

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian tentang pengaruh daya antibakteri ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*) khas Papua dengan sodium hipoklorit 2,5% terhadap *Staphylococcus aureus* menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratoris *In Vitro*.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang didapatkan dari biakan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Sampel penelitian

Bahan sampel penelitian yang digunakan adalah sarang semut (*Myrmecodia Pendans*) asli dari Papua. Ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*) dengan konsentrasi 15%, 25%, dan 50% dihasilkan dari pembuatan ekstrak di Laboratorium Farmakologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Jumlah minimal perlakuan dari tiap kelompok sampel akan dihitung menggunakan rumus Federer. Kelompok sampel berjumlah lima yaitu tiga konsentrasi ekstrak buah sarang Semut (*Myrmecodia Pendans*) yaitu dengan konsentrasi 15%, 25% dan 50%,

satu kontrol positif yaitu sodium hipoklorit 2,5%, dan 1 kontrol negatif yaitu aquades steril.

Rumus Federer :

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

keterangan :

n : jumlah ulangan

t : jumlah kelompok sampel

Perhitungan jumlah perlakuan pada kelompok sampel dalam penelitian menggunakan rumus federer adalah

Diketahui :

t: 5

Ditanyakan n : ?

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$= 5$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah perlakuan pada tiap kelompok sampel diperlukan minimal 5 kali perlakuan atau lebih dari 5 kali

perlakuan. Pada penelitian ini menggunakan 6 kali perlakuan pada tiap kelompok sampel dalam setiap cawan petri yang berbeda.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Farmakologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan januari sampai maret 2019.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

- a. Larutan sodium hipoklorit 2,5%
- b. Ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*) konsentrasi 15%, 25% dan 50%.

2. Variabel terpengaruh

Pengukuran bakteri *Staphylococcus aureus* didapatkan dari biakan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang terdapat pada media TSA diukur dengan zona radikal setelah dilakukan pemberian larutan sodium hipoklorit 2,5% dan ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*) konsentrasi 15%, 25% dan 50%.

3. Variabel terkendali

- a. Jarak perlakuan yang dilakukan pada tiap perlakuan 1 sampai 6 pada kelompok sampel ± 15 detik
- b. Diameter pada cawan petri 10 cm dan tinggi 1,5 cm
- c. Larutan etanol 96% sebagai pelarut

- d. Diameter sumuran yaitu 5 mm
 - e. Media kulture TSA
 - f. Media cair BHI
 - g. Volume ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*) dimasukkan ke dalam tiap sumuran 10 µl menggunakan pipet tetes
 - h. Lama pengeraman dalam inkubator (24 jam)
 - i. Suhu pengeraman 37⁰C
4. Variabel tidak terkontrol
- a. Penyebaran kontaminasi pada media
 - b. Suhu ruangan laboratorium

E. Definisi Operasional

1. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri berbentuk bulat dengan diameter 0,8-1 mikron, bergerombol menyerupai untaian anggur, merupakan bakteri gram positif, non motil, tidak membentuk spora, beberapa strain yang langsung diambil dari penderita membentuk semacam kapsul, koloni berwarna kuning emas, hemolisis pada blood agar, dapat tumbuh dalam media dengan konsentrasi NaCl hingga 15%, pada media MSA berwarna kuning, yang di inkubasikan pada suhu 37⁰ selama 24 jam (Tyasningsih dkk., 2010).
2. Sodium hipoklorit (NaOCl) merupakan bahan irigasi yang dianggap paling ideal untuk digunakan di seluruh instrumentasi karena memiliki antimikroba yang kuat dan aktivitas proteolitik. Tidak seperti bahan irigasi lainnya, NaOCl memiliki kemampuan unik untuk menghancurkan jaringan

nekrotik, serta sebagai komponen organik dari smear layer (Gambarini, dkk., 2012).

3. Zona radikal adalah daerah sekeliling lubang sumuran tidak adanya pertumbuhan bakteri yang diukur dari lubang sumuran sampai bagian terluar yang tidak adanya pertumbuhan bakteri menggunakan *sliding caliper*. Metode lubang atau sumuran *yaitu* membuat lubang terhadap agar padat yang telah di inokulasi bakteri. Jumlah dan letak bakteri disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang di injeksikan dengan ekstrak yang akan di uji, kemudian dilakukan inkubasi. Setelah inkubasi selesai, dilakukan pengamatan terhadap sekeliling lubang untuk mengamati apakah ada atau tidaknya daerah hambatan pada sekeliling lubang (Kusmayati dan Agustini, 2007).

F. Instrumen penelitian

1. Alat
 - a. Masker dan sarung tangan steril berfungsi mencegah terjadinya infeksi silang dan penularan kuman
 - b. Blender dan pengayak berfungsi menghaluskan dan memisahkan dari sarang semut (*Myrmecodia pendans*) yang masih keras
 - c. Tabung Erlenmeyer berfungsi menampung larutan yang akan digunakan dan menghomogenkan bahan-bahan komposisi media
 - d. Toples dan pengaduk berfungsi sebagai wadah dan alat untuk mencampurkan bahan uji
 - e. Cawan petri berfungsi sebagai pembiakan bakteri

- f. Ose steril berfungsi memindahkan biakan untuk ditumbuhkan ke dalam media
- g. Kapas lidi steril berfungsi sebagai alat untuk menggoreskan mikroba ke media
- h. Jangka sorong (*sliding caliper*) berfungsi untuk mengukur jarak lubang pada media
- i. Lampu spirtus berfungsi untuk menciptakan kondisi yang steril
- j. *Vacum rotary evaporator* berfungsi unuk pemisahan ekstrak dengan larutan pencairnya
- k. Tabung reaksi berfungsi sebagai wadah larutan dan pengembangan mikroba
- l. Rak tabung reaksi berfungsi sebagai tempat tabung reaksi
- m. Pipet tetes berfungsi membantu memindahkan cairan dari wadah satu ke wadah lainnya
- n. Sedotan stainless berfungsi sebagai pelubang pada media
- o. Kertas saring atau kain flannel berfungsi menyaring filtrat
- p. *Neraca digital* berfungsi menimbang media dan sampel
- q. Inkubator sebagai tempat inkubasi atau memeram mikroba dengan suhu terkontrol
- r. *Laminar Air Flow* (LAF) berfungsi sebagai ruangan pengerjaan aseptis
- s. *Waterbath* berfungsi menguapkan ekstrak menjadi ekstrak kental
- t. Kompor kecil berfungsi sebagai pemanas untuk melarutkan media dengan aquadest

- u. Corong gelas berfungsi membantu memasukkan larutan ke dalam tabung reaksi atau tabung erlenmeyer
 - v. Autoklaf berfungsi mensterilisasi suatu benda yang mempunyai uap bersuhu dan bertekanan tinggi
2. Bahan
- a. Larutan sodium hipoklorit 2,5% berfungsi sebagai kontrol positif
 - b. Ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*)
 - c. Larutan etanol 96% berfungsi sebagai larutan pengencer ekstrak
 - d. Media cair BHI berfungsi sebagai media suspensi bakteri
 - e. Bakteri *staphylococcus aureus*
 - f. Media TSA berfungsi sebagai media pertumbuhan bakteri
 - g. Aquadest steril berfungsi sebagai larutan pengencer media dan kontrol negatif

G. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan dan penyiapan bahan.

Pada penelitian ini digunakan bagian umbi dari tanaman sarang semut. Umbi yang diperoleh kemudian di kupas dari kulitnya, diiris tipis 3-5 mm, dan dibiarkan mengering diudara luar sehingga didapatkan umbi yang kering dan mudah patah. Irisan-irisan umbi kering tersebut kemudian digiling dengan menggunakan blender sehingga menjadi serbuk kasar yang lolos pengayak. Lalu pembuatan ekstrak etanol sarang semut dibuat dengan cara maserasi. Sebelum proses maserasi. Setelah itu, sebanyak 100 gram serbuk sarang semut yang telah ditimbang direndam dengan etanol 96%

diaduk dengan magnetik stirrer selama 2 jam didiamkan selama 24 jam, kemudian disaring dengan kain flanel. Filtrat etanol yang diperoleh disaring dengan corong gelas, ampas selanjutnya diremaserasi sebanyak 2 kali dengan perlakuan yang sama pada saat proses maserasi. Setelah itu, filtrat yang diperoleh digabung dan dipisahkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental etanol (Lisnanti, dkk., 2017).

Pada penelitian ini menggunakan tiga konsentrasi 15%, 25%, dan 50% untuk mengetahui pengaruh daya antibakteri yang diberikan pada masing-masing konsentrasi. Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Rian iswardanu (2017) tentang pengaruh ekstrak sarang semut terhadap pertumbuhan *candida albicans* dengan pemberian ekstrak sarang semut konsentrasi 10%, 20%, 40%, dan 80% menunjukkan konsentrasi 80% memiliki daya antibakteri dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Hal ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi maka semakin besar daya antibakteri yang diberikan. Pada penelitian ini menggunakan konsentrasi yang berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan, dengan konsentrasi 15%, 25%, dan 50% untuk mengetahui pengaruh efek antibakteri pada setiap konsentrasi.

Ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*) murni diencerkan sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan yaitu 15%, 25%, dan 50% menggunakan aquades steril, dengan rumus yaitu:

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

Konsentrasi = 50 mg/5 ml \rightarrow 1 g/100 ml \rightarrow 1%

Keterangan :

V1 = Volume larutan yang akan diencerkan (ml)

M1 = Konsentrasi ekstrak yang tersedia (%)

V2 = Volume larutan (air + ekstrak) yang diinginkan (ml)

M2 = konsentrasi ekstrak yang akan dibuat (%)

- a. Konsentrasi ekstrak 15% buah sarang semut (*Myrmecodia pendans*) =
150 mg ekstrak kental buah sarang semut (*Myrmecodia pendans*) + 1ml
aquades steril kemudian di vortex hingga homogen.
- b. Konsentrasi ekstrak 25% buah sarang semut (*Myrmecodia pendans*) =
250 mg ekstrak kental buah sarang semut (*Myrmecodia pendans*) + 1ml
aquades steril kemudian di vortex hingga homogen.
- c. Konsentrasi ekstrak 50% buah sarang semut (*Myrmecodia pendans*) =
500 mg ekstrak kental buah sarang semut (*Myrmecodia pendans*) + 1ml
aquades steril kemudian di vortex hingga homogen.

2. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembiakan bakteri dengan mengambil sebanyak 3-5 ose lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml ke dalam media cair BHI lalu diinkubasi selama 24 jam. (Wardhani, 2012).

3. Inokulasi Suspensi Bakteri pada Media Agar

Pemindahan suspensi bakteri ke dalam media agar menggunakan kapas lidi steril yang dicelupkan pada suspensi bakteri, kemudian kapas lidi steril di tekan pada dinding tabung agar tidak terlalu basah dan dioleskan pada permukaan media kulture TSA dalam 12 cawan petri. Pada 6 cawan

petri dilubangi 3 sumuran menggunakan sedotan stainless sebagai pelubang dengan diameter 5 mm.. Pada cawan tersebut, setiap 1 cawan petri ditetesi larutan uji ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*) dengan konsentrasi 15%, 25%, dan 50% dan 6 cawan petri berikutnya setiap 1 cawan petri dilubangi 2 sumuran dan ditetesi sodium hipoklorit dan larutan aquades steril.

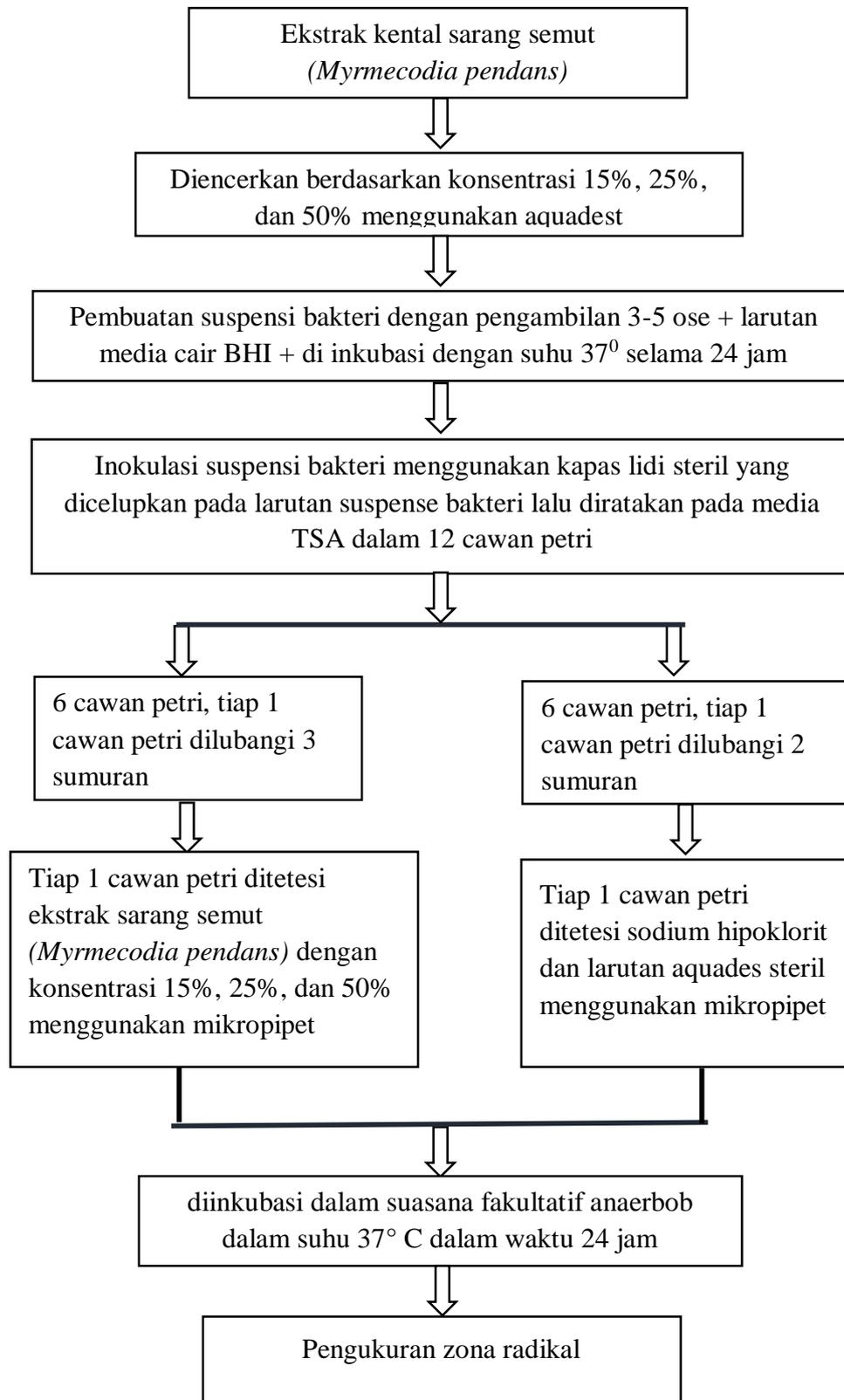
4. Uji daya antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak sarang semut dan sodium hipoklorit terhadap *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi sumuran. Zona bening tanpa pertumbuhan bakteri disekitar lubang sumuran yang telah ditetesi ekstrak sarang semut dalam berbagai konsentrasi dan sodium hipoklorit serta aquadest steril didapatkan setelah lempeng diinkubasi dalam suasana fakultatif anaerob dalam suhu 37° C, dalam waktu 24 jam (Apriyanti, dkk., 2016).

5. Pengukuran zona radikal

Zona radikal adalah daerah sekeliling lubang sumuran tidak adanya pertumbuhan bakteri yang diukur dari lubang sumuran sampai bagian terluar yang tidak adanya pertumbuhan bakteri menggunakan *sliding caliper*. Metode lubang atau sumuran yaitu membuat lubang terhadap agar padat yang telah di inokulasi bakteri. Jumlah dan letak bakteri disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang di injeksikan dengan ekstrak yang akan di uji, kemudian dilakukan inkubasi. Setelah inkubasi selesai, dilakukan pengamatan terhadap sekeliling lubang untuk mengamati apakah ada atau tidaknya daerah hambatan pada sekeliling lubang (Kusmayati dan Agustini, 2007).

H. Alur Penelitian



I. Analisis Data

Hasil data yang diperoleh dari penelitian pertama perlu dilakukan uji normalitas terlebih dahulu menggunakan metode Shapiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50. Uji normalitas ini digunakan untuk mengetahui apakah dari sampel di dapatkan populasi yang simetris atau terdistribusi normal. Kemudian dilakukakan uji homogenitas untuk mengetahui apakah data yang dihasilkan dari populasi mempunyai varians sama (homogen) atau tidak dan apakah distribusi normal arau sebaliknya.

Setelah uji keduanya terpenuhi, kemudian dilakukan uji statistik one way anova untuk mengetahui perbedaan pengaruh antibakteri antara ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*) khas Papua dengan sodium hipoklorit 2,5% terhadap *Staphylococcus aureus*, kemudian dilanjutkan uji LSD (*Least Significant Different*) untuk mengetahui perbedaan rata-rata dua populasi sampel antara pengaruh daya antibakteri setiap kelompok uji terhadap *Staphylococcus aureus*. Apabila dihasilkan bahwa varians tidak sama atau tidak homogen dan distribusi data tidak normal, maka uji statistik diganti dengan uji statistik Kruskal-wallis.