

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental secara laboratoris *In Vitro*.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan penelitian adalah biakan murni bakteri *Enterococcus faecalis*.

2. Sampel

Sampel penelitian yang digunakan penelitian adalah tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendans*) yang diambil umbi diperoleh dari Papua, Indonesia. Ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*) dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 40% yang diperoleh dari pembuatan ekstrak dilaksanakan di laboratorium teknologi farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Penentuan jumlah sampel dilakukan dengan perhitungan rumus Federer. Kelompok perlakuan berjumlah empat yaitu tiga konsentrasi ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*) dengan konsentrasi 10%, 20%, 40% dan sodium hipoklorit (NaOCl) konsentrasi 2,5% sebagai kontrol positif.

Rumus Federer:

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

Keterangan:

t = Jumlah perlakuan pada penelitian

r = Jumlah perlakuan ulang dalam sampel

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

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

$$3(r-1) \geq 15$$

$$3r-3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan hasil perhitungan dengan Rumus Federer, didapatkan hasil bahwa jumlah sampel perlakuan dalam penelitian diperlukan minimal 6 kali perlakuan atau lebih 6 kali perlakuan. Pada penelitian ini menggunakan 6 kali perlakuan pada tiap kelompok sampel dalam setiap cawan petri yang berbeda.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di laboratorium mikrobiologi dan teknologi farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Januari sampai Maret 2019.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

Ekstrak tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendans*) dengan konsentrasi 10%, 20%, 40% dan sodium hipoklorit (NaOCl) konsentrasi 2,5% sebagai kontrol positif.

2. Variabel Terpengaruh

Pertumbuhan bakteri *E. faecalis*

3. Variabel Terkendali

- a. Diameter lubang sumuran (5 mm)
- b. Ketebalan medium pada cawan petri ($\pm 0,6$ cm)
- c. Volume larutan yang diteteskan dalam sumuran (50 μ l)
- d. Lama waktu inkubasi (24 jam)
- e. Temperatur inkubasi (37°C)
- f. Ekstrak tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendans*) dengan konsentrasi 10%, 20%, 40%
- g. Jarak perlakuan yang dilakukan pada tiap perlakuan 1 sampai 6 pada kelompok sampel ± 15 detik

4. Variabel Tidak Terkendali

- a. Suhu ruangan laboratorium
- b. Kecepatan pertumbuhan bakteri

E. Definisi Operasional

1. Daya antibakteri

Daya antibakteri merupakan kemampuan senyawa yang dihasilkan suatu bahan dalam konsentrasi kecil dapat menghambat sampai membunuh pertumbuhan bakteri. Ditunjukkan dengan adanya zona hambat berupa zona bening disekitar lubang sumuran yang mengandung ekstrak tanaman sarang semut dengan berbagai konsentrasi serta pada zona tersebut tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Zona tersebut diukur dengan menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter.

2. Ekstrak tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendans*)

Ekstrak tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendans*) diperoleh dari umbi sarang semut yang dikeringkan terlebih dahulu kemudian diekstraksi dengan menggunakan teknik maserasi dengan pelarut etanol 96%.

3. *Enterococcus faecalis* (*E. Faecalis*)

Enterococcus faecalis (*E. Faecalis*) merupakan bakteri gram positif, berbentuk kokus, dan non motil. Bakteri yang digunakan pada penelitian adalah hasil biakan murni bakteri *E. Faecalis* dikultur pada media MHA (*Muller Hinton Agar*).

F. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian adalah :

1. Alat:
 - a. Oven untuk mengeringkan tanaman sarang semut
 - b. Alat penghancur (blender) untuk menghaluskan tanaman sarang semut
 - c. Bejana maserasi untuk maserasi tanaman sarang semut
 - d. Timbangan digital untuk menimbang serbuk sarang semut
 - e. Corong *Bucher* untuk menyaring ekstrak sarang semut
 - f. *Waterbath* untuk menguapkan air dari ekstrak sarang semut
 - g. Mikropipet dan tip
 - h. *Vacuum rotary evaporation* untuk menguapkan etanol 96%
 - i. Lampu spiritus untuk sterilisasi
 - j. Kapas lidi steril untuk mengusap suspensi bakteri media agar
 - k. Ose untuk mengambil koloni bakteri biakan murni
 - l. Cawan petri sebagai tempat media agar
 - m. Sedotan stainless steel sebagai alat pelubang media untuk membuat sumuran
 - n. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi
 - o. Inkubator sebagai pertumbuhan koloni bakteri
 - p. Spidol dan label untuk memberi tanda pada cawan petri
 - q. Jangka sorong untuk mengukur zona hambat
 - r. Spiritus

2. Bahan

- a. Umbi tanaman sarang semut
- b. Sediaan bakteri *E. faecalis*
- c. Sodium hipoklorit (NaOCl) 2,5% sebagai kontrol positif
- d. Etanol 96% sebagai pelarut ekstrak sarang semut
- e. Akuades sebagai pengencer ekstrak sarang semut
- f. *Muller Hinton Agar* sebagai media pembiakan bakteri
- g. *Brain Heart Infusion* cair sebagai media suspensi bakteri

G. Jalannya Penelitian

1. Persiapan Penelitian

Mempersiapkan alat serta bahan dan sterilisasi alat serta diri.

2. Pembuatan Ekstrak Sarang Semut

Tanaman sarang semut diekstraksi di laboratorium teknologi farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Terlebih dahulu dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir kemudian dipotong-potong, selanjutnya dikeringkan dengan oven. Setelah kering, langkah selanjutnya adalah tanaman sarang semut dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk simplisia, kemudian serbuk ditimbang sebesar 100 gram. Serbuk sarang semut dimasukkan ke dalam bejana maserasi dan ditambah etanol 96%. Bejana maserasi ditutup rapat kemudian didiamkan selama dua hari atau 48 jam sambil diaduk satu kali setiap hari. Dilakukan penyaringan menggunakan corong *Bucher* diulang sebanyak tiga kali hingga memperoleh hasil berupa ampas dan filtrat.

Filtrat yang telah didapat diuapkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporation* pemanas *waterbath* bersuhu 70°C sehingga diperoleh ekstrak kental. Setelah itu dilakukan pengenceran ekstrak kental sarang semut sehingga didapat konsentrasi 10%, 20%, dan 40%.

3. Pengenceran Ekstrak Sarang Semut

Pada penelitian ini menggunakan tiga konsentrasi yaitu 10%, 20%, dan 40% untuk mengetahui pengaruh daya antibakteri yang diberikan pada masing-masing konsentrasi. Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Soraya, dkk (2016) tentang efek ekstrak sarang semut terhadap sensitifitas *E. faecalis* menunjukkan konsentrasi 100% memiliki daya antibakteri paling besar dibandingkan dengan konsentrasi lainnya yaitu 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 75%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka semakin besar daya antibakteri yang diberikan. Maka penelitian ini menggunakan konsentrasi yang berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan, dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 40%. Pembuatan ekstrak sarang semut diencerkan dengan rumus pengenceran, yaitu:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan:

M_1 = Molaritas sebelum pengenceran

M_2 = Molaritas sesudah pengenceran

V_1 = Volume sebelum pengenceran

V_2 = Volume sesudah pengenceran

Ekstrak sarang semut dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk dilakukan pengenceran dengan cara menambahkan akuades sedikit demi sedikit dan dikocok sampai homogen maka diperoleh konsentrasi ekstrak sarang semut yang diinginkan, yaitu ekstrak sarang semut dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 40%.

4. Persiapan Subjek Penelitian

Mengambil koloni bakteri *E. faecalis* dari pertumbuhan selama 24 jam selanjutnya disuspensikan ke dalam 0,5 ml *Brain Heart Infusion* cair yang merupakan media suspensi bakteri, dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

5. Inokulasi Suspensi Bakteri pada Media MHA (*Muller Hinton Agar*)

Celupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri, kemudian oleskan pada permukaan media MHA (*Muller Hinton Agar*) pada cawan petri secara merata. Setelah diolesi dengan suspensi bakteri, cawan petri tersebut dilubangi menggunakan sedotan stainless steel dengan diameter dan kedalaman 5 mm yang nantinya akan diisi dengan larutan uji.

6. Uji Daya Antibakteri Ekstrak Sarang Semut terhadap Bakteri *E. faecalis*

Metode yang digunakan adalah metode dilusi agar. Menggunakan ekstrak sarang semut dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 40% terhadap

pertumbuhan bakteri *E. faecalis*, dan kontrol positif menggunakan sodium hipoklorit (NaOCl) 2,5%. Bahan tersebut diteteskan 50 µl dengan menggunakan mikropipet pada setiap lubang sumuran ke cawan petri yang sudah dibuat. Langkah selanjutnya cawan petri diinkubasi di inkubator dengan suhu 37°C selama sehari atau 24 jam.

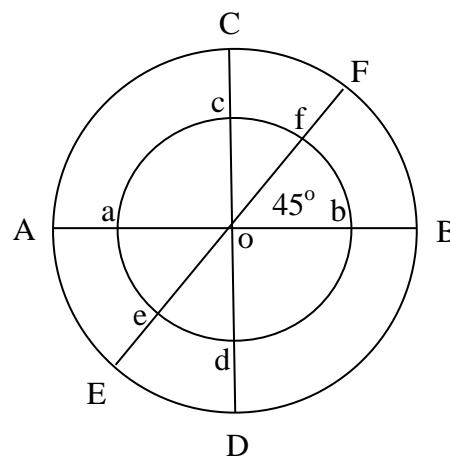
7. Pengukuran Zona Hambat pada Pertumbuhan Bakteri *E. faecalis*

Dilakukan setelah media (berisi bakteri *E. faecalis* dan ekstrak sarang semut) diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian melakukan pengukuran dengan mengamati zona hambat yaitu zona bening disekitar sumuran yang tidak terlihat pertumbuhan koloni bakteri. Zona hambat diukur dengan menggunakan jangka sorong.

Pengukuran zona hambat dilakukan setelah media (yang berisi bakteri *E. faecalis* dan ekstrak sarang semut) diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengukuran dilakukan dengan mengamati zona hambat yaitu daerah bening disekeliling sumuran yang tidak tampak pertumbuhan koloni bakteri. Zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,02 mm. Cara pengukuran yaitu dengan membuat dua garis tegak lurus melalui titik pusat lubang sumuran, sedangkan garis ketiga dibuat diantara kedua garis tegak lurus dengan membentuk 45° terhadap garis AB atau CD melalui titik pusat sumuran yang sama dengan AB atau CD.

Pengukuran dilakukan tiga kali pada tempat yang berbeda (gambar 5). Pengukuran pertama menggunakan diameter zona hambatan (AB)

dikurangi diameter lubang sumuran (ab) kemudian hasilnya dibagi dua. Pengukuran kedua menggunakan diameter zona hambatan (CD) dikurang diameter lubang sumuran (cd) kemudian hasilnya dibagi 2. Pengukuran ketiga menggunakan diameter zona hambatan (EF) dikurangi diameter lubang sumuran (ef) kemudian hasilnya dibagi dua. Hasil akhir dari pengukuran zona hambatan adalah pengukuran pertama ditambahkan dengan pengukuran kedua dan ketiga kemudian hasilnya dibagi tiga (Kartikasari dkk., 2008)



Gambar 4. Pengukuran Zona Hambat

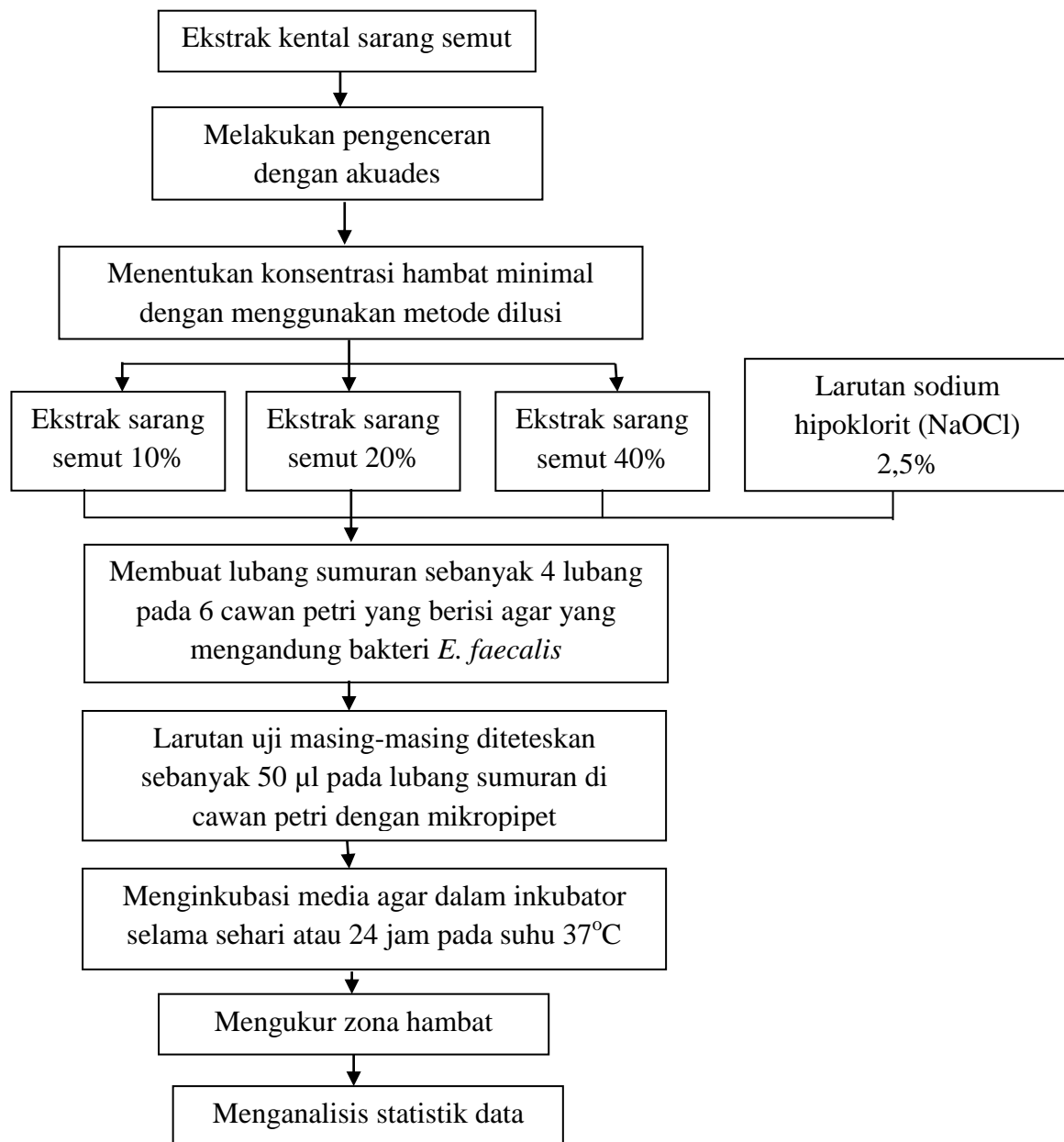
Keterangan:

- | | |
|--------------------------|---------------------------------|
| Aa, Bb, Cc, Dd, Ee, Ff | : zona hambatan (daerah bening) |
| AB, CD, EF | : zona radikal |
| Ab, cd, ef | : diameter lubang sumuran |
| o | : pusat sumuran |
| Sudut AE | : 45° |

Pengukuran zona hambat satu sumuran menurut (Kartikasari, dkk., 2008) dapat dihitung menggunakan rumus:

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

H. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

I. Analisis Data

Analisa data penelitian ini menggunakan program SPSS. Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50. Tujuan dari uji normalitas ini adalah untuk

mengetahui apakah sampel yang diambil berasal dari populasi yang terdistribusi normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas yang berguna untuk mengetahui apakah sampel mempunyai varians yang sama. Setelah kedua uji tersebut terpenuhi, maka untuk mengetahui perbedaan efektivitas daya antibakteri antara ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*) dengan sodium hipoklorit 2,5% terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* digunakan uji statistik *One Way Anova*, namun apabila diketahui distribusi datanya tidak normal dan varians sampel tidak sama, maka uji statistik yang digunakan adalah *Kruskal-Wallis*.