

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratoris secara *in vitro*, yaitu mengetahui adanya daya antibakteri pada ekstrak buah salak pondoh (*Salacca Zalacca* (Gaerth.)Voss) terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*.

B. Sampel Penelitian

1. Bahan uji

Ekstrak Buah salak pondoh (*Salacca Zalacca* (Gaerth.)Voss) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, NaOCl (*Sodium Hipoklorit*) 5% sebagai kontrol positif dan Aquadest steril sebagai kontrol negatif. Cara menentukan besar sampel yang dapat menggunakan rumus Federer (Hidayat, 2007) :

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

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

r = jumlah pengulangan

Perhitungan jumlah sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah:

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

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

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

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

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75$$

$$r = 5$$

Berdasarkan perhitungan dengan rumus diatas didapatkan jumlah pengulangan sebanyak 5 kali. Besar sampel dalam penelitian ini sebanyak 35 sampel, yang terbagi menjadi 7 kelompok perlakuan yaitu 5 konsentrasi ekstrak buah salak pondoh, sodium hipoklorit 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 dan Waktu penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Farmasi UGM
- b. Penatalaksanaan penelitian uji daya antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi UMY.
- c. Pengambilan bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 di Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Yogyakarta

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan November sampai Desember 2017

D. Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh

- a. Ekstrak buah salak pondoh (*Salacca Zalacca* (Gaerth.)Voss) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%
- b. NaOCl 5 %
- c. Aquades steril

2. Variabel terpengaruh

Zona radikal bakteri *Enterococcus faecalis* pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

3. Variabel terkendali

- a. Ekstrak buah salak pondoh (*Salacca Zalacca* (Gaerth.)Voss) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.
- b. Teknik pembuatan ekstrak salak pondoh pada berbagai konsentrasi
- c. Media pembiakan bakteri
- d. Konsentrasi bakteri *Enterococcus faecalis* 10^8 CFU/ml
- e. Cara mengolesi bakteri pada media MHA
- f. Umur buah salak pondoh

4. Variabel tidak terkendali

- a. Kontaminasi bakteri lainnya

E. Definisi Operasional

1. Daya Anti bakteri

Kemampuan suatu bahan atau obat untuk membunuh dan menghambat pertumbuhan bakteri secara *in vitro*. Pengukuran aktivitas daya antibakteri dapat dilakukan dengan dua metode yaitu metode difusi dan metode pengenceran atau dilusi. Pada penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran, yang dilakukan dengan cara membuat sumuran menggunakan alat pelubang sumuran pada media agar yang telah ditanami bakteri *Enterococcus faecalis* kemudian pada lubang sumuran tersebut ditetesi larutan uji (Pratiwi, 2008), Setelah itu diinkubasi, dan pertumbuhan bakteri dapat diamati dan diukur diameter zona hambat disekitar sumuran (Brooks, dkk., 2007).

2. Ekstrak buah salak pondoh

Sediaan kental yang diperoleh dengan pengambilan sari buah salak pondoh dengan menggunakan teknik maserasi dengan penyaringan etanol 70%. Ekstrak salak pondoh diencerkan dengan aquades steril sesuai dengan konsentrasinya yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

3. *Enterococcus faecalis*

Bakteri fakultatif anaerob gram positif yang berbentuk kokus (bulat), bakteri ini dapat tumbuh dengan ada atau tidaknya oksigen. Bakteri tersebut berkolonisasi, membentuk suatu biofilm yang dapat menyebabkan kegagalan pada perawatan saluran akar. Pada penelitian ini menggunakan bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (*American Type Culture Collection*), karena sebagai kontrol strain yang tepat apabila digunakan untuk percobaan klinis maupun laboratorium (Tong, dkk., 2014).

4. Irigasi saluran akar

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. Penelitian ini menggunakan NaOCl konsentrasi 5 % sebagai kontrol positif.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian

- a. *Autoklaf* merek *Hirayama* alat yang digunakan untuk sterilisasi alat.
- b. *Lampu spiritus* merek *Dochem* alat yang digunakan untuk sterilisasi ose.
- c. Almari pengering atau *oven* merek *memmert* alat yang digunakan untuk mengeringkan buah salak pondoh
- d. Alat penyerbuk alat untuk menghaluskan buah salak pondoh setelah dikeringkan menjadi bubuk simplisia
- e. Tabung *erlemeyer* merek *pyrex* alat yang digunakan untuk menampung filtrat hasil ekstraksi.
- f. *Corong buncher* merek *pyrex* alat yang digunakan untuk memisahkan endapan dari campuran yang tidak terlarut.
- g. *Vacum rotary evaporation* merek *Ika* alat yang digunakan untuk memisahkan suatu larutan dengan pelarutnya sehingga dapat menghasilkan ekstrak yang kental dengan kandungan kimia yang diinginkan.

- h. *Waterbath* merek *memmert* alat yang digunakan untuk menguapkan ekstrak buah salak pondoh. Sebagai tempat untuk hasil saringan ekstrak buah salak pondoh pada saat akan diuapkan.
- i. Neraca timbangan/Timbangan digital merek *Mark-Ion* alat yang digunakan untuk menimbang buah salak pondoh, bubuk simpisia, dan hasil ekstraksi.
- j. *Inkubator* merek *memmert* alat yang digunakan untuk menginkubasi bakteri *Enterococcus faecalis*.
- k. *Cawan petri* merek *pyrex* sebagai *Mueler Hinton Agar* (MHA) untuk penanaman bakteri dan media tumbuh koloni bakteri.
- l. *Ose steril* merek *pyrex* alat yang digunakan untuk pengambilan *Enterococcus faecalis*.
- m. *Mikropipet* merek *Dragon lab* alat yang digunakan untuk mengambil larutan uji dan kontrol.
- n. *Tabung reaksi* merek *pyrex* dan rak tabung reaksi sebagai tempat pembiakan bakteri, suspensi bakteri, dan pengenceran ekstrak.
- o. Kapas lidi steril digunakan untuk mengoleskan bakteri *Enterococcus faecalis* pada MHA
- p. Jangka sorong (*sliding caliper*) merek *Kenmaster* alat yang digunakan untuk mengukur zona radikal/ diameter zona bening disekitar sumuran pada media MHA.
- q. Sarung tangan merek *Sensi Gloves* dan masker steril merek *Sensi Mask* sebagai alat untuk perlindungan diri

- r. *Stirer magnetic* merek *Thermo Scientific* digunakan sebagai alat pengaduk.
- s. Pipet ukur merek *pyrex* alat yang dimasukkan ke dalam tabung yang terdapat bahan uji.
- t. *Laminar Air Flow* merek *Biobase* merupakan meja kerja steril untuk inokulasi bakteri

2. Bahan Penelitian

- a. Biakan bakteri *Enterococcus Faecalis*
- b. Ekstrak buah salak pondoh dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, dan Larutan etanol 70%
- c. Larutan NaOCl (*Sodium Hipoklorit*) 5 % sebagai kontrol positif
- d. Aquades sebagai kontrol negatif
- e. Media cair *Brain Heart Difussion* (BHI) dan Larutan NaCl
- f. Media MHA (*Mueler Hinton Agar*)

G. Jalannya Penelitian

1. Persiapan Penelitian

- a. Perijinan penggunaan laboratorium

Membuat surat ijin penggunaan laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY dan Laboratorium Farmasi UGM untuk penggunaan selama penelitian berlangsung.

b. Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan di cuci sampai bersih menggunakan detergen dan dikeringkan. Alat-alat seperti tabung reaksi, erlemayer, corong buncher, cawan petri, pipet ukur dan alat-alat lain yang terbuat dari gelas ditutup bagian mulutnya dengan kapas kemudian dibungkus dengan kertas payung, setelah itu disterilkan menggunakan autokalaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Jarum ose disterilkan menggunakan pemijaran langsung diatas nyala api (Rahma, dkk., 2010).

2. Tahapan penelitian

a. Cara pembuatan ekstrak salak pondoh

Buah salak di kupas kulitnya dan dibersihkan dari kulit arinya, kemudian buah salak tersebut di cuci sampai bersih menggunakan air mengalir selanjutnya buah salak pondoh diiris tipis tipis dengan pisau kemudian di keringan pada lemari pengering dengan suhu 45°C selama 48 jam. Salak yang sudah kering tersebut selanjutnya di haluskan dengan menggunakan blender lalu di ayak dengan ayakan berukuran 50 mesh, dan diperoleh simplisia halus. Simplisia halus dimasukkan ke dalam maserator dan ditambah larutan etanol 70% kemudian direndam selama 6 jam sesekali diaduk menggunakan *stirer magnetic*, kemudian didiamkan sampai 24 jam setelah itu di saring menggunakan corong *buchner* untuk memisahkan filtrat dengan residu. Maserat dipisahkan

dan proses diulang 2 kali dengan jenis dan pelarut yang sama. Maserat diuapkan menggunakan *vacum rotary evaporator* untuk menguapkan etanol 70% selama satu jam (sampai etanol tidak menetas) dan menghasilkan ekstrak yang kental. Ekstrak kental tersebut dimasukkan kedalam cawan porselin, sisa pelarut dari ekstrak kental diuapkan dengan *waterbath* suhu 50°C, kemudian ekstrak dilarutkan dengan aquades steril untuk mendapatkan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% (Badan POM, 2010).

Tahap-tahap pengenceran ekstrak untuk 10 ml adalah sebagai berikut :

- 1) Ekstrak buah salak pondoh (*Salacca Zalacca* (Gaerth.)Voss)
konsentrasi 20%
2 ml ekstrak buah salak pondoh ditambah aquades steril 8 ml sampai volume 10 ml di vortex hingga homogen
- 2) Ekstrak buah salak pondoh (*Salacca Zalacca* (Gaerth.)Voss)
konsentrasi 40%
4 ml ekstrak buah salak pondoh ditambah aquades steril 6 ml sampai volume 10 ml di vortex hingga homogen.
- 3) Ekstrak buah salak pondoh (*Salacca Zalacca* (Gaerth.)Voss)
konsentrasi 60%
6 ml ekstrak buah salak pondoh ditambah aquades steril 4 ml sampai volume 10 ml di vortex hingga homogen.
- 4) Ekstrak buah salak pondoh (*Salacca Zalacca* (Gaerth.)Voss)
konsentrasi 80%

8 ml ekstrak buah salak pondoh ditambah aquades steril 2 ml sampai volume 10 ml di vortex hingga homogen.

- 5) Ekstrak buah salak pondoh (*Salacca Zalacca* (Gaerth.)Voss) konsentrasi 100%
10 ml ekstrak murni buah salak pondoh.

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. Kedua melarutkan agar dengan akuades sebanyak 50 ml dipanaskan dan diaduk sampai homogen menggunakan *hot plate stirer*. 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 *Enterococcus faecalis* dibuat dengan cara mengambil beberapa ose yaitu 3-5 ose bakteri pada media agar dengan menggunakan ose steril kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dicampur dengan lautan NaCl sebanyak 1 ml kemudian dikocok sampai homogen, setelah homogen di inkubasi dengan suhu 37°C selama 3-5 jam. NaCl yang sudah dicampur bakteri tadi selesai diinkubasi selanjutnya dicampur dengan 9 ml media BHI (*Brain Heart Infusion*) cair pada tabung reaksi, sehingga di dapatkan konsentrasi 10^8 CFU/ml.

3) Pembuatan MHA (*Mueller Hinton Agar*) pada cawan petri

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

4) *Inokulasi*

Cawan petri yang sudah terisi oleh media MHA, dioleskan bakteri uji pada seluruh permukaan media MHA menggunakan *ose*

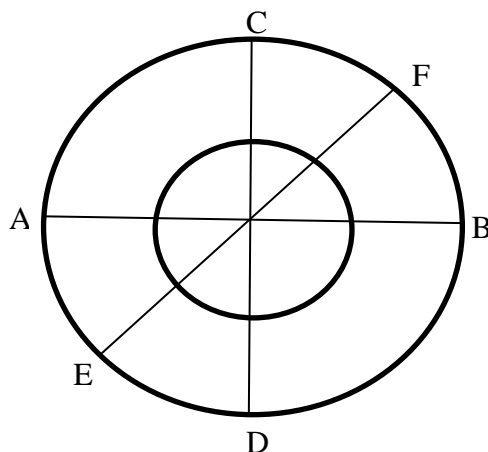
steril. Tunggu sampai 20 menit agar bakteri dapat mengendap pada media MHA.

c. Uji daya antibakteri

Uji daya antibakteri pada penelitian ini menggunakan difusi sumuran. Pada media MHA dibuatkan sumuran dengan alat pelubang sumuran yang berdiameter 6 mm, kemudian dilakukan *inokulasi* bakteri *Enterococcus Faecalis*, setelah itu diberi larutan uji yaitu ekstrak buah salak pondoh dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% , sodium hipoklorit sebagai kontrol positif, dan aquades steril sebagai kontrol negatif. Masing-masing larutan uji diteteskan pada lubang sumuran dengan menggunakan *mikropipet* sebanyak 50 μ m, dilanjutkan proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

d. Pengukuran zona hambat

Analisa hasil pengukuran zona hambat menggunakan *sliding calipper*, cara pengukurannya yaitu dengan membuat 2 garis tegak lurus melalui titik pusat lubang sumuran (garis AB dan CD), kemudian dibuat garis yang ketiga dengan membuat garis antara garis AB dan CD. Garis ketiga ini membentuk sudut 45° terhadap garis AB dan CD, garis ketiga diberi nama EF. Pada setiap lubang sumuran diberi perlakuan yang sama.



Gambar 4 Diagram Pengukuran Zona Hambat

Rumus pengukuran zona hambatan (Hudzicki, 2016) :

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

Keterangan :

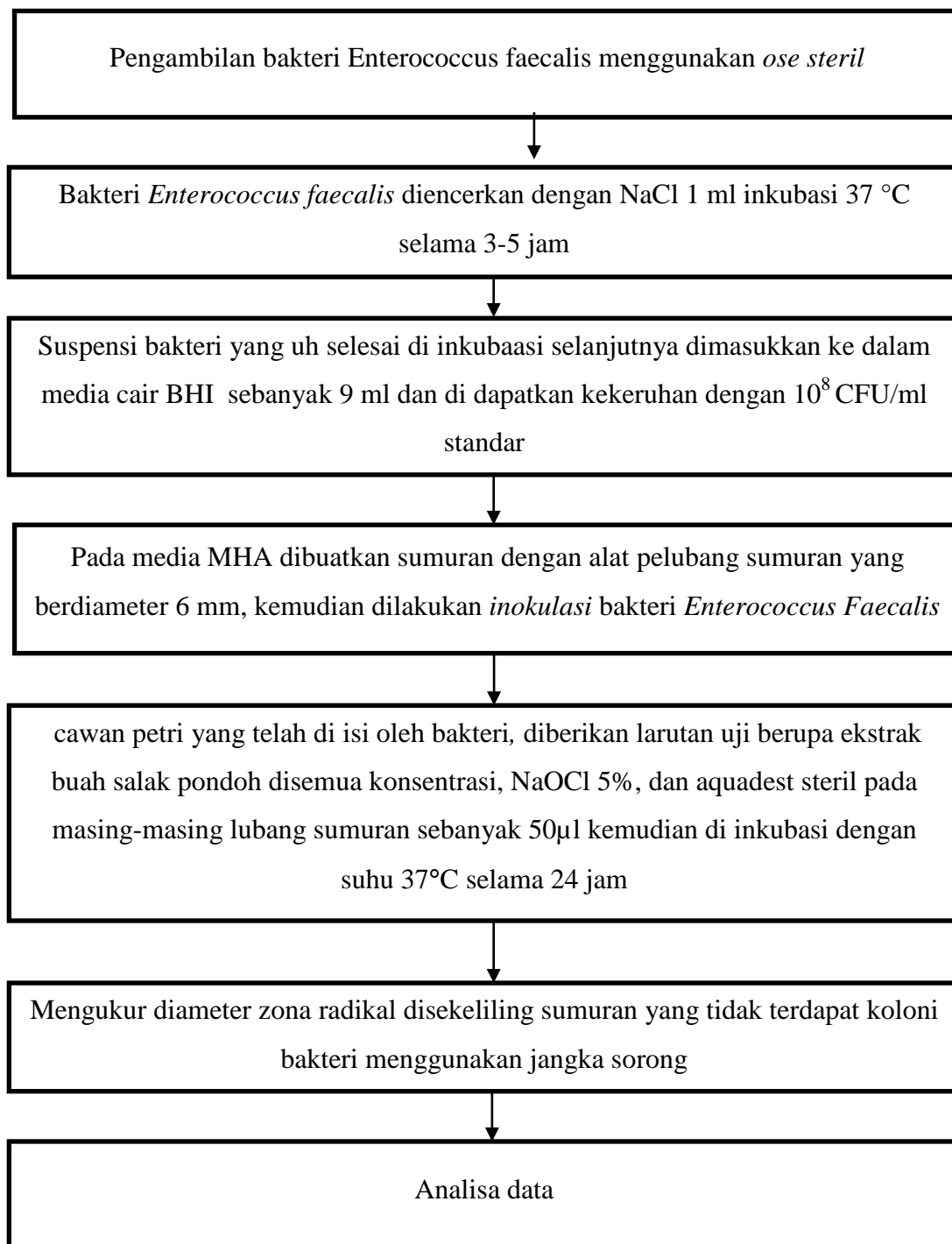
Garis AB, CD, dan EF : diameter daerah hambatan yang terbentuk

H. Analisa Data

Data dari hasil penelitian ini didapat dari hasil pengukuran diameter zona hambatan yang terbentuk pada setiap sumuran. 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. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah sampel memiliki variasi yang sama. Pengujian distribusi data normal

dan variasi sama maka dapat dilakukan pengujian berikutnya menggunakan uji analisa parametrik menggunakan *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan zona hambat yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi ekstrak buah salak pondoh sama atau tidak secara signifikan. Jika variabel tidak terdistribusi normal dan variasi tidak sama, maka alternatifnya dapat menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya menggunakan analisa *post hock* untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan. Jika analisa data menggunakan *One Way Anova* analisa *post hock* menggunakan *LSD*, dan apabila analisa data menggunakan *Kruskal Wallis* analisa *post hock* menggunakan *mann-whitney* (Dahlan, 2013).

Skema alur penelitian efek antibakteri ekstrak salak pondoh terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*



Gambar 5 Alur Penelitian Daya Antibakteri