

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah *experimental laboratories*. Dilakukan terhadap biakan bakteri *Enterococcus faecalis* yang diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*).

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah bakteri *Enterococcus faecalis* hasil biakan murni laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel penelitian ini adalah ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan konsentrasi (10%, 15%, 20%, 25%) hasil dari pembuatan ekstrak di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu Laboratorium Farmasi dan Farmakologi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Untuk cara pengambilan sampel menggunakan rumus Federer.

Rumus Federer :

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

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah perlakuan

Perhitungan jumlah sampel yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah :

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

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

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

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

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah sampel yang diperlukan adalah 4 sampel pengulangan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan dengan rincian sebagai berikut :

- a. Kelompok perlakuan *calcium hydroxide* ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) 15% sebagai kontrol positif.
- b. Kelompok perlakuan kontrol negatif menggunakan aquades steril.
- c. Masing-masing konsentrasi ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) 10%, 15%, 20% dan 25%

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dilakukan di Laboratorium Penelitian Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada dan untuk penelitian uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Waktu Penelitian pada bulan Oktober-Desember 2014.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi

1. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) segar
2. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang muda
3. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang berasal dari tempat yang sama yaitu daerah Dlingo, Bantul

b. Kriteria Eksklusi

1. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) layu
2. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) busuk
3. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang tua

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

Variabel pengaruh dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan konsentrasi (10%, 15%, 20%, 25%).

2. Variabel Terpengaruh

Variabel terpengaruh dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media TSA (*Tryptone Soya Agar*).

3. Variabel Terkendali

- a. Jenis bakteri yang digunakan yaitu *Enterococcus faecalis*
- b. Asal tumbuh daun sirih merah (*Piper crocatum*) dari daerah Dlingo, Bantul
- c. Konsentrasi ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*)

- d. Konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml (Larutan BROWN III)
- e. Kondisi dan waktu inkubasi 24 jam
- f. Suhu ruangan 37^0
- g. Waktu pengamatan 2x24 jam
- h. Media pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* (NaCl 0,9%)

F. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) adalah ekstrak yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.
2. Konsentrasi ekstrak etanol adalah banyaknya ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang akan diaplikasikan pada biakan *Enterococcus faecalis* yaitu (10%, 15%, 20%, 25%).
3. Bakteri *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri gram positif hasil biakan murni laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
4. Daya Antibakteri ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) merupakan penilaian daya hambat ekstrak daun sirih merah terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* melalui uji difusi sumuran.
5. Metode difusi adalah uji kepekaan bakteri dengan cara membuat lubang sumuran TSA (*Tryptone Soya Agar*) yang telah ditanam bakteri *Enterococcus faecalis*, ditetesi dengan larutan uji dan dilakukan inkubasi sehingga zona radikal yang terbentuk dapat diukur. Setiap satu cawan petri terdapat 5 sumuran, dengan diameter sumuran yakni 5 mm dan kedalamannya 3 mm.

G. Alat dan Bahan Penelitian

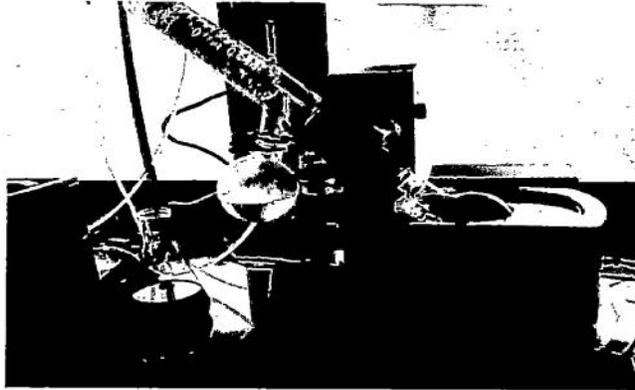
1. Alat

- a. Lampu spiritus digunakan untuk sterilisasi alat
- b. Almari pengering digunakan sebagai tempat untuk memekatkan ekstrak hasil evaporasi sehingga didapatkan ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*).
- c. Alat penyerbuk digunakan untuk menghancurkan daun sirih merah (*Piper crocatum*).
- d. Tabung *Erlenmeyer* digunakan untuk menampung filtrat.
- e. Corong *Buchner* digunakan untuk memisahkan filtrat dengan residu.
- f. *Vacuum rotary evaporator* digunakan untuk menguapkan penyari ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*).
- g. *Waterbath* digunakan untuk hasil saringan ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) pada saat akan diuapkan.
- h. Neraca timbang digunakan untuk menimbang daun sirih merah (*Piper crocatum*) dan ekstrak.
- i. Inkubator digunakan untuk mengeramkan bakteri *Enterococcus faecalis*.
- j. *Anoerobic jar* digunakan untuk menciptakan suasana anaerob bagi bakteri *Enterococcus faecalis*.

- k. Cawan petri digunakan untuk tempat bagi media uji kepekaan bakteri *Enterococcus faecalis*.
- l. Ose steril digunakan untuk mengambil koloni bakteri biakan murni.
- m. Mikropipet digunakan untuk mengambil larutan uji dan control.
- n. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi digunakan untuk tempat pembiakan bakteri, pengenceran ekstrak dan suspense bakteri.
- o. Kapas lidi steril digunakan untuk mengoleskan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media TSA.
- p. *Perforator* digunakan untuk membuat sumuran pada media agar.
- q. Jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm digunakan untuk mengukur zona radikal di sekitar sumuran pada cawan petri.
- r. Pipet ukur digunakan untuk mengambil larutan induk, *aquadest steril*.
- s. Pipet *Pasteur* digunakan untuk membuat lubang sumuran pada media agar.
- t. Kertas label digunakan untuk memberi tanda pada cawan petri yang berisi sumuran.



Gambar 4. A. Incubator, B. Tabung *Erlenmeyer*



Gambar 5. *Vacuum rotary evaporator*

2. Bahan

- a. Ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%.
- b. Bakteri yang dianalisis, *Enterococcus faecalis*
- c. Etanol 70% sebagai pelarut ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*)
- d. Aquadest steril sebagai kontrol negatif.
- e. Kalsium hidroksid (Ca(OH)_2) sebagai kontrol positif
- f. TSA (*Tryptone Soya Agar*) sebagai media untuk uji kepekaan bakteri *Enterococcus faecalis*.
- g. Media cair *Brain Heart Infusion* (BHI) sebagai pembiakan bakteri *Enterococcus faecalis* agar dicapai jumlah koloni bakteri 10^6 CFU/ml.

Jalannya Penelitian

Jalannya penelitian berupa pembuatan ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dan uji daya antibakteri *Enterococcus faecalis*.

Tahapan penelitiannya sebagai berikut :

1. Pembuatan ekstrak daun sirih merah

Pertama daun sirih merah (*Piper crocatum*) di petik dan dipilih daun yang muda sebanyak 250 gram. Kemudian daun dicuci bersih sampai kotoran yang menempel benar-benar hilang. Daun di timbang untuk mengetahui jumlah keseluruhan daun yang akan di ekstrak. Daun dipotong – potong dan dikeringkan dalam almari pengering dengan suhu 40-50⁰C. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang sudah kering dimasukkan kedalam mesin penyerbuk. Setelah menjadi serbuk ditimbang dengan neraca timbang sehingga memperoleh berat serbuk.

Kemudian dilakukan pembuatan ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam serbuk daun sirih merah dalam etanol 70% dan diaduk selama 30 menit dan didiamkan 24 jam. Serbuk daun di saring menggunakan corong *bucher*. Selanjutnya dilakukan pemisahan antara zat aktif dan etanol 70% menggunakan *vacuum evaporator*. Setelah dilakukan pemisahan, ekstrak etanol daun sirih merah cair dipanaskan pada *waterbath* menggunakan cawan porselen dan diaduk sampai ekstrak etanol daun sirih merah mengental.

2. Pembuatan suspensi bakteri *Enterococcus faecalis*

Suspensi bakteri dibuat sesuai standar Brown III 10^6 CFU/ml. Suspensi dibuat dengan mengambil beberapa ose bakteri *Enterococcus faecalis* menggunakan ose steril kemudian dimasukkan ke dalam 1 ml NaCl dan dikocok hingga homogeny. Inkubasi selama 3-5 jam pada suhu 37°C . Larutan NaCl yang telah dicampur bakteri dimasukkan ke dalam 9 ml media cair BHI (*Brain Heart Infusion*) sehingga sesuai dengan standart konsentrasi 10^6 CFU/ml.

3. Uji antibakteri

Untuk uji difusi agar, ekstrak diencerkan dalam tabung reaksi menjadi konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%. Ekstrak daun sirih merah diencerkan dimaksudkan agar mempermudah dalam memasukannya ke dalam tabung reaksi, membaginya menjadi berbagai konsentrasi dan mengaplikasikannya ke dalam sumuran agar dapat memperoleh hasil yang validitas. Tabung reaksi diisi oleh ekstrak etanol daun sirih merah dan aquadest steril sesuai konsentrasi yang telah ditentukan.

Tabung konsentrasi 10% diisi 0,2 ml ekstrak dan 1,8 ml aquades.

Tabung konsentrasi 15% diisi 0,3 ml ekstrak dan 1,7 ml aquades.

Tabung konsentrasi 20% diisi 0,4 ml ekstrak dan 1,6 ml aquades.

Tabung konsentrasi 25% diisi 0,5 ml ekstrak dan 1,5 ml aquades.

Tabung berlabel $\text{Ca}(\text{OH})_2$ diisi oleh pasta *calcium hydroxide* berkonsentrasi 15%. Terlebih dahulu pasta seberat 1 gram diencerkan dengan 1ml aquades, kemudian diambil sebanyak 0,15 ml ditambah aquades sebanyak 0,85 ml

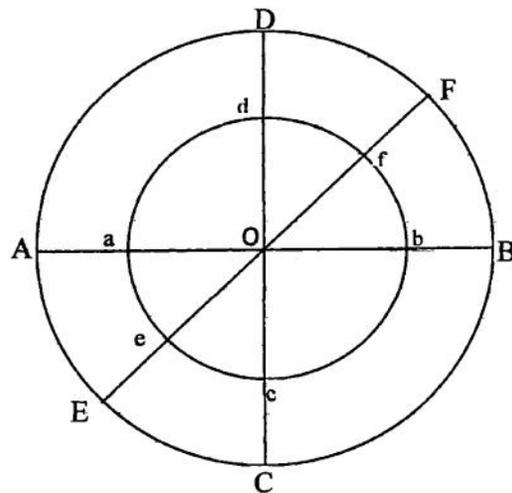
sehingga mencapai konsentrasi 10% larutan. Pasta *calcium hydroxide* diencerkan agar bentuk sediaannya sama dengan ekstrak daun sirih merah, sehingga hasil yang didapat dari pengujian daya antibakteri ekstrak daun sirih merah dan *calcium hydroxide* akan memiliki hasil yang valid. Tabung terakhir yaitu berlabel (-) berisi aquades steril.

Bakteri uji dibiakkan dipermukaan media TSA (*Tryptone Soya Agar*) cawan petri. Setiap cawan petri dilubangi 5 lubang sumuran dengan diameter 5 mm dan kedalaman 3mm. Lubang sumuran diisi dengan enceran ekstrak uji sampai permukaan. Inkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator. Hasil inkubasi akan menunjukkan adanya koloni bakteri uji dan zona bening disekitar sumuran, yang menandakan adanya efek penghambatan larutan uji terhadap bakteri uji. Zona bening yang ada merupakan zona hambat, dapat diukur dengan menggunakan jangka sorong.

4. Pengukuran zona radikal

Hasil dianalisa dengan mengukur zona radikal menggunakan jangka sorong. Cara pengukuran zona radikal yaitu dengan membuat dua garis tegak lurus yang melalui titik pusat dari lubang sumuran (garis AB dan CD). Garis yang terbentuk pada sumuran diberi nama garis ab dan cd. Pembuatan garis ketiga dilakukan dengan membuat garis diantara kedua garis tegak lurus yang sebelumnya telah dibuat (diantara garis AB dan CD). Garis ketiga membentuk sudut 45° terhadap garis AB dan CD. Garis ketiga diberi nama garis EF.

Garis ketiga yang terbentuk pada sumuran diberi nama ef. Ulangi hal yang sama pada setiap sumuran (Kartikasari dkk., 2008).



Gambar 6. Lingkaran menghitung zona hambat

Keterangan :

Titik O : Titik pusat lubang sumuran

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

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

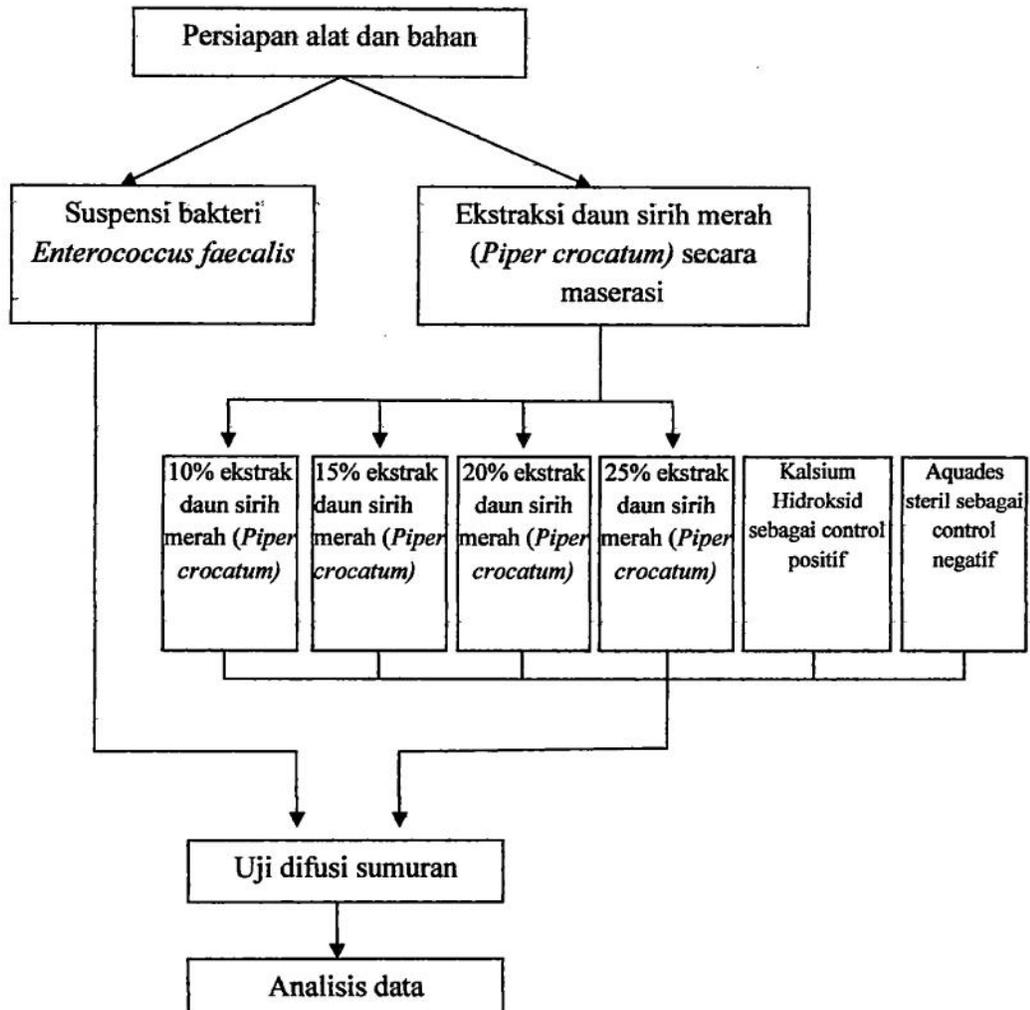
Pengukuran I : $(AB-ab)/2$

Pengukuran II : $(CD-cd)/2$

Pengukuran III : $(EF-ef)/2$

Zona radikal : $(\text{Pengukuran I} + \text{II} + \text{III})/3$

Skema jalannya penelitian



Gambar 7. Skema jalannya penelitian

Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel yang digunakan kurang dari sama dengan 50. Apabila data yang ditemukan berdistribusi normal dan homogen maka selanjutnya data dianalisis dengan uji parametrik *One Way ANOVA* dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$).