

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian “Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Bunga Mawar Merah (*Rosa Damascene* Mill) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Enterococcus faecalis*” yang dilakukan menggunakan desain eksperimental laboratorium *In Vitro*.

#### **B. Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **1. Bahan Uji**

Bunga mawar merah (*Rosa Damascene* Mill) yang digunakan untuk penelitian diambil dari perkebunan bunga mawar di Bandungan ,Semarang. Bunga mawar dibuat ekstrak dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, dan kalsium hidroksida sebagai kontrol positif, serta aquades steril sebagai kontrol negatif.

##### **2. Bakteri Uji**

Bakteri yang digunakan dalam penelitian yaitu bakteri *Enterococcus faecalis* yang dibiakkan di laboratorium mikrobiologi. Jumlah sampel penelitian dihitung dengan menggunakan rumus Federer.

Rumus Federer :

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

Keterangan :

n : jumlah sampel

t : total kelompok

Perhitungan :

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

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan dengan menggunakan rumus tersebut, didapatkan jumlah sampel 4. Jumlah sampel yang akan diambil 2-3 angka diatas jumlah sampel yaitu 6-7 sampel.

### C. Lokasi dan Waktu Penelitian

#### 1. Lokasi Penelitian

a. Pembuatan ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dilakukan di Laboratorium Farmasi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

b. Pengujian daya antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

c. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2019 sampai bulan Maret 2019

**D. Variabel Penelitian**

1. Variabel Pengaruh

Variabel yang digunakan yaitu ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, dan kalsium hidroksida sebagai kontrol positif, serta aquades steril sebagai kontrol negatif.

2. Variabel Terpengaruh

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bakteri *Enterococcus faecalis*.

3. Variabel Terkendali

- a. Ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%
  - b. Suhu inkubasi 37°C
  - c. Waktu inkubasi 24 jam
  - d. Sterilisasi alat
  - e. Media agar
4. Variabel Tidak Terkendali
- a. Kontaminasi bakteri lain

- b. Zat aktif yang terkandung dalam ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill)
- c. Suhu ruang

#### **E. Definisi Operasional Penelitian**

1. Daya antibakteri adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau membunuh bakteri.
2. Ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) yaitu sediaan pekat yang dibuat dengan metode maserasi. Bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) yang dipakai sebanyak 1000 gram.
3. Bakteri *Enterococcus faecalis* adalah bakteri yang dibiakkan dari laboratorium mikrobiologi FKH UGM.
4. Zona radikal yaitu area jernih pada media agar yang menunjukkan adanya daya hambat antibakteri.
5. Metode difusi yaitu uji daya antibakteri dengan membuat sumuran pada media agar TSA (*Tryptone Soya Agar*) yang telah ditanam bakteri *Enterococcus faecalis*, kemudian ditetesi larutan uji dan dilakukan inkubasi.

#### **F. Instrumen Penelitian**

1. Alat Penelitian
  - a. Lampu spiritus untuk sterilisasi ose dan *stainless steel straw*.
  - b. *Autoklaf* untuk sterilisasi alat dan media.

- c. Kertas saring untuk menyaring serbuk bunga mawar merah sehingga didapatkan filtrat dan residu.
- d. Blender untuk menghaluskan bunga mawar merah.
- e. Tabung *Erlenmeyer* sebagai tempat pembuatan media TSA (*Tryptone Soya Agar*).
- f. Inkubator untuk menginkubasi bakteri.
- g. Neraca timbang untuk menimbang massa bunga mawar merah.
- h. Oven untuk mengeringkan bunga mawar merah.
- i. *Waterbath* untuk menguapkan air dari ekstrak bunga mawar merah.
- j. Cawan petri berjumlah sembilan sebagai tempat media agar.
- k. Pipet tetes untuk mengaplikasikan ekstrak bunga mawar merah kedalam sumuran.
- l. Sendok kecil untuk mengaplikasikan ekstrak bunga mawar merah dengan konsentrasi 100%.
- m. Tabung reaksi untuk tempat BHI.
- n. Jangka sorong untuk mengukur diameter zona radikal.
- o. Sarung tangan dan masker sebagai alat pelindung diri.
- p. Kain flanel untuk menyaring serbuk bunga mawar merah sehingga didapatkan filtrat dan residu.
- q. *Vacuum rotary evaporator* untuk menguapkan etanol 70%.
- r. Pipet ukur untuk mengukur volume aquades.
- s. *Anaerobic jar* untuk sterilisasi alat dan media.
- t. Ose steril untuk mengambil bakteri dari media agar miring ke BHI.

- u. Kapas lidi steril untuk inokulasi suspensi bakteri.
  - v. Corong *Buchner* untuk menyaring serbuk bunga mawar merah.
  - w. Rak tabung reaksi
2. Bahan Penelitian
- a. Kalsium hidroksida sebagai kontrol positif dalam sediaan pasta
  - b. Ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%
  - c. Aquades steril sebagai kontrol negatif
  - d. Bakteri *Enterococcus faecalis*
  - e. Larutan etanol 70% sebagai pelarut
  - f. Media agar TSA (*Tryptone Soya Agar*)
  - g. Media cair *Brain Heart Infusion*

## **G. Jalannya Penelitian**

### 1. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian disterilkan terlebih dahulu menggunakan autoklaf selama 30 menit.

### 2. Pembuatan Ekstrak Bunga Mawar Merah (*Rosa damascene* Mill)

Bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dicuci terlebih dahulu kemudian dikeringkan dalam oven sampai kering. Setelah kering, bunga tersebut dihaluskan menggunakan blender. Proses pembuatan ekstrak dilakukan secara maserasi yaitu serbuk kering dimasukkan ke dalam toples yang sudah berisi etanol 70% lalu diaduk 2 kali dalam sehari dan didiamkan minimal 24 jam. Saring hasilnya

menggunakan corong *Buchner*, kain flanel, dan kertas saring sehingga didapat filtrat dan residu. Filtrat diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak yang pekat kemudian menggunakan *waterbath* sampai ekstrak mengental dari bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill). Ekstrak yang kering diencerkan menggunakan aquades steril sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Pada ekstrak dengan konsentrasi 100% dalam sediaan kental.

### 3. Pembuatan Suspensi Bakteri *Enterococcus faecalis*

Suspensi dibuat dengan mengambil ose bakteri *Enterococcus faecalis* menggunakan ose steril lalu dimasukkan ke dalam BHI dan kemudian diinkubasi selama 24 jam.

### 4. Inokulasi Suspensi Bakteri pada Media Agar

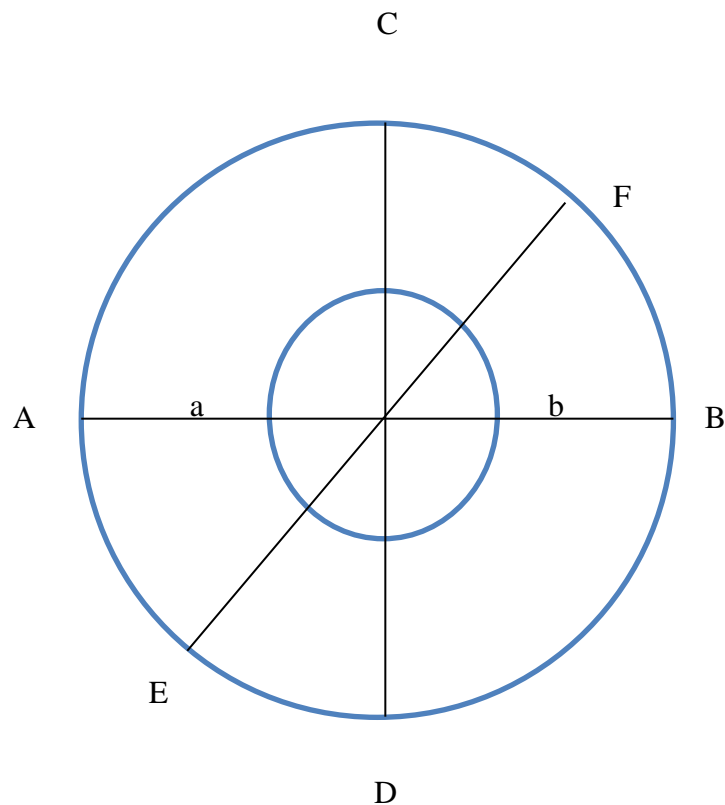
Masukkan kapas lidi steril ke dalam suspensi bakteri lalu dioleskan pada permukaan media pada setiap cawan petri. Lakukan sumuran pada setiap cawan petri dengan diameter 5mm dan kedalaman 5mm.

### 5. Uji Daya Antibakteri

Uji daya antibakteri menggunakan metode difusi. Ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dengan konsentrasi yang berbeda diteteskan ke dalam lubang sumuran menggunakan pipet tetes sebanyak 2-3 tetes. Kemudian masukkan cawan petri ke inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

## 6. Pengukuran Zona Radikal

Untuk mengukur zona radikal digunakan *sliding caliper*. Cara pengukurannya yaitu dengan membuat dua garis lurus yang melalui titik pusat dari lubang sumuran (garis AB dan garis CD). Garis yang terbentuk pada sumuran dinamakan garis ab dan cd. Pembuatan garis ketiga dilakukan dengan membuat garis diantara garis AB dan garis CD. Garis ketiga membentuk sudut  $45^\circ$  terhadap garis AB dan garis CD, dan dinamakan garis EF (Iravati, 2003).



**Gambar 4. Cara Pengukuran Zona Radikal**



Rumus pengukuran zona radikal untuk 1 sumuran :

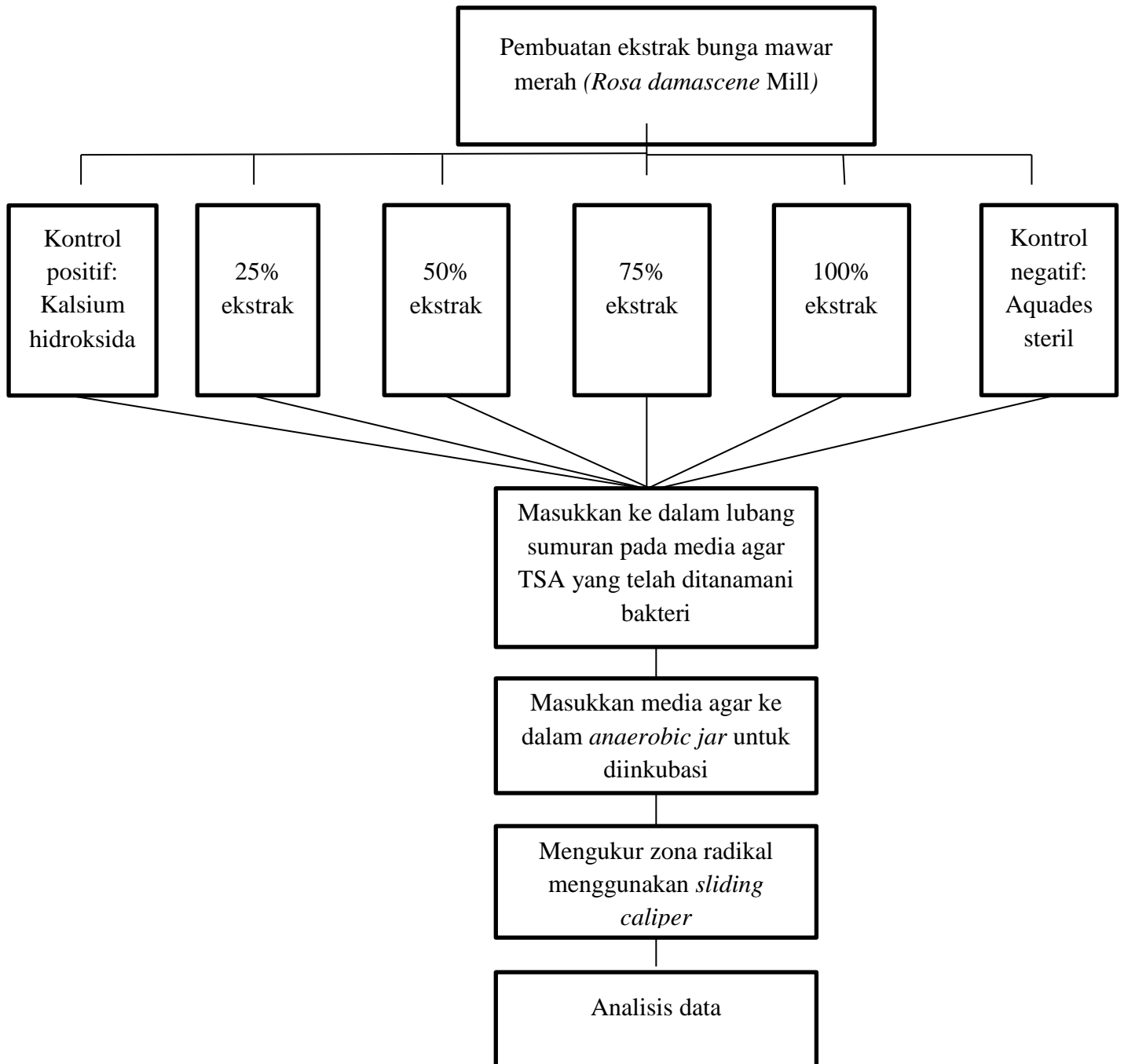
$$\frac{\frac{1}{2}(AB-ab) + \frac{1}{2}(CD-cd) + \frac{1}{2}(EF-ef)}{3}$$

Keterangan :

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

Garis ab, cd, dan ef : diameter lubang sumuran

## H. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur penelitian

## I. Analisis Data

Hasil pengukuran didapat dari menghitung diameter zona radikal dengan *sliding caliper*. Data yang sudah didapat, dilakukan uji normalitas data. Pada penelitian ini menggunakan uji *Shapiro-wilk* karena jumlah sampel pada penelitian ini kurang dari 50. Setelah uji normalitas data, melakukan uji homogenitas. Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah sampel yang digunakan memiliki varian yang sama atau tidak. Setelah mendapatkan hasil data terdistribusi normal dan memiliki varian sama, maka dilakukan uji statistik *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan daya antibakteri pada ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill). Apabila data terdistribusi tidak normal, maka uji statistik yang dipakai yaitu *Kruskal wallis*.