

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris terhadap biakan bakteri *Enterococcus faecalis* yang diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*).

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi penelitian

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

2. Sampel penelitian

Sampel penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih merah (*Pipper crocatum*) dengan berbagai konsentrasi (10%, 15%, 20%, 25%, 30%) hasil dari pembuatan ekstrak di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu Laboratorium Farmasi dan Farmakologi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Kontrol positif yaitu *calcium hydroxide* ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) dalam bentuk pasta konsentrasi 10% dan sebagai kontrol negatif yaitu aquades steril. 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 :

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

$$(n-1)(7-1) \geq 15$$

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

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

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n = 4$$

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 *calcium hydroxide* (Ca(OH)_2) 10%.
- b. 5 sampel untuk kelompok perlakuan aquades steril.
- c. 5 sampel untuk masing-masing konsentrasi ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) 10%, 15%, 20%, 25% dan 30%.

C. Lokasi dan Waktu penelitian

Pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) dilakukan di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu Laboratorium Farmasi dan Farmakologi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan untuk penelitian uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Waktu Penelitian pada bulan November 2014 - Januari 2015.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi

1. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) berasal dari tempat yang sama.
2. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang muda dan segar
3. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang berasal dari tanaman berumur 2 – 3 bulan.

b. Kriteria Eksklusi

1. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang daunnya rusak.
2. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang busuk

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%, 30%).

2. Variabel Terpengaruh

Variabel terpengaruh dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* yang dilihat melalui kekeruhan pada media perbenihan dengan pengukuran nilai KHM dan KBM.

3. Variabel Terkendali

- a. Asal tumbuh daun sirih merah (*Piper crocatum*) dari tempat yang sama (Bantul)
- b. Jenis biakan bakteri *Enterococcus faecalis* yang digunakan.
- c. Jumlah bakteri *Enterococcus faecali* yang digunakan. (10^6 CFU/ml)
- d. Media pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*. (NaCl 0,9 %)
- e. Kondisi dan waktu inkubasi (18-24 jam)
- f. Temperatur ruangan (30° C)
- g. Waktu pengamatan (2 x 24 jam)

F. Definisi Operasional

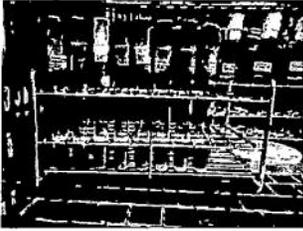
1. Ekstrak etanol daun sirih (*Piper crocatum*) adalah ekstrak yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.
2. Konsentrasi ekstrak etanol adalah banyaknya ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang akan diaplikasikan pada biakan bakteri *Enterococcus faecalis* yaitu (10%, 15%, 20%, 25%, 30%)
3. Bakteri *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri gram positif hasil biakan murni laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

4. KHM (Kadar Hambat Minimum) adalah konsentrasi minimal bahan coba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi 24 jam dan tidak tumbuh koloni bakteri yang diketahui dengan cara mengamati kekeruhan pada media perbenihan dengan menggunakan metode dilusi cair.
5. KBM (Kadar Bunuh Minimum) adalah konsentrasi minimal bahan coba yang dapat membunuh bakteri sebesar 99 % atau 100 % pada media agar.
6. Metode dilusi adalah uji kepekaan bakteri dengan cara mengamati kekeruhan berbagai konsentrasi dalam tabung atau media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan penanaman pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA).
7. Kontrol *Mc Farland* berisi bakteri yang disuspensikan dengan menggunakan larutan NaCl 0,9 % sampai diperoleh kekeruhan sesuai standar 0,5 *Mc Farland* atau sebanding dengan jumlah bakteri 1×10^8 CFU/ml. Untuk metode dilusi konsentrasi ini diencerkan lagi menjadi 1×10^6 CFU/ml.

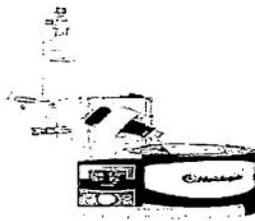
G. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat
 - a. Almari pengering untuk mengeringkan bahan uji (daun sirih merah) setelah dicuci dan dipotong.
 - b. Alat penyerbuk sebagai mesin penyerbuk bahan uji.

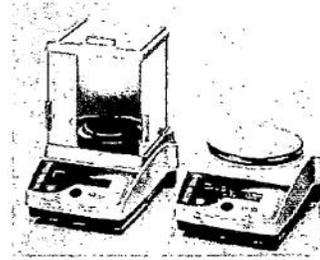
- c. Neraca digital elektronik (Mettler-Toledo GmbH, Switzerland) untuk menimbang dan memperoleh berat serbuk dan pasta
- d. Tabung *Erlenmeyer* (Pirex, Iwaki, Japan) digunakan sebagai wadah maserasi bahan uji dan pelarut
- e. Batang pengaduk untuk mengaduk ekstrak saat diencerkan dalam berbagai konsentrasi.
- f. *Vacum evaporator rotary* (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan) untuk menguapkan maserat sehingga diperoleh ekstrak kental
- g. Gelas *Vacum evaporator* (Jencons, Leighton Buzzard, England)
- h. Incubator sebagai alat inkubasi pada pembuatan suspensi bakteri
- i. Tabung reaksi sebagai tempat penuangan berbagai konsentrasi bahan uji
- j. Kertas Label untuk melabeli tabung reaksi supaya menghindari kekeliruan
- k. Gelas ukur (Duran, Germany) untuk menakar larutan dalam berbagai konsentrasi
- l. Autoclave untuk mensterilkan alat penelitian
- m. Cawan petri tempat berisi medium TSA (*Tryptone Soya Agar*)
- n. Pipet mikro dan tissue untuk meneteskan bahan uji
- o. Spatula untuk mencampurkan larutan
- p. Ose untuk mengoleskan larutan ke media padat
- q. LAF (*Laminar Air Flow*), ruangan untuk pengerjaan secara aseptis.



Gambar 4.
Tabung Reaksi



Gambar 5.
Vacum evaporator rotary



Gambar 6.
Neraca digital elektronik



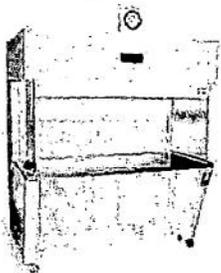
Gambar 7.
Corong Bucher



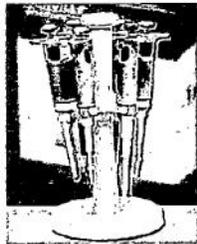
Gambar 8.
Tabung Erlenmeyer



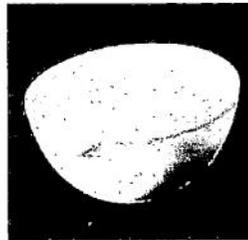
Gambar 9.
Cawan Petri



Gambar 10.
LAF (*Laminar Air Flow*)



Gambar 11.
Pipet



Gambar 12.
Cawan Porselen

2. Bahan

- a. Ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25% dan 30%.
- b. Larutan Etanol 70% sebagai pelarut ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*)
- c. Biakan bakteri *Enterococcus faecalis*
- d. Larutan NaCl 0,9% sebagai campuran larutan pada saat biakan spesimen bakteri
- e. Media cair *Brain Heart Infusion* (BHI) sebagai pembiakan bakteri *Enterococcus faecalis* agar dicapai jumlah koloni bakteri 10^6 CFU/ml.
- f. Media TSA (*Tryptone Soya Agar*)
- g. Kapas steril
- h. Aquades steril sebagai kontrol negatif
- i. Pasta *calcium hydroxide* (Ca(OH)_2) 10%
- j. Spirtus untuk mensterilkan ose
- k. *Handscoon* sebagai alat sterilisasi peneliti
- l. Masker sebagai alat sterilisasi peneliti

H. Jalannya Penelitian

Jalannya penelitian berupa pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) dan uji antibakteri *Enterococcus faecalis* menggunakan metode dilusi.

Tahapan penelitiannya sebagai berikut :

1. Persiapan sampel

Daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang muda dan segar dipetik lalu dicuci bersih sampai kotoran yang menempel benar-benar hilang. Daun sirih merah kemudian ditimbang untuk mengetahui jumlah keseluruhan daun yang akan di ekstrak. Daun dikeringkan dalam almari pengering dengan suhu 45⁰ C selama 3 hari untuk memastikan daun sirih merah sudah tidak ada airnya. Setelah itu daun ditimbang untuk mengetahui berat keseluruhan daun kering yaitu 800 gram.

2. Pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*)

Pembuatan ekstrak daun sirih merah yang telah kering ini menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam daun sirih merah ke dalam bejana maserasi secara terpisah kemudian diberi larutan etanol 70% sampai daun terendam sempurna. Bejana maserasi tersebut ditutup rapat dan didiamkan selama 2 hari sambil diaduk sekali setiap hari. Hasil yang diperoleh disaring dan diulang sebanyak tiga kali kemudian ditampung di dalam botol untuk selanjutnya dipekatan dengan menggunakan alat *rotator evaporator* pada suhu

70°C pada tekanan 1 ATM. Proses ini menyebabkan etanol menguap sehingga diperoleh ekstrak yang kental dari daun sirih merah. Dari proses tersebut didapatkan 100 ml ekstrak sirih merah kental.

3. Pemiakan spesimen bakteri

Biakan bakteri *Enterococcus faecalis* diinkubasi dalam suasana aerob pada suhu 37 °C selama 24 jam, lalu diamati apakah bakteri *Enterococcus faecalis* telah tumbuh subur dan murni didapat. Apabila pertumbuhan bakteri tidak subur dan terjadi kontaminasi bakteri lain atau jamur, prosedur pembiakan bakteri dan pengamatan diulang kembali sampai biakan yang didapat benar-benar murni. Kemudian sebanyak 1-2 ose dari biakan murni bakteri uji tersebut disuspensikan dalam larutan NaCl 0,9 % pada tabung reaksi steril, diinkubasi selama 2 – 4 jam pada suhu 37°C. Larutan tersebut kemudian diencerkan dengan cara dimasukkan ke dalam *Brain Heart Infusion* (BHI) hingga diperoleh jumlah kuman yang sesuai dengan jumlah larutan Standar Brown III dengan konsentrasi kuman 10^8 CFU/ml. Larutan diencerkan lagi hingga mencapai konsentrasi 10^6 CFU/ml.

4. Penentuan KHM dan KBM Bahan Uji

Uji daya antibakteri ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan metode pengenceran tabung (*tube dilution method*) adalah sebagai berikut :

- a. Disediakan tabung reaksi steril sebanyak 28 buah dengan 4 kali pengulangan. Satu kali pengulangan memerlukan 7 buah tabung reaksi yang masing - masing diberi label 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, Ca(OH)_2 sebagai kontrol negatif (-), aquades steril sebagai kontrol negatif (-) serta tabung berisi BHI sebagai control bahan sekaligus control positif (+)
- b. Tabung reaksi diisi oleh ekstrak etanol daun sirih merah dan aquadest steril sesuai konsentrasi yang telah ditentukan.
Tabung konsentrasi 10% diisi 0,10 ml ekstrak dan 0,90 ml aquades.
Tabung konsentrasi 15% diisi 0,15 ml ekstrak dan 0,85 ml aquades.
Tabung konsentrasi 20% diisi 0,2 ml ekstrak dan 0,80 ml aquades.
Tabung konsentrasi 25% diisi 0,25 ml ekstrak dan 0,75 ml aquades.
Tabung konsentrasi 30% diisi 0,30 ml ekstrak dan 0,70 ml aquades.
Tabung berlabel Ca(OH)_2 diisi oleh pasta *calcium hydroxide* berkonsentrasi 10%. Terlebih dahulu pasta seberat 1 gram diencerkan dengan 1ml aquades, kemudian diambil sebanyak 0,10 ml ditambah aquades sebanyak 0,90 ml sehingga mencapai konsentrasi 10% larutan. Tabung ini dijadikan sebagai control negatif. Tabung terakhir yaitu berlabel (-) berisi aquades steril.
- c. Selanjutnya ditambahkan suspense bakteri sebanyak 1 ml dengan mikropipet pada tabung 1 sampai 5. Tabung 6 berisi Ca(OH)_2 10% dan 1 ml bakteri (kontrol -). Tabung 7 berisi aquades steril. Tabung terakhir berisi media BHI sebagai kontrol bahan (kontrol +)

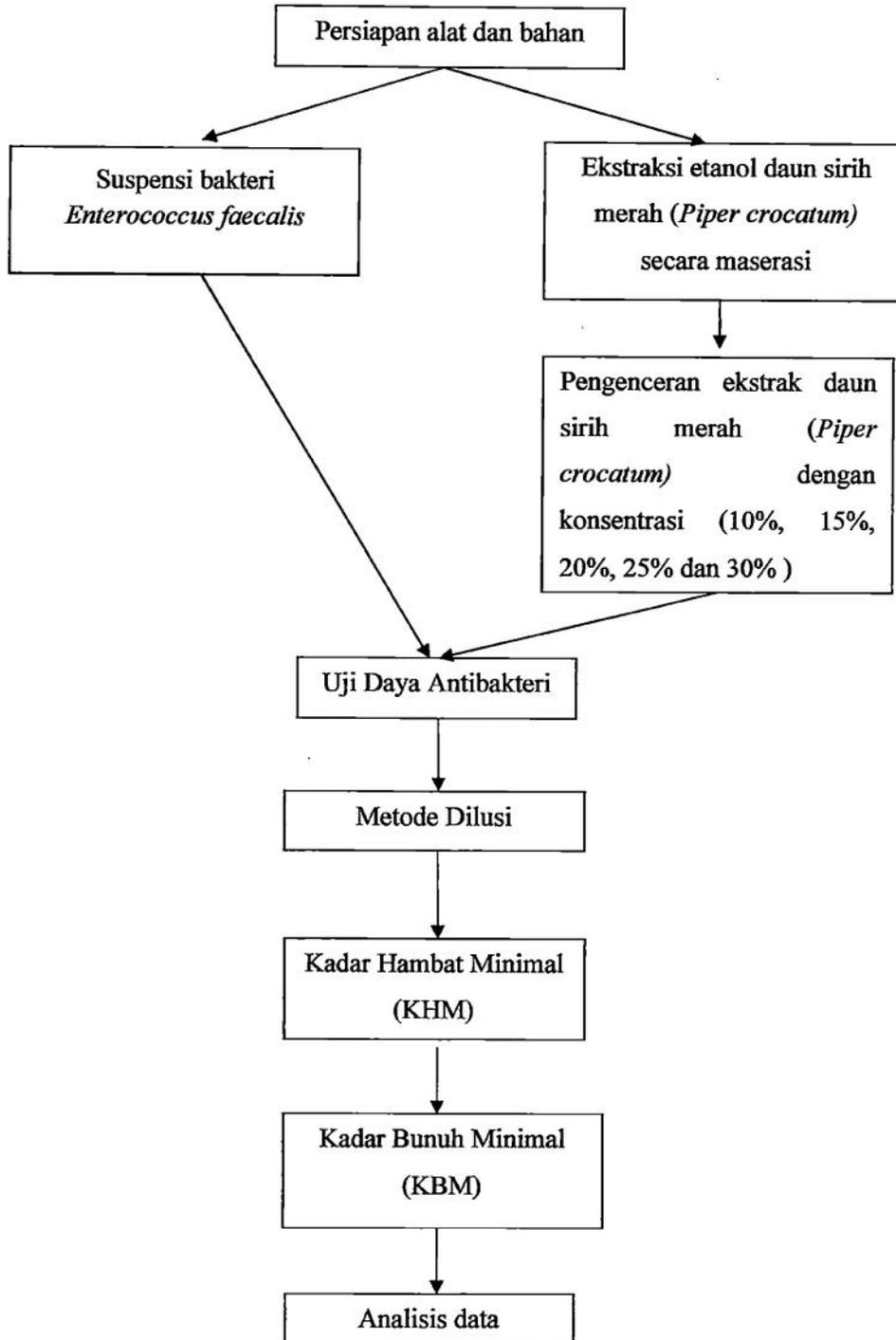
- d. Semua tabung diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37-37,5°C. Hari ke-2 semua tabung dikeluarkan dari *incubator* kemudian dilakukan pemeriksaan ada tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan dalam tabung. KHM ditentukan dengan memperhatikan tabung dengan konsentrasi yang pertama terlihat jernih. Tabung yang terlihat keruh menunjukkan masih adanya pertumbuhan bakteri. Tabung yang pertama kali terlihat jernih merupakan konsentrasi daun sirih yang akan digunakan pada pengujian terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*.
- e. Untuk mengetahui KBM dilakukan penggoresan kedelapan tabung hasil inkubasi hari ke-2 pada 4 medium TSA yang kemudian diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37-37,5°C sebanyak satu ose. KBM ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada medium TSA pada konsentrasi terendah.

Pembacaan KHM ditentukan dengan melihat kekeruhan pada cairan di dalam tabung reaksi yang dibandingkan dengan control standar dengan tanda sebagai berikut :

- a. Tanda negatif (-) menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* sehingga ekstrak etanol daun sirih merah dapat menghambat pertumbuhan bakteri.
- b. Tanda positif (+) menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* sehingga ekstrak etanol daun sirih merah tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

- c. Pembacaan KBM dapat ditentukan dengan menguji bahan menggunakan konsentrasi terkecil dari bahan uji yang masih dapat membunuh bakteri. Hal ini ditunjukkan dengan ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri *Enterococcus faecalis* pada media TSA .

Skema jalannya penelitian adalah sebagai berikut :



Gambar 13. Alur Penelitian

I. Analisis Data

Data dari hasil penelitian tersebut dianalisis secara deskriptif dalam bentuk tabel hasil penelitian. Hasil tersebut kemudian dibahas dengan melihat KHM dan KBM daya antibakteri ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*.