

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris *in vitro*.

B. Populasi dan sampel

Subyek penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri uji *Enterococcus faecalis* yang didapat dengan pengambilan secara langsung pada gigi pasien yang telah nekrosis di Rumah Sakit Gigi dan Mulut (RSGM) UMY dan dibiakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Subyek penelitian berjumlah 10 cawan petri yang masing-masing dibuat lubang sumuran sebanyak 4 buah sumuran, pada 5 cawan petri ditetesi ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) dengan beberapa konsentrasi (55%, 60%, 65% dan 70%), sedangkan 5 cawan petri yang lain ditetesi larutan kontrol (sodium hipoklorit 2,5% sebagai kontrol positif dan aquades steril sebagai kontrol negatif).

Jumlah subyek penelitian di hitung berdasarkan rumus *Federer*.

Rumus *Federer* :

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

Keterangan :

t = jumlah kelompok.

n = jumlah sampel

Perhitungan jumlah sampel yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah:

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

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

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

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

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah sampel yang diperlukan ditambah drop out 10% adalah 5 sampel pengulangan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan, dengan rincian sebagai berikut:

- a. 5 sampel untuk kelompok perlakuan sodium hipoklorit 2,5% sebagai kontrol positif.
- b. 5 sampel untuk kelompok perlakuan kontrol negatif menggunakan aquades.
- c. 5 sampel untuk masing-masing ekstrak etanol buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) 55%, 60%, 65%, dan 70%.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada untuk pembuatan ekstrak etanol buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) dengan metode maserasi. Sedangkan proses uji bakteri selanjutnya dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian akan dilakukan pada bulan Februari 2015.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh
 - a. Ekstrak buah ciplukan konsentrasi 55%, 60%, 65%, dan 70%.
 - b. Larutan sodium hipoklorit 2,5%.
2. Variabel terpengaruh

Zona radikal pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media TSA (*Trypton Soya Agar*) .
3. Variabel terkendali
 - a. Bakteri *E. faecalis*.
 - b. Suhu inkubator 37° C.
 - c. Kedalaman medium pada cawan petri 3 mm.
 - d. Ekstrak buah ciplukan konsentrasi 55%, 60%, 65%, dan 70%.
 - e. Etanol 70%.
 - f. Jenis media kultur bakteri TSA.
 - g. Lama inkubasi 24 jam.
 - h. Konsentrasi bakteri 10⁸ CFU/ml (Standar Brown III).
 - i. Diameter lubang sumuran 6 mm.
 - j. Volume larutan uji kontrol 5 ml.
 - k. Volume larutan pada tiap sumuran 50µl.
4. Variabel tak terkendali
 - a. Suhu ruangan laboratorium pada saat pengambilan bakteri *E. faecalis*.

E. Definisi Operasional

1. Daya antibakteri adalah kemampuan suatu bahan membunuh atau menghambat pertumbuhan dan metabolisme *E. faecalis*. Ini ditunjukkan dengan adanya zona yang tampak bening disekitar lubang sumuran dan zona tersebut tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri.
2. *Enterococcus faecalis* adalah bakteri anaerob fakultatif gram positif yang berbentuk kokus. Bakteri yang dipakai pada penelitian ini adalah bakteri *E. faecalis* gigi pasien yang telah nekrosis di Rumah Sakit Gigi dan Mulut (RSGM) UMY kemudian dibiakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
3. Ekstrak buah ciplukan adalah sediaan yang diperoleh dari buah ciplukan, menggunakan teknik maserasi dengan pelarut etanol 70%.
4. Sodium hipoklorit 2,5% adalah agen antibakteri spektrum luas yang digunakan pada prosedur terapi endodontik sebagai larutan irigasi saluran akar.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat
 - a. Autoklaf merek *all American*.
Digunakan untuk sterilisasi bahan-bahan basah.
 - b. Oven merek *mimmert*.
Digunakan untuk sterilisasi alat.

- c. Tabung Erlenmeyer.
Digunakan untuk menampung filtrate.
- d. *Vacum rotary evaporator*.
Digunakan untuk menguapkan ekstrak buah ciplukan.
- e. *Waterbath*
Digunakan sebagai tempat hasil saringan ekstrak ciplukan yang akan diuapkan (menguapkan air dengan ekstrak ciplukan).
- f. Neraca timbangan.
Digunakan untuk menimbang buah ciplukan dan ekstrak.
- g. Inkubator merek *memmert*.
Digunakan untuk mengeramkan bakteri *Enterococcus faecalis*.
- h. Anaerobic jar.
Digunakan untuk menciptakan suasana anaerob bagi bakteri *Enterococcus faecalis*.
- i. Cawan petri.
Digunakan untuk tempat media uji kepekaan bakteri *Enterococcus faecalis*.
- j. Ose steril.
Digunakan untuk mengembangbiakan *Enterococcus faecalis*.
- k. Mikropit.
Digunakan untuk meneteskan ekstrak ciplukan dan kontrol ke dalam lubang sumuran pada cawan petri.

- l. Tabung reaksi dan tabung rak tabung reaksi.

Digunakan untuk pengenceran dan tempat suspensi bakteri *Enterococcus faecalis*.

- m. Kapas lidi steril.

Digunakan untuk mengoleskan bakteri *Enterococcus faecalis* pada TSA.

- n. Pipet sebagai alat pelubang.

Digunakan untuk membuat lubang sumuran pada cawan petri.

- o. Jangka sorong (sliding caliper) dengan ketelitian 0,05 mm.

Digunakan untuk mengukur zona radikal (zona bunuh) sumuran pada cawan petri.

- p. Sarung tangan dan masker steril.

Digunakan untuk sterilisasi.

- q. Pipet ukur.

Digunakan untuk mengambil larutan induk, aquades steril dan sodium hipoklorit 2,5 %.

- r. Stirer magnetic.

Digunakan untuk mengaduk ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.).

2. Bahan penelitian

- a. Larutan sodium hipoklorit 2,5% sebagai kontrol positif.

- b. Ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) konsentrasi 55%, 60%, 65%, dan 70%.

- c. Larutan etanol 70% sebagai pelarut ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.).
- d. Aquades steril sebagai kontrol negatif.
- e. Sediaan bakteri *Enterococcus faecalis*.
- f. TSA (*Trypton Soya Agar*) sebagai media uji kepekaan bakteri *Enterococcus faecalis*.
- g. Media cair *Brain Cair Infusion* (BHI) sebagai pembiakan bakteri *Enterococcus faecalis* agar dicapai jumlah koloni bakteri 10^8 CFU/ml.

G. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak etanol buah ciplukan (*Physalis angulata* L.)

Tanaman ciplukan yang sudah diidentifikasi diambil buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) di cuci bersih dengan air sampai bersih lalu dipotong menjadi beberapa bagian. Buah ciplukan dikeringkan dengan menggunakan oven pada temperatur 60°C selama lima hari. Buah ciplukan dibuat serbuk dengan cara ditumbuk menggunakan mortar atau blender. Setelah mendapat serbuk, kemudian di maserasi selama 24 jam menggunakan etanol 70%. Hasil yang diperoleh disaring menggunakan corong Bucher. Filtrat I diuapkan menggunakan pelarut yang sama. Filtrat disaring dan didapatkan filtrat ke II. Filtrat I dan II dicampur lalu diuapkan pada suhu 60°C - 70°C hingga diperoleh ekstrak kental 100%. Kemudian ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) diencerkan

sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan yaitu 55%, 60%, 65%, dan 70%.

Tahap-tahap pengenceran adalah sebagai berikut :

- a. Ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) 55%
550 mg ekstrak buah ciplukan ditambah aquades steril sampai volume 1 ml di vortex hingga homogen.
- b. Ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) 60%
600 mg ekstrak buah ciplukan ditambah aquades steril sampai volume 1 ml di vortex hingga homogen.
- c. Ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) 65%
650 mg ekstrak buah ciplukan ditambah aquades steril sampai volume 1 ml di vortex hingga homogen.
- d. Ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) 70%
700 mg ekstrak buah ciplukan ditambah aquades steril sampai volume 1 ml di vortex hingga homogen.

2. Pengambilan bakteri *Enterococcus faecalis*

Saluran akar gigi pasien yang mengalami nekrosis pulpa yang telah dilakukan pembukaan orifis dan preparasi saluran akar. Dalam keadaan steril paper point dimasukkan ke dalam saluran akar untuk mengambil bakteri *Enterococcus faecalis*, kemudian paper point dimasukkan ke dalam apendot steril yang telah diisi NaCl. Apendot dimasukkan ke dalam toples yang berisi es, kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan,

Universitas Muhammadiyah Yogyakarta untuk dilakukan pembiakan bakteri.

3. Pembuatan suspensi bakteri *Enterococcus faecalis*

Pembuatan suspensi bakteri dibuat sesuai dengan standar Brown III 10^8 CFU/ml. Suspensi dibuat dengan mengambil beberapa ose yaitu 3-5 bakteri *Enterococcus faecalis* dengan menggunakan ose steril dan dimasukkan ke dalam 1 ml NaCl kemudian dikocok hingga homogen dan diinkubasi selama 3-5 jam pada suhu 37°C . Setelah diinkubasi, larutan NaCl yang telah dicampur dengan bakteri dimasukkan ke dalam 9 ml media cair BHI (*Brain Heart Infusion*) pada tabung reaksi sehingga sesuai dengan standar konsentrasi 10^8 CFU/ml.

4. Inokulasi suspensi bakteri pada media TSA (*Tryptone Soya Agar*)

Pada suspensi bakteri dicelupkan kapas lidi steril kemudian kapas tersebut ditekan pada dinding tabung, agar tidak terlalu basah dan dioleskan pada permukaan media TSA (*Tryptone Soya Agar*) pada 10 cawan petri yang telah tersedia secara merata. Setelah media TSA (*Tryptone Soya Agar*) diolesi dengan suspensi bakteri, 10 cawan petri tersebut dilubangi sejumlah 4 lubang sumuran menggunakan pipet pelubang dengan diameter 6 mm dan kedalaman 3 mm yang akan diisi dengan larutan uji.

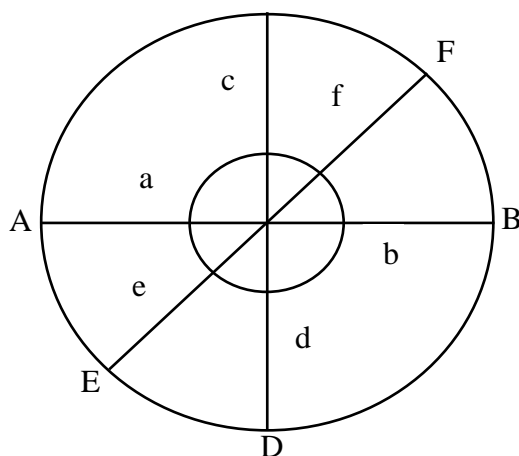
5. Uji daya antibakteri

Ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang telah dibuat dengan konsentrasi 55%, 60%, 65%, dan 70% masing-masing ditetaskan

dengan mikropipet sebanyak 50 μ l sodium hipoklorit 2,5% sebagai kontrol positif dan aquades steril sebagai kontrol negatif. Media yang telah ditetesi dengan larutan uji kemudian dimasukkan ke dalam inkubator dan diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C, supaya terjadi pertumbuhan koloni.

6. Pengukuran zona radikal

Hasil dibaca setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan mengukur zona radikal yaitu daerah bening di sekeliling sumuran yang tidak terdapat koloni bakteri. Pengukuran zona radikal yaitu dengan mengambil dua garis yang saling tegak lurus melalui titik pusat sumuran (0) serta 1 garis bersudut 45° terhadap garis AB atau CD melalui titik sumura yang sama dengan (ab) atau (cd). Pengukuran pertama menggunakan diameter zona radikal (AB) dikurangi diameter lubang sumuran (ab) kemudian hasilnya dibagi dua. Pengukuran kedua menggunakan diameter zona radikal (CD) dikurangi diameter lubang sumuran (cd) kemudian hasilnya dibagi dua. Pengukuran ketiga menggunakan diameter zona radikal (EF) dikurangi diameter lubang sumuran (ef) kemudian hasilnya dibagi dua. Hasil akhir dari pengukuran zona radikal adalah pengukuran pertama ditambah dengan pengukuran kedua ditambah dengan pengukuran ketiga kemudian hasilnya dibagi tiga (Kartikasari dkk., 2008).



Gambar 4. Cara pengukuran zona radikal

Keterangan :

- Aa, Bb, Cc, Dd, Ee, Ff : Zona radikal
 AB, CD, EF : Daerah bening
 ab, cd, ef : Diameter lubang sumuran
 O : Pusat sumuran
 Sudut AE : 45°

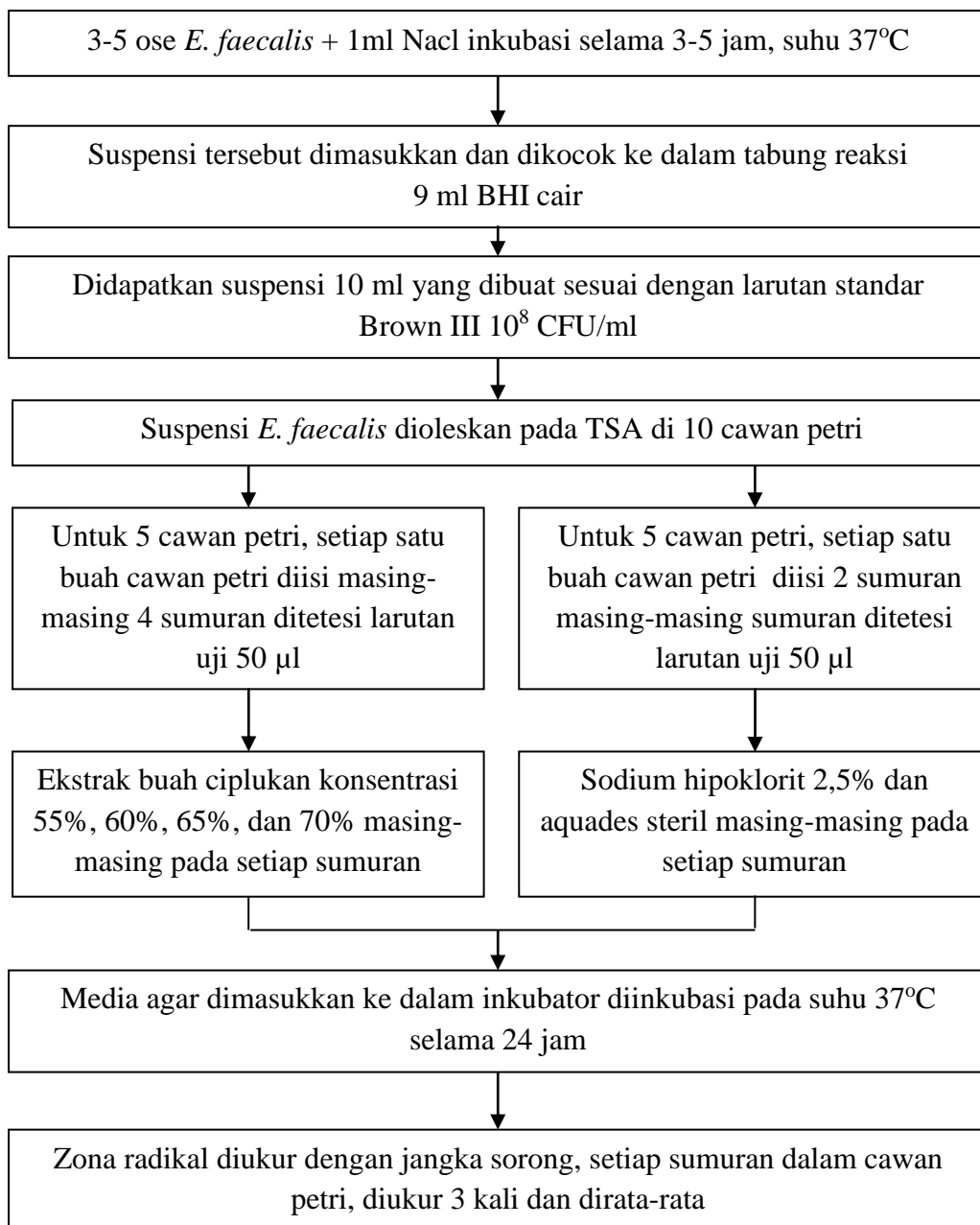
Rumus pengukuran zona radikal 1 sumuran :

$$\frac{\frac{1}{2} (AB - ab) + \frac{1}{2} (CD - cd) + \frac{1}{2} (EF - ef)}{3}$$

H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dilakukan uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk* karena sampel berjumlah kurang dari 50. Uji normalitas ini digunakan untuk mengetahui apakah sampel yang diambil berdasarkan dari populasi yang terdistribusi normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah kesembilan sampel mempunyai varians yang sama. Setelah uji normalitas dan uji homogenitas terpenuhi maka untuk mengetahui perbedaan efektivitas daya antibakteri antara sodium hipoklorit 2,5% dan ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap *Enterococcus faecalis* maka digunakan uji statistik *One Way Anova* dan apabila diketahui distribusi datanya tidak normal dan varians kesembilan sampel tidak sama, maka uji statistik yang digunakan adalah *Kruskal-Wallis*. Kemudian untuk mengetahui perbedaan efektivitas daya antibakteri antara setiap kelompok uji terhadap *Enterococcus faecalis* digunakan uji analisis LSD (*Least Significant Different*).

I. Alur penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

Keterangan :

BHI : *Brain Heart Infusion*

NaCl : *Natrium Klorida*

TSA : *Trypton Soya Agar*