

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium secara *in vitro* dengan *post-test only control group design*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi n-heksan bunga gletang (*Tridax procumbens L.*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

#### **3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian**

##### **3.2.1 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada 18 November 2025 sampai dengan 29 November 2025

##### **3.2.2 Lokasi Penelitian**

1. Identifikasi tumbuhan gletang di Herbarium Universitas Andalas
2. Pembuatan Ekstrak bunga gletang di Laboratorium Farmasi Universitas Andalas
3. Pembuatan Fraksi n-heksan bunga gletang dan uji aktivitas antibakteri di Laboratorium Penelitian Antar Universitas (PAU) Universitas Gajah Mada.

#### **3.3 Populasi Penelitian**

Koloni bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang didapatkan dari Laboratorium Penelitian Antar Universitas (PAU) Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

#### **3.4 Sampel Penelitian**

Sampel penelitian yang digunakan sebagai berikut :

1. Fraksi n-heksan bunga gletang (*Tridax procumbens L.*) dengan konsentrasi 2.5%, 5.0%, 7.5% dan 10%.
2. Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

### 3.4.1 Kriteria Sampel

#### 1. Kriteria Inklusi

- a. Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diidentifikasi secara morfologi dengan bentuk dan karakteristik koloni yang sesuai standar serta menunjukkan bau khas seperti bau fermentasi karamel sebagai indikasi murni.
- b. Fraksi n-heksan bunga gletang (*Tridax procumbens L.*) yang sudah melalui proses fraksinasi dan bebas dari kontaminasi zat asing maupun mikroorganisme.
- c. Media padat / *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah disterilkan dengan baik dan memenuhi standar kualitas untuk uji sensitivitas antibakteri..

#### 2. Kriteria Ekslusi

- a. Bakteri *Streptococcus mutans* yang menunjukkan bau tidak khas dan tidak sesuai karakteristik normal, seperti bau zat asing atau bau fermentasi.
- b. Fraksi n-heksan bunga gletang (*Tridax procumbens L.*) yang terkontaminasi oleh zat asing atau mikroorganisme dari lingkungan selama proses persiapan atau penyimpanan.
- c. Media padat / *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang terkontaminasi oleh bakteri, jamur, atau mikroorganisme lain yang tidak diinginkan dan atau mengalami degradasi.

### 3.4.2 Pengelompokan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel fraksi n-heksan tumbuhan gletang (*Tridax procumbens L.*) dengan berbagai konsentrasi, yaitu 2.5%, 5.0%, 7.5% dan 10%. Sampel yang digunakan dibagi menjadi beberapa kelompok, sebagai berikut :

1. Kelompok perlakuan I : Fraksi n-heksan bunga gletang (*Tridax procumbens L.*) dengan konsentrasi 2.5% terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.
2. Kelompok perlakuan II : Fraksi n-heksan bunga gletang (*Tridax procumbens L.*) dengan konsentrasi 5.0% terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

3. Kelompok perlakuan III : Fraksi n-heksan bunga gletang (*Tridax procumbens* L.) dengan konsentrasi 7.5% terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.
4. Kelompok perlakuan IV : Fraksi n-heksan bunga gletang (*Tridax procumbens* L.) dengan konsentrasi 10% terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.
5. Kelompok (+) : Klorheksidin 0,2%
6. .Kelompok (-) : Metanol 96%

### 3.4.3 Besar Sampel

Besar sampel pada penelitian ini menggunakan rumus Freeder (1997) :

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

Keterangan:

t = Jumlah kelompok perlakuan dalam penelitian

r = Banyak replikasi (pengulangan)

Penelitian ini menggunakan 10 kelompok, oleh karena itu banyak replikasi pada penelitian ini yaitu sebagai berikut :

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

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq \frac{20}{5}$$

$$r \geq 4$$

(4 kali replikasi)

Besar sampel (n) = t x r

$$n = 6 \times 4$$

$$n = 24 \text{ sampel}$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, maka diperoleh 4 kali pengulangan untuk setiap kelompok. Kelompok yang digunakan adalah sebanyak 6 kelompok sehingga besar sampel menjadi 24 sampel.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah fraksi n-heksan bunga gletang (*Tridax procumbens L.*) dengan konsentrasi 2.5%, 5.0%, 7.5% dan 10%.

#### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan penentuan zona hambat.

### 3.6 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional adalah definisi yang didasarkan atas sifat dari variabel yang bisa diamati dan diukur. Definisi operasional diperlukan untuk menjelaskan ciri-ciri varian, alat ukur, cara pengukuran, hasil ukur dan skala ukur yang dihasilkan dari pengukuran variabel tersebut terlihat pada Tabel 3. 1.

**Tabel 3. 1** Definisi Operasional Tabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Konsentrasi fraksi n-heksan	Fraksi n-heksan bunga gletang ( <i>Tridax procumbens L.</i> ) diencerkan dengan Metanol 96%	Neraca analitik	2.5%, 5.0%, 7.5%, dan 10%	Rasio
2.	Zona Hambat bakteri	Zona bening yang terbentuk di sekitar	Jangka sorong	<5 mm (lemah)	Ordinal

<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	kertas cakram yang telah diinokulasi dengan bakteri <i>Streptococcus mutans</i> diukur dengan mengukur diameter zona secara horizontal, vertikal dan diagonal. Kemudian hasil pengukuran dijumlahkan dan dibagi tiga untuk mendapatkan nilai rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi 2.5%, 5.0%, 7.5% dan 10%.	5-10 mm (sedang) 10-20 mm (kuat) >20 mm (sangat kuat)
--	---	---

### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

**Tabel 3. 2** Alat dan Bahan Penelitian

No	Alat	Bahan
1.	<i>Anaerobic jar</i>	Bunga gletang ( <i>Tridax procumbens L.</i> )
2.	<i>Autoclave counter</i>	Aquades
3.	Blender	Bacto agar
4.	Botol gelap 2,5 L	Etil asetat
5.	Cawan petridish	Methanol
6.	Corong	<i>Muller Hilton</i>
7.	<i>Cotton bud</i> steril	n-heksan
8.	Incubator	<i>silica gel G60</i>

---

9.	Jangka sorong	Klorheksidin 0,2%
10.	Jarum ose	Bakteri <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175
11.	Lampu spritus	Tissue
12.	LAF ( <i>Laminal Air Flow</i> )	Kapas
13.	Kamera dokumentasi	Masker dan <i>handscoon</i>
14.	Kertas saring <i>Whatman</i>	
15.	Paper disk	
16.	Paper film	
17.	Pinset	
18.	Tabung Erlenmeyer	
19.	Tabung vial	
20.	Tabung analitik	
21.	<i>Vacuum rotary evaporator</i>	

---

### 3.8 Prosedur Penelitian

Prosedur kerja dari penelitian ini ada empat tahap yaitu :

1. Proses pembuatan ekstrak dari bunga Gletang (*Tridax procumbens L.*).
2. Proses fraksinasi dari ekstrak bunga Gletang (*Tridax procumbens L.*).
3. Pembuatan media agar
4. Pembuatan suspensi bakteri
5. Proses pengujian aktivitas antibakteri dengan metode zona hambat

#### 3.8.1 Persiapan Ekstrak Bunga Gletang

Proses persiapan alat dan bahan uji dilakukan melalui tahap-tahap sebagai berikut:

1. Pengambilan sampel bunga gletang (*Tridax procumbens L.*) sebagai bahan uji sebanyak 2 kg basah di Sungai Sapih, Kuranji, Padang, Sumatra Barat

2. Bunga gletang dicuci bersih menggunakan air mengalir untuk menghilangkan debu dan kotoran yang menempel, lalu ditiriskan hingga tidak ada sisa air yang menempel pada permukaan bunga.
3. Proses pengeringan bunga dilakukan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang, ditempatkan di tempat teduh yang tidak terkena sinar matahari langsung, selama beberapa hari hingga bunga benar-benar kering dan mudah diremukkan.
4. Setelah kering, bunga digiling atau diblender hingga menjadi serbuk halus untuk memperbesar luas permukaan dan memudahkan proses ekstraksi.

### 3.8.2 Pembuatan Ekstrak Bunga Gletang

Ekstraksi digunakan dengan metode maserasi dan pelarut yang diaplikasikan dalam penelitian ini adalah metanol 96%. Tahap-tahap pembuatan ekstrak bunga gletang (*Tridax procumbens L.*) sebagai berikut :

1. Bunga gletang yang sudah halus dimasukkan kedalam tabung dan direndam dengan pelarut metanol 96%. Kemudian diaduk secara berkala dan didiamkan selama 3x24 jam didalam suhu ruang.
2. Setelah 3x24 jam rendaman bunga gletang disaring menggunakan corong plastik dan kertas saring *Whatman* ke dalam tabung *Erlenmeyer* sampai ampas terpisah sehingga warna campuran menjadi agak pudar untuk didapatkan residu (hasil yang tidak digunakan) dan filtrat (hasil yang digunakan).
3. Selanjutnya diletakkan ke dalam tabung labu lalu diuapkan dengan vacuum evaporator dengan suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental dan dimasukkan ke dalam toples kaca
4. Melaksanakan proses konsentrasi ekstrak sesuai dengan kelompok 2.5%, 5.0%, 7.5% dan 10% melalui rumus berikut :

$$Konsentrasi = \frac{\text{massa (gr)}}{\text{volume larutan (ml)}} \times 100\%$$

**Tabel 3. 3** Pembuatan Konsentrasi Larutan Ekstrak Bunga Gletang

2.5%	5.0%	7.5%	10%
0.25 gram ekstrak + 10ml larutan	0.5 gram ekstrak + 10 ml larutan	0.75 gram ekstrak + 10 ml larutan	1 gram ekstrak + 10 ml larutan

### 3.8.3 Pembuatan Fraksi Bunga Gletang

1. Siapkan silika gel sebagai fase diam sebanyak 100 gram, yaitu 10 kali lipat dari massa awal bahan ekstrak (10 gram). Silika gel ini akan dipakai untuk mengisi kolom kromatografi.
2. Masukkan silika gel ke dalam kolom kromatografi secara perlahan agar tidak terjadi gelembung udara yang dapat mengganggu proses pemisahan fraksi. Padatkan silika gel dengan cara memukul perlahan kolom agar lapisan silika rapat dan merata.
3. Siapkan ekstrak bunga Gletang yang sudah dikeringkan dan diencerkan dalam pelarut yang sesuai (misalnya metanol atau kloroform). Sampel ekstrak tersebut kemudian dimasukkan ke atas lapisan silika gel pada kolom secara hati-hati menggunakan pipet atau alat khusus supaya tidak merusak lapisan silika.
4. Pemisahan dilaksanakan mengaplikasikan corong pisah, lalu ditambah 120 ml n-heksan, diaduk perlahan-lahan dilanjutkan dengan mendinginkan sampai terjadi terpisah antara n-heksan dengan metanol.
5. Kemudian dengan membuka tutup pemisah, metanol dipisahkan dari fraksi n-heksan dan ditampung dalam labu *Erlenmeyer*. Proses ini diulangi sebanyak dua kali dengan pelarut yang sama hingga diperoleh lapisan n-Heksan yang jernih.
6. Kemudian setelah dilakukan pemisahan, fraksi metanol yang dihasilkan ditambakkann menggunakan larutan etil asetat, kemudian dipisahkan antara

larutan etil asetat dan metanol. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan diuapkan hingga lapisan etil asetat menjadi jernih. Fraksi metanol, etil asetat dan n-heksan yang diperoleh diuapkan pada *vacuum rotary evaporator* sampai diperoleh fraksi kental.

7. Fraksinasi dilanjutkan dengan menggunakan metode Kromatografi Kolom (KK). Teknik kromatografi yang menggunakan zat penyerap (fasa diam) pada ruang kaca dengan bentuk buret, fasa bergerak dimasukkan di atas dan menetes ke bawah. Pada kromatografi kolom, fasa diam diposisikan pada kolom yang ditelusuri fasa 35aeca yang mempengaruhi dengan adanya gaya gravitasi.

#### **3.8.4 Pembuatan Media Agar**

Pembuatan media pertumbuhan untuk *Streptococcus mutans* dilakukan dengan memodifikasi *Mueller Hinton Agar* (MHA) konvensional dengan penambahan sukrosa. Pertama, timbangan sekitar 38 gram media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan larutkan dalam 1 liter air suling atau aquadest, kemudian panaskan hingga larut sempurna dan didihkan. Setelah itu, tambahkan sukrosa sebanyak 1-2% dari total volume media, biasanya sekitar 10-20 gram per liter, untuk memberikan sumber karbon yang diperlukan bagi pertumbuhan dan aktivitas metabolik *Streptococcus mutans*. Selanjutnya, media disterilkan melalui proses autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk memastikan sterilitas. Setelah media dingin hingga suhu 45-50°C, tuang ke dalam cawan petri steril kurang lebih 20-25 mL dan biarkan mengeras sebelum digunakan untuk inokulasi bakteri.

#### **3.8.5 Pembuatan Suspensi Bakteri**

Suspensi dibuat dengan mengambil biakan bakteri *Streptococcus mutans* dengan ose steril sebanyak 1-2 ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah terisi 2 ml larutan NaCl 0,9% hingga kekeruhan sesuai dengan larutan standar 0,5 McFarland yaitu  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml. Suspensi bakteri tersebut diaplikasikan pada media padat (media agar) menggunakan swab steril. Cakram kertas putih kemudian ditempatkan di lingkungan menggunakan pinset dengan tekanan ringan dan ditetesi

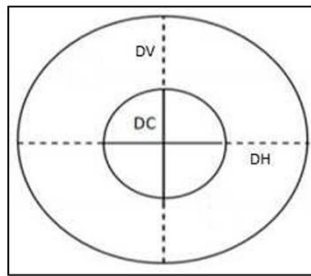
dengan fraksi n-heksan, kontrol positif dengan klorheksidin 0,2% dan kontrol negatif dengan metanol 96%. Cawan petri kemudian ditutup dengan paper film.

### 3.8.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Daya hambat fraksi n-heksan tumbuhan gletang diuji menggunakan metode difusi agar. Sebelum digunakan, semua alat yang diperlukan dicuci terlebih dahulu, dikeringkan dan kemudian disterilkan untuk memastikan kebersihan dan menghindari kontaminasi selama percobaan. Prosedur pengujian dilakukan dengan perhitungan rumus sebagai berikut:

1. Perhitungan zona hambat bentuk lingkaran

$$\text{Diameter} = \frac{(Dv - Dc) + (Dh - Dc)}{2}$$



Keterangan :

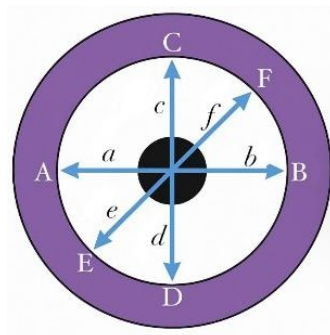
Dc : Diameter Cakram

Dv : Diameter Vertikal

Dh : Diameter Horizontal

**Gambar 3. 2** Rumus Pengukuran Zona Hambat Bentuk Lingkaran (Nabila *et al.*, 2020)

2. Perhitungan zona hambat berbentuk tidak lingkaran



Keterangan :

Garis A-B, C-D, E-F : Zona hambat yang terbentuk

Garis a-b, c-d, e-f : Diameter lubang sumuran

**Gambar 3. 3** Rumus Pengukuran Zona Hambat Tidak Bentuk Lingkaran  
(Urrohman *et al.*, 2023)

$$\text{Zona Hambat} = \frac{\text{Pengukuran I} + \text{II} + \text{III}}{3}$$

$$\text{Pengukuran I} = \frac{AB - ab}{2}$$

$$\text{Pengukuran II} = \frac{CD - cd}{2}$$

$$\text{Pengukuran III} = \frac{EF - ef}{2}$$

### 3.9 Analisis Data

#### 1. Analisis Univariat

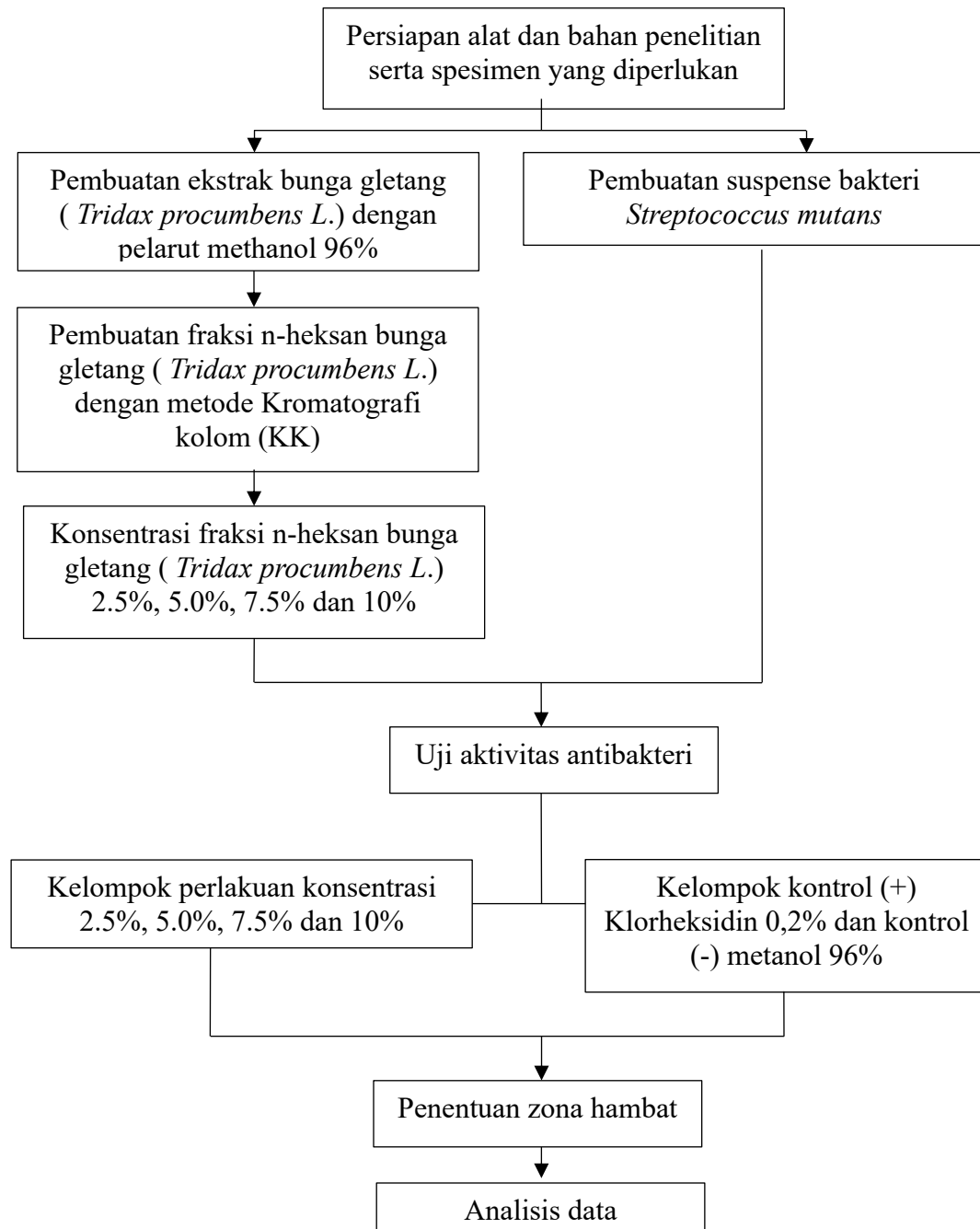
Data di analisis secara deskriptif untuk mengetahui apakah terdapat aktivitas antibakteri fraksi n-heksan bunga gletang terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Data yang disajikan dalam bentuk tabel serta grafik yang menunjukkan nilai mean  $\pm$  standar deviasi untuk masing-masing konsentrasi.

#### 2. Analisis Bivariat

Analisis bivariat digunakan untuk mengetahui adanya hubungan antara dua variable yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Pada peneliti ini digunakan analisis bivariat untuk mengetahui hubungan antar fraksi n-heksan tumbuhan gletang (*Tridax procumbens L.*) dengan konsentrasi 2.5%, 5.0%, 7.5% dan 10% terhadap zona hambat pertumbuhan pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* sebagai melihat sudahkah data berdistribusi normal atau tidak. Jika data penelitian yang didapat berdistribusi normal maka dilakukan uji statistic *One Way Anova* dan jika data tidak terdistribusi dengan normal maka dapat dilakukan uji *Kruskall Wallis*. Selanjutnya dilakukan

uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol positif.

### 3.10 Alur Penelitian



**Gambar 3. 4** Alur Penelitian