

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental laboratoris secara *in vitro*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Pembuatan ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, dan pengujian daya antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai Maret 2019.

C. Sampel Penelitian

1. Bahan Uji

Bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari perkebunan di Bandungan, Semarang.

2. Bakteri Uji

Bakteri yang diujikan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang dibiakkan di laboratorium mikrobiologi.

Jumlah subyek penelitian di hitung berdasarkan Rumus *Federer*.

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

Keterangan:

t = jumlah kelompok

n = jumlah sampel

Perhitungan jumlah sampel yang dibutuhkan untuk penelitian ini:

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

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

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

$$5t - 5 \geq 15$$

$$5t \geq 20$$

$$t \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah sampel yang diperlukan peneliti adalah 6 sampel untuk tiap-tiap kelompok perlakuan, yaitu:

- a. 6 sampel untuk ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%.
- b. 6 sampel untuk kelompok klorheksidin diglukonat 2% sebagai kontrol positif.
- c. 6 sampel untuk kelompok aquades steril sebagai kontrol negatif.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

- a. Ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%
- b. Larutan klorheksidin diglukonat 2% sebagai kontrol positif
- c. Aquades steril sebagai kontrol negatif

2. Variabel Terpengaruh

- a. Bakteri *Streptococcus mutans*

3. Variabel Terkendali

- a. Ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%
- b. Media agar
- c. Suhu inkubator
- d. Waktu inkubasi
- e. Sterilisasi alat

4. Variabel Tidak Terkendali

- a. Zat aktif yang terdapat dalam ekstrak bunga mawar (*Rosa damascene* Mill)
- b. Kontaminasi bakteri lain

E. Definisi Operasional

1. Daya antibakteri adalah kemampuan suatu bahan dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan dan metabolisme bakteri yang ditandai dengan adanya zona bening disekitar lubang sumuran dan tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri.
2. Ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) adalah ekstrak yang diperoleh dari bunga mawar sebanyak 1000 gram melalui proses maserasi dengan pelarut etanol 70%.
3. Klorheksidin diglukonat 2% adalah bahan kimia yang digunakan sebagai bahan irigasi saluran akar, memiliki sifat antibakteri, rendah toksik, berspektrum luas, dan larut dalam air.
4. Bakteri *Streptococcus mutans* adalah bakteri gram positif berbentuk bulat dan termasuk anggota flora normal pada rongga mulut manusia yang dibiakkan di laboratorium mikrobiologi.
5. Zona radikal adalah daerah bening di sekitar sumuran dimana tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri sama sekali.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian
 - a. Masker sebagai pelindung diri
 - b. *Handscoon* sebagai pelindung diri
 - c. Inkubator untuk menginkubasi bakteri
 - d. Oven untuk mengeringkan bunga mawar merah
 - e. Autoklaf untuk sterilisasi alat dan media

- f. Ose steril untuk mengambil bakteri dari media agar miring
- g. Lampu spiritus untuk mensterilkan ose
- h. Kain flannel untuk menyaring serbuk bunga mawar merah sehingga didapatkan filtrat dan residu
- i. Blender untuk menghaluskan bunga mawar merah
- j. Corong *Buchner* untuk menyaring serbuk bunga mawar merah
- k. Tabung reaksi sebagai tempat BHI
- l. Rak tabung reaksi untuk menata beberapa tabung reaksi
- m. Tabung *Erlenmeyer* sebagai tempat pembuatan media TSA (*Tryptone Soya Agar*)
- n. *Vacum rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut etanol 70%
- o. *Waterbath* untuk menguapkan air dari ekstrak bunga mawar merah
- p. Neraca timbangan untuk menimbang massa bunga mawar merah
- q. Cawan petri sebagai tempat media agar
- r. Pipet tetes untuk mengaplikasikan ekstrak bunga mawar merah ke dalam sumuran
- s. Pipet ukur untuk mengukur volume aquades
- t. Jangka sorong untuk mengukur diameter zona radikal
- u. Kapas lidi steril untuk inokulasi suspensi bakteri
- v. Kertas saring untuk menyaring serbuk bunga mawar merah sehingga didapatkan filtrate dan residu

2. Bahan Penelitian

- a. Bakteri *Streptococcus mutans*
- b. Ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%
- c. Larutan klorheksidin diglukonat 2% sebagai kontrol positif
- d. Aquades steril sebagai kontrol negatif
- e. Larutan etanol 70% sebagai pelarut ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill)
- f. Media TSA (*Tryptone Soya Agar*)
- g. Larutan media cair BHI (*Brain Heart Infusion*)

G. Jalannya Penelitian

1. Sterilisasi alat

Sebelumnya, alat yang akan digunakan untuk penelitian disterilkan terlebih dahulu menggunakan autoklaf selama 30 menit.

2. Pembuatan ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill)

Bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) di cuci bersih dengan air, kemudian dikeringkan menggunakan oven sampai mengering. Setelah itu bunga mawar dihaluskan sampai menjadi serbuk menggunakan blender. Serbuk dari bunga mawar berikutnya dimaserasi selama 24 jam dengan etanol 70% dan diaduk 2 kali sehari, kemudian disaring menggunakan kain flanel, kertas saring, dan corong *Buchner*. Filtrat yang didapat selanjutnya diuapkan menggunakan *vacum rotary*

evaporator untuk menghilangkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak yang pekat kemudian menggunakan *water bath* sampai ekstrak mengental. Hasil akhir berupa ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dengan konsentrasi 100%. Kemudian ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) diencerkan dengan aquades steril sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan yaitu 25%, 50%, 75%, dan 100%.

3. Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus mutans*

Pembuatan suspensi bakteri dengan cara mengambil beberapa ose bakteri *Streptococcus mutans* menggunakan ose steril, kemudian dimasukkan ke dalam media cair BHI (*Brain Heart Infusion*) pada tabung reaksi dan diinkubasi selama 24 jam.

4. Inokulasi Suspensi Bakteri pada Media TSA (*Tryptone Soya Agar*)

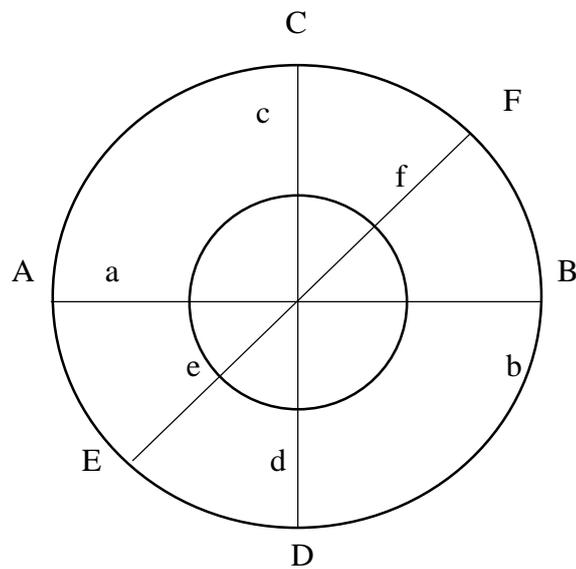
Celupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri, kemudian oleskan pada permukaan media TSA (*Tryptone Soya Agar*) pada cawan petri secara merata. Setelah diolesi dengan suspensi bakteri, cawan petri tersebut dilubangi menggunakan pelubang stainless steel dengan diameter dan kedalaman 5 mm yang nantinya akan diisi dengan larutan uji. Jumlah cawan petri yang digunakan yaitu 9 buah dan pada masing-masing cawan terdapat 4 buah sumuran.

5. Uji Daya Antibakteri

Ekstrak bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100% masing-masing diteteskan pada sumuran media agar menggunakan pipet tetes, selanjutnya teteskan klorheksidin diglukonat sebagai kontrol positif dan aquades steril sebagai kontrol negatif. Media yang telah ditetesi kemudian dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

6. Pengukuran Zona Radikal

Setelah selesai diinkubasi, dilakukan pengukuran zona radikal menggunakan jangka sorong. Pengukuran zona radikal dilakukan dengan cara mengambil dua garis saling tegak lurus yang melalui titik pusat sumuran (0) serta 1 garis bersudut 45° terhadap garis AB atau CD melalui titik sumuran yang sama (ab) atau (cd). Pengukuran pertama menggunakan diameter zona radikal (AB) dikurangi diameter lubang sumuran (ab) setelah itu hasilnya dibagi dua. Pengukuran kedua menggunakan diameter zona radikal (CD) dikurangi diameter lubang sumuran (cd) setelah itu hasilnya dibagi dua. Pengukuran ketiga menggunakan diameter zona radikal (EF) dikurangi diameter lubang sumuran (ef) setelah itu hasilnya dibagi dua. Hasil akhir pengukuran adalah pengukuran pertama ditambah pengukuran kedua ditambah pengukuran ketiga kemudian hasilnya dibagi tiga.



Gambar 4. Cara pengukuran zona radikal

Keterangan:

Aa, Bb, Cc, Dd, Ee, Ff : Zona radikal

AB, CD, EF : Daerah bening

ab, cd, ef : Diameter lubang sumuran

Sudut AE : 45°

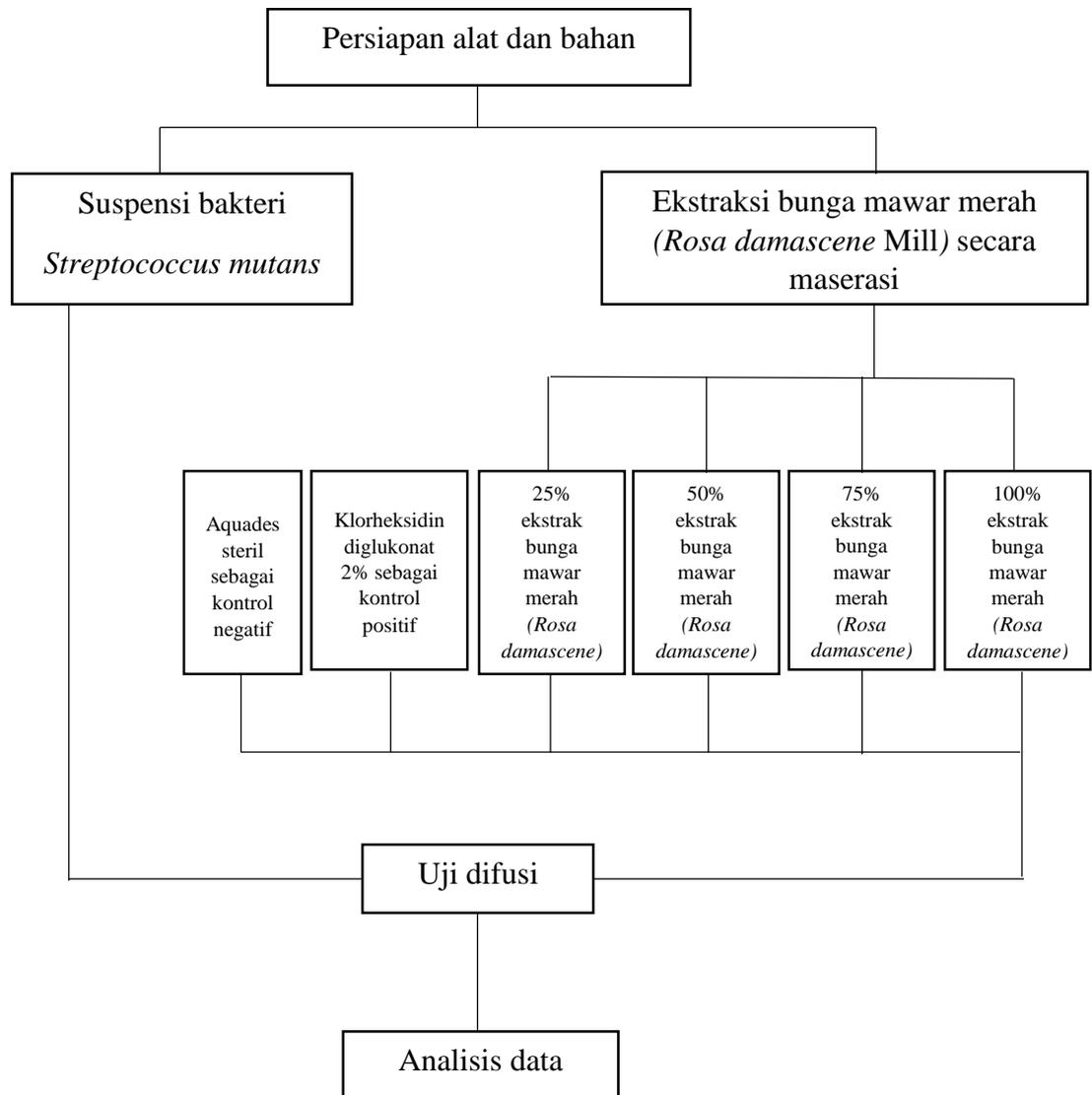
Rumus pengukuran zona radikal 1 sumuran:

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

H. 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. Selanjutnya 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 bunga mawar merah (*Rosa damascene* Mill) dengan klorheksidin diglukonat 2% terhadap bakteri *Streptococcus mutans* 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*.

I. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur penelitian