2 kali dilanjutkan dengan penambahan 200 μ l etanol 96% dan didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang. Pindahkan larutan ke 96 wells *microplates flat bottom* menggunakan *micropipet* dan lakukan pembacaan nilai *Optical Density* (OD) melalui *microplate reader* dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai persentase penghambatan pembentukan massa biofilm dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Rollando, 2017; Elgamoudi & Korolik, 2023)

4.7 Pengolahan Data dan Analisis Data

4.7.1 Pengolahan Data

Prosedur pengolahan data dapat dilakukan sebagai berikut (Payumi & Imanuddin, 2021):

1. *Editing*

Editing merupakan upaya untuk memeriksa kebenaran data yang diperoleh dan dikumpulkan pada saat pengumpulan data atau setelah data terkumpul.

2. *Entry*

Entry merupakan aktivitas memasukan data yang diperoleh ke dalam data base komputer melalui program perangkat lunak kemudian membuat distribusi frekuensi data.

3. *Cleaning*

Cleaning merupakan pemeriksaan kembali data untuk memastikan bahwa tidak ada kesalahan pada data.



4.7.2 Analisis Data

a. Analisis Univariat

Data yang telah dikumpulkan, diolah, dan dilakukan analisis univariat untuk menjelaskan karakteristik dari setiap variabel penelitian yaitu variabel independen berupa ekstrak daun kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, *Chlorhexidine gluconate* 0,2%, dan etanol 96% dengan variabel dependen berupa pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

b. Analisis Bivariat

Analisis bivariat digunakan untuk menganalisis nilai penghambatan pembentukan biofilm dalam skala rasio. Analisis statistik dimulai dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dengan nilai signifikansi ($p > 0,05$) serta uji *Levene Test* untuk uji homogenitas dengan nilai signifikansi ($p > 0,05$). Jika analisis data menunjukkan terdistribusi normal dan uji homogenitas menunjukkan data normal, dilanjutkan dengan menggunakan uji statistik parametrik *One Way Anova* untuk uji perbedaan rata-rata antar kelompok uji serta gunakan metode *Honestly Significant Different* (HSD) untuk uji *Post Hoc*. Jika data tidak terdistribusi normal, uji perbedaan signifikansi setiap kelompok menggunakan *Independent T-Test* jika kedua kelompok data terdistribusi normal dan menggunakan *Mann-Whitney* jika kedua kelompok data tidak terdistribusi normal. uji perbedaan signifikansi antar semua kelompok dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*.

4.8 Alur Penelitian

