

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

##### A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental murni laboratoris secara in vitro.

##### B. Sampel Penelitian

###### 1. Bahan uji

Ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Kontrol negatif dengan *Aquadest* steril dan kontrol positif dengan NaOCl 5%. Penentuan jumlah pengulangan tindakan ke bakteri uji pada penelitian ini dengan menggunakan rumus kuasa uji yaitu:

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

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah kelompok

Perhitungan jumlah sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah:

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

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

$$(n-1) (4) \geq 15$$

$$(4n) - (4) \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n = 5$$

Berdasarkan perhitungan dengan rumus diatas didapatkan jumlah pengulangan tiap kelompok perlakuan minimal adalah 5 kali pengulangan. Besar sampel dalam penelitian ini sebanyak 35 sampel, yang terbagi menjadi 7 kelompok perlakuan yaitu 5 konsentrasi ekstrak kulit buah naga, NaOCl 5% sebagai kontrol positif, dan aquades sebagai kontrol negatif.

## 2. Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

## C. Lokasi penelitian

- a. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Farmasi UGM
- b. Pengambilan bakteri uji *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 di Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi DIY
- c. Penatalaksanaan penelitian di lab Mikrobiologi UMY

## D. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November-Desember 2017

## E. Variabel Penelitian

### 1. Variabel pengaruh

Ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%

## 2. Variabel terpengaruh

Zona radikal bakteri *Enterococcus faecalis* pada media MH (*Mueller Hinton*).

## 3. Variabel terkendali

- a. Ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%
- b. Teknik pembuatan ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dalam berbagai konsentrasi
- c. Jumlah NaOCL 5% yang diteteskan ke lubang sumuran
- d. Media pembiakan bakteri
- e. Konsentrasi bakteri *Enterococcus faecalis*  $10^8$  CFU/ml
- f. Cara mengolesi bakteri pada media MH
- g. Kontaminasi bakteri lainnya
- h. Umur buah naga merah

## F. Definsi operasional

Ekstrak kulit buah naga merah dengan bentuk sediaan kental diperoleh dari pengambilan sari kulit buah naga merah menggunakan teknik maserasi dengan penyaringan etanol 70%. Sediaan kental tersebut merupakan ekstrak konsentrasi 100% yang kemudian diencerkan dengan aquades steril sehingga menjadi konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%.

*Enterococcus faecalis* merupakan bakteri yang tumbuh pada media *Nutrient Agar* (NA) yang kemudian dilakukan pengenceran bakteri dan dibiakkan di media agar *Mueller Hinton* (MH).

Metode pengukuran daya antibakteri yang digunakan dalam pengukuran aktivitas mikroba pada penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran yaitu membuat lubang sumuran dengan *Perforator* berdiameter 6 mm diatas permukaan media agar yang telah di inokulasi bakteri, setelah itu diteteskan ekstrak dengan berbagai konsentrasi pada lubang sumuran kemudian diinkubasi, pertumbuhan bakteri dapat diamati dan di ukur diameter zona radikal disekitar lubang sumuran (Brooks, Butel, & Morse, 2008).

Irigasi saluran akar merupakan kunci dalam perawatan saluran akar. Irigasi yang ideal yaitu dapat membunuh bakteri, melarutkan jaringan nekrotik, sebagai pelumas, menghilangkan lapisan smear layer. Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan NaOCl konsentrasi 5%.

Pengukuran zona radikal dilakukan dengan mengukur jumlah diameter zona radikal dibagi tiga. Pengukuran zona radikal dilakukan dengan menggunakan *sliding caliper*, kemudian dilakukan perhitungan dengan rumus zona radikal suatu sumuran.

#### G. Alat penelitian

- a. Autoklaf alat yang digunakan untuk sterilisasi alat.
- b. Lampu spiritus yang digunakan untuk sterilisasi ose.
- c. Almari pengering atau oven yang digunakan untuk mengeringkan kulit buah naga merah.
- d. Tabung elenmeyer yang digunakan untuk menampung filtrat.
- e. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi yang digunakan sebagai tempat pembiakan bakteri, pengenceran bakteri, dan suspensi bakteri
- f. *Corong buncher* yang digunakan untuk memisahkan endapan dari campuran yang tidak terlarut.
- g. *Vacum rotary evaporation* yang digunakan untuk memisahkan suatu larutan dengan pelarutnya sehingga dapat menghasilkan ekstrak yang kental dengan kandungan kimia yang diinginkan.
- h. *Waterbath* yang digunakan untuk menguapkan ekstrak kulit buah naga merah.
- i. Neraca timbangan/ timbangan digital yang digunakan untuk menimbang kulit buah naga merah dan serbuk simplisia.

- j. Inkubator yang digunakan untuk menginkubasi bakteri *Enterococcus faecalis*.
- k. *Anaerobic jar* yang digunakan untuk menciptakan suasana anaerob bagi bakteri *Enterococcus faecalis*.
- l. *Perforator* untuk membuat lubang sumuran pada media MH
- m. Cawan petri yang digunakan sebagai media MH untuk penanaman bakteri dan media tumbuh koloni bakteri.
- n. Ose steril yang digunakan untuk mengambil bakteri *Enterococcus faecalis*.
- o. Mikropipet yang digunakan untuk mengambil cairan.
- p. Kapas lidi steril yang digunakan untuk mengoleskan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media agar MH.
- q. Jangka sorong yang digunakan untuk mengukur diameter sumuran pada cawan petri.
- r. Sarung tangan dan masker steril sebagai alat pelindung diri.
- s. *Stirer magnetic* yang digunakan sebagai alat pengaduk.
- t. Pipet ukur yang dimasukkan ke dalam tabung yang terdapat bahan uji.

#### H. Bahan penelitian

- a. Biakan bakteri *Enterococcus Faecalis*
- b. Ekstrak kulit buah naga merah dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%
- c. Larutan sodium hipoklorit (NaOCl) 5% sebagai kontrol positif
- d. Aquades steril sebagai kontrol negatif
- e. Media cair *Brain Heart Difussion* (BHI)

- f. Media MH (*Mueller Hinton*)
- g. Larutan Etanol 70% sebagai pelarut ekstrak

## I. Jalannya Penelitian

### 1. Persiapan penelitian

#### a. Perijinan penggunaan laboratorium

Membuat surat izin penggunaan laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY untuk penggunaan selama penelitian berlangsung. Setelah itu menguji validitas dan reabilitas instrumen penelitian dengan memastikan alat-alat yang digunakan dalam keadaan yang steril.

#### b. Sterilisasi alat

Alat yang digunakan dalam penelitian dicuci sampai bersih dan dikeringkan. Alat-alat seperti tabung reaksi, erlemayer, corong buncher, cawan petri, dan alat-alat lain yang terbuat dari gelas ditutup bagian mulutnya dengan kapas kemudian dibungkus dengan kertas koran, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat yang disterilkan adalah tabung elenmeyer, gelas ukur, petri *disk*, *perforator*, media MH, BHI, tabung reaksi. Jarum ose disterilkan menggunakan pemijaran langsung diatas nyala api (Rahma, Utami, & Fitri, 2010).

### 2. Tahapan Penelitian

#### a. Cara pembuatan ekstrak kulit buah naga merah

Buah naga merah di kupas kulitnya dan dibersihkan kulit buahnya dari daging buah, kemudian kulit buah naga merah tersebut di cuci sampai

bersih menggunakan air mengalir selanjutnya kulit buah naga merah dihilangkan sisiknya kemudian ditiriskan. Setelah itu kulit buah naga merah dipotong kecil-kecil dan di keringkan pada lemari pengering dengan suhu 45°C selama 48 jam.

Kulit buah naga merah yang sudah kering tersebut selanjutnya di haluskan dengan menggunakan blender lalu di ayak dengan ayakan berukuran 50 mesh, dan diperoleh serbuk simplisia halus. Simplisia tersebut selanjutnya direndam dengan larutan etanol 70% dengan perbandingan bahan pelarut (b/v) dan konsentrasi pelarut, pada toples kaca tertutup selama 24 jam kemudian dilakukan pengadukan secara berkala selama 30 menit menggunakan *stirer magnetic* selanjutnya di diamkan selama 24 jam dengan suhu ruang. Setelah 24 jam diaduk kembali dan didiamkan 24 jam lagi setelah itu di saring menggunakan corong *buchner* untuk memisahkan filtrat dengan residu.

Filtrat diuapkan menggunakan *vacum rotary evaporator* untuk menguapkan etanol 70% selama satu jam pada suhu 60-70°C dan menghasilkan ekstrak yang kental. Ekstrak kental tersebut dimasukkan kedalam cawan porselin, sisa pelarut dari ekstrak kental diuapkan dengan *waterbath* suhu 50°C dan didapatkan ekstrak kental. Kemudian ekstrak yang berbentuk sediaan kental tersebut dilarutkan dengan aquades steril untuk mendapatkan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% (Badan POM RI, 2010).

Tahap-tahap pengenceran ekstrak adalah sebagai berikut :

- 1.) Ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocerous polyrhilus*) konsentrasi 20%  
20 mg ekstrak kulit buah naga merah ditambah aquades steril sampai volume 80 ml di vortex hingga homogen.
- 2.) Ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocerous polyrhilus*) konsentrasi 40%  
40 mg ekstrak kulit buah naga merah ditambah aquades steril sampai volume 60 ml di vortex hingga homogen.
- 3.) Ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocerous polyrhilus*) konsentrasi 60%  
60 mg ekstrak kulit buah naga merah ditambah aquades steril sampai volume 40 ml di vortex hingga homogen.
- 4.) Ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocerous polyrhilus*) konsentrasi 80%  
80 mg ekstrak kulit buah naga merah ditambah aquades steril sampai volume 20 ml di vortex hingga homogen.
- 5.) Ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocerous polyrhilus*) konsentrasi 100%  
100 mg ekstrak kulit buah naga merah.

b. Pembuatan bakteri *Enterococcus faecalis*

1.) Pembuatan media pertumbuhan bakteri

Media pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Nutrient Agar* (NA) pada sediaan agar miring. Cara pembuatannya adalah pertama siapkan bahan-bahan medium NA yaitu Beef extract 3 g, peptone 5 g, agar 15 g, dan akuades 100ml. Tahap kedua melarutkan agar dengan akuades sebanyak 50 ml dipanaskan dan diaduk sampai homogen menggunakan *hot plate stirer*.

Tahap ketiga melarutkan *peptone* dan *beef extract* menggunakan larutan akuades kemudian diaduk sampai homogen, setelah itu tuangkan larutan ke larutan agar dan diaduk sampai homogen. Selanjutnya tuang larutan agar NA kedalam tabung reaksi untuk pembuatan agar miring kemudian tabung ditutup dengan kapas dan disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit setelah selesai di sterilisasi tabung dimiringkan pada rak tabung sampai dingin. Bakteri *Enterococcus faecalis* ditanamkan pada permukaan agar miring yang telah padat, selanjutnya agar miring yang sudah ditanam bakteri uji di inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

2.) Pembuatan suspensi bakteri *Enterococcus faecalis*

Suspensi bakteri dibuat dengan standar Brown III  $10^8$  CFU/ml. Suspensi dibuat dengan mengambil beberapa ose bakteri *Enterococcus faecalis* menggunakan ose steril kemudian dimasukkan ke dalam 1 ml NaCl dan dikocok hingga homogen. Inkubasi selama 3-5 jam pada suhu

37°C. Larutan NaCl yang telah dicampur bakteri dimasukkan ke dalam 9 ml media cair BHI sesuai dengan standar konsentrasi  $10^8$  CFU/ml.

3.) Pembuatan MH (*Mueller Hinton*) pada cawan petri

Masukkan medium MH, larutan aquades, dan agar kedalam labu erlemayer selanjutnya dipanaskan diatas *hot plate* dan diaduk menggunakan *stirer magnetic* sampai homogen. Media MH yang sudah homogen di sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media MH selanjutnya dimasukkan kedalam cawan petri.

4.) Inokulasi suspensi bakteri pada media agar

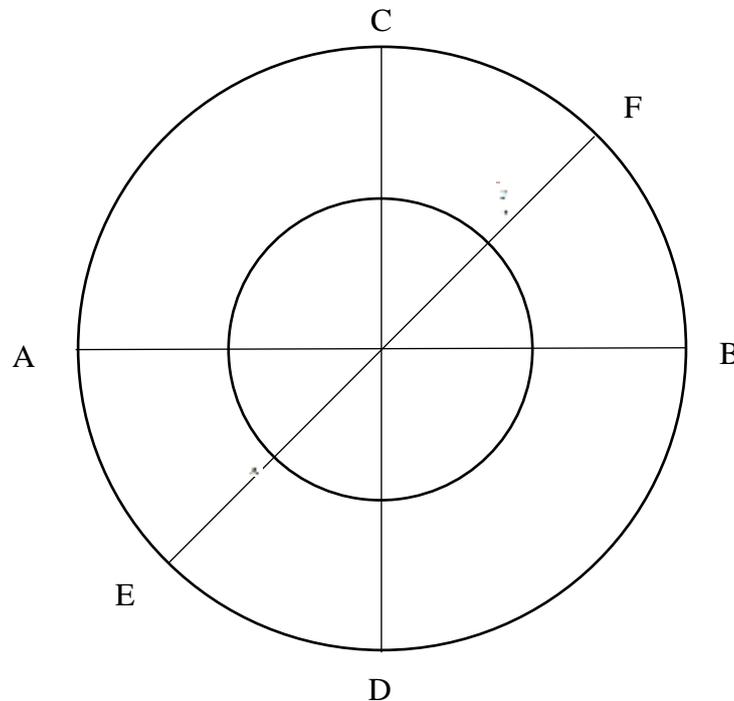
Mengambil suspensi bakteri cair dengan menggunakan kapas lidi steril yang dimasukkan ke dalam suspensi bakteri dan tekan pada dinding tabung agar tidak terlalu basah dan oleskan pada permukaan media MH pada setiap cawan petri sebanyak.

c. Uji daya antibakteri

Pada penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran yaitu membuat lubang sumuran dengan *Perforator* berdiameter 6 mm diatas permukaan media agar yang telah di inokulasi bakteri, setelah itu ditetaskan ekstrak kulit buah naga merah dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, NaOCl 5% sebagai kontrol positif, dan aquades steril sebagai kontrol negatif dengan menggunakan mikropipet. Cawan petri yang sudah berisi bakteri uji dan larutan uji dimasukkan ke dalam *anaerob jar*, dilanjutkan proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pertumbuhan bakteri dapat diamati dan di ukur diameter zona radikal disekitar lubang.

d. Pengukuran zona radikal

Pengukuran zona radikal dapat dibaca setelah diinkubasikan selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dalam suasana anaerob dan diukur menggunakan *sliding caliper*. Cara mengukur zona radikal yaitu dengan mengambil dua garis yang saling tegak lurus melalui titik pusat sumuran (garis AB dan CD). Garis selanjutnya dibuat dengan membuat satu garis bersudut  $45^{\circ}$  terhadap garis AB atau CD dan diberi nama garis EF. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap lubang sumuran (Irvati, 2003). Pengukuran dilakukan menggunakan penjumlahan diameter zona radikal AB, CD, EF, kemudian hasilnya dibagi tiga.



**Gambar 1.** Diagram Pengukuran Zona Radikal

Keterangan:

AB, CD, EF : zona radikal

Pengukuran zona radikal suatu sumuran:

$$\frac{AB + CD + EF}{3}$$

#### J. Analisis Data

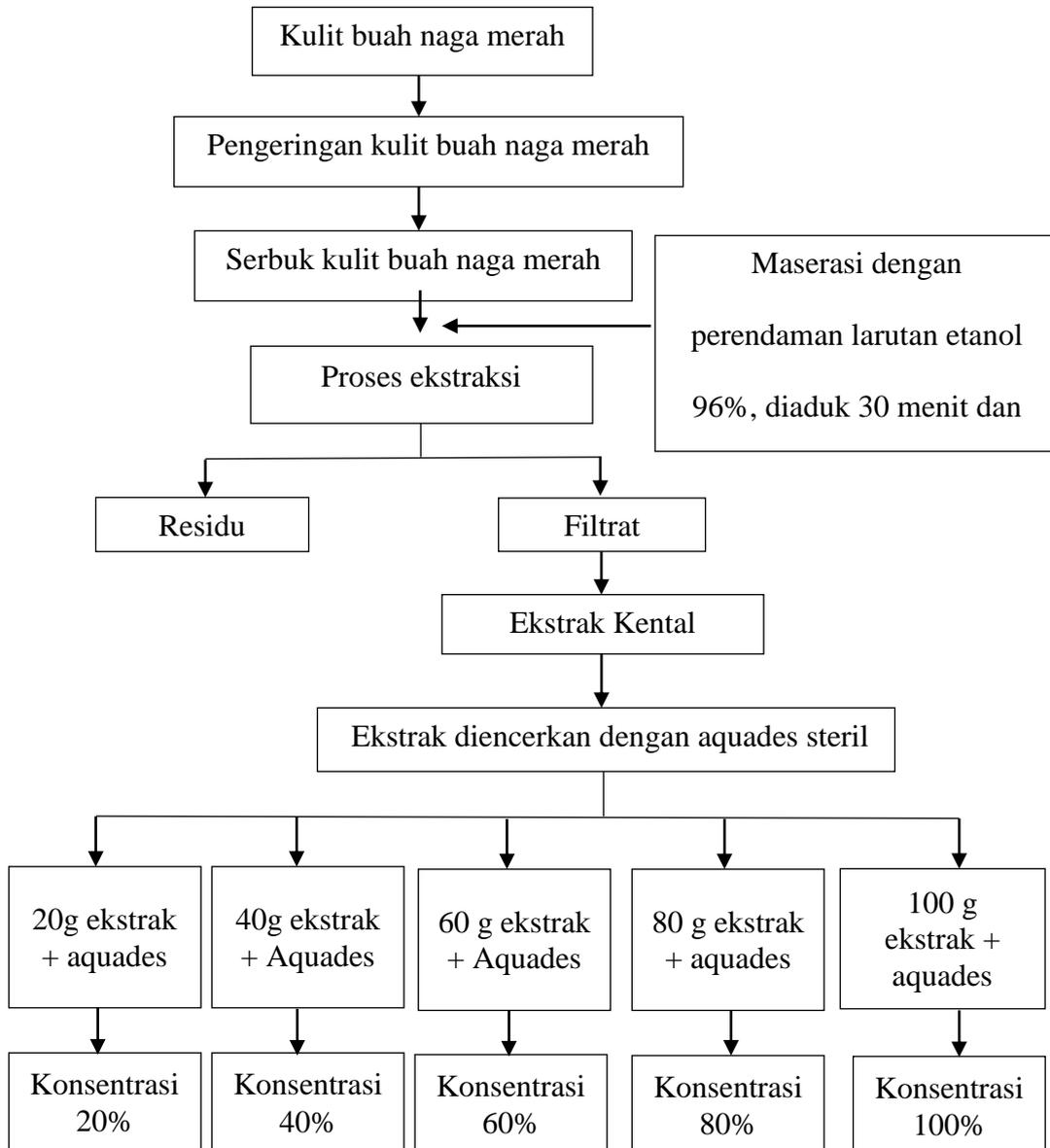
Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini diamati menggunakan uji statistik One-Way ANOVA. Uji statistik diawali dengan melakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui apakah sampel yang diambil berasal dari sampel yang terdistribusi normal.

Uji kedua dilakukan pengujian homogenitas untuk mengetahui apakah sampel yang diambil homogen. Uji ketiga dilakukan pengujian untuk mengetahui apakah konsentrasi ekstrak kulit buah naga merah sama atau tidak secara signifikan. Hasil yang didapat dari pengujian One-Way ANOVA dilanjutkan dengan analisa untuk mengetahui apakah hasil dari penelitian benar-benar memiliki perbedaan yang signifikan atau tidak dengan uji *Post Hoc* menggunakan *LSD*.

One-Way ANOVA tidak dapat dipakai jika hasil dari pengujian normalitas dan homogenitas tidak memenuhi syarat, maka penelitian dapat diamati dengan menggunakan *Kruskal-Wallis*. Analisis data dilanjutkan dengan analisa uji *Post Hoc* menggunakan *Mann-Whitney tes*. (Dahlan, 2013).

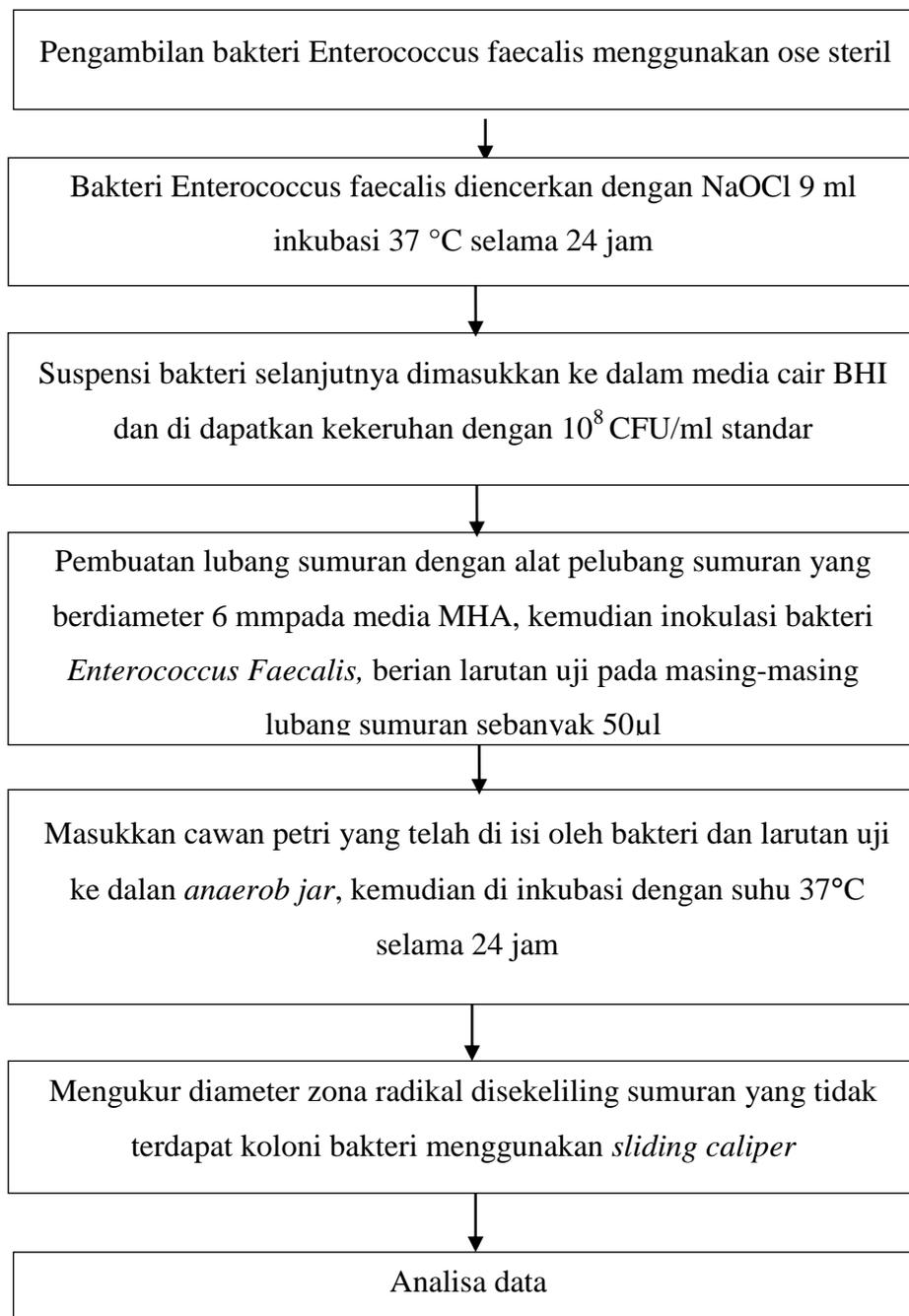
## K. Alur Penelitian

### a. Pembuatan ekstrak kulit buah naga merah



**Gambar 2.** Alur Penelitian Pembuatan Ekstrak

- b. Skema alur penelitian efek antibakteri ekstrak kulit buah naga merah terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*



Gambar 3. Alur Penelitian Daya Antibakteri