

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis dari penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris *In Vitro*.

B. Subyek penelitian

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) buah daging putih dengan konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *Enterococcus faecalis* yang didapat dari gigi yang mengalami nekrosis dan dibiakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

C. Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Laboratorium Farmasi dan Farmakologi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Pelaksanaan penelitian pada bulan Agustus sampai September 2012.

D. Identifikasi Variabel

1. Variabel Pengaruh

- a. Larutan klorheksidin diglukonat 2%.

- b. Ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%.

2. Variabel Terpengaruh

Zona radikal terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* pada media TSA (*Tryptone Soya Agar*) setelah pemberian larutan klorheksidin diglukonat 2% dan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%.

3. Variabel Terkendali

- a. Bakteri *Enterococcus faecalis*.
- b. Konsentrasi bakteri *Enterococcus faecalis* sesuai standart Brown III 10^8 CFU/ml.
- c. Suhu inkubator 37°C.
- d. Lama pengeraman dalam inkubator (48 jam).
- e. Kedalaman pada cawan petri yaitu 4 mm.
- f. Diameter lubang sumuran 6 mm.
- g. *Anaerobic jar*.
- h. Media *Brain heart Infusion* (BHI) sebagai media pembiakan bakteri dengan pH 7,4.
- i. Media TSA (*Tryptone Soya Agar*) sebagai media uji kepekaan bakteri *Enterococcus faecalis* dengan pH 7,4.
- j. Volume ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) yang dimasukkan ke dalam sumuran adalah 50 μ l.

- k. Volume larutan uji 5 ml secara keseluruhan.
 - l. Volume larutan pada tiap sumuran 50 μ l.
 - m. Metode uji kepekaan menggunakan metode difusi sumuran.
4. Variabel tidak terkontrol
- a. Kontaminasi suhu saat pengambilan bakteri *Enterococcus faecalis* pada gigi yang mengalami nekrosis pasien.
 - b. Gigi yang mengalami nekrosis dengan atau tanpa lesi paradikular.

E. Definisi Operasional Penelitian

- a. Daya antibakteri adalah kemampuan bahan kimia untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri (Brooks dkk., 2008). Cara kerja antibakteri dibedakan menjadi bakteriostatik (menghambat pertumbuhan dan perkembangan bakteri) dan bakteriosida (membunuh bakteri) (Kee & Hayes, 1996). Daya antibakteri terlihat dengan terbentuknya zona radikal dan zona iradikal di sekitar lubang sumuran. Zona radikal adalah daerah jernih di sekitar sumuran yang sama sekali tidak ditemukan adanya bakteri (bersifat bakteriosidal). Pembacaan hasil diperoleh dengan menghitung diameter zona radikal yang terbentuk disekitar sumuran (Jawetz dkk., 1995).
- b. *Enterococcus faecalis* merupakan suatu bakteri patogen yang paling banyak menimbulkan infeksi pada saluran akar dan resisten terhadap antibiotik karena faktor-faktor virulensinya (Kayaoglu & Orstavik, 2004).

- Bakteri *Enterococcus faecalis* diambil dari gigi nekrose yang kemudian dilakukan identifikasi, pengecatan gram, lalu dikembangbiakan.
- c. Klorheksidin diglukonat 2% adalah merupakan suatu bahan kimia yang mempunyai sifat antibakteri, berspektrum luas, rendah toksik dan dapat larut dalam air (Mulyawati, 2011). Klorheksidin diglukonat 2% biasanya digunakan sebagai bahan irigasi perawatan saluran akar.
 - d. Ekstrak merupakan sari pati pada tumbuhan digunakan sebagai pengobatan (Mahendra, 2008). Pembuatan ekstrak dapat berbentuk menjadi : ekstrak setengah cair atau kental, butir-butir atau ekstrak padat dan ekstrak kering (serbuk). Salah satu metode ekstraksi adalah maserasi yang artinya merendam (Ansel, 2008). Proses ekstraksi dilakukan dengan penambahan bahan pelarut etanol 70%.
 - e. Daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) mempunyai kemampuan untuk melawan bakteri gram positif dan bakteri gram negatif (Dweeck, 2001). Kandungan kimia yang terkandung di dalam daun jambu biji adalah tanin, pektin, minyak asiri (eugenol) minyak lemak, damar, triterpenoid dan asam apfel (Wijayakusuma, 2008). Daun jambu biji merupakan daun jambu biji buah daging putih dalam satu pohon, dimana dipilih daunnya yang tidak berhama.

F. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

- a. Bakteri *Enterococcus faecalis*.
- b. Larutan klorheksidin diglukonat 2% sebagai kontrol positif.
- c. Ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%.
- d. Larutan etanol 70% sebagai pelarut ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn).
- e. Aquabides steril sebagai kontrol negatif.
- f. Media TSA (*Tryptone Soya Agar*) sebagai media untuk uji kepekaan bakteri *Enterococcus faecalis*.
- g. Media cair *Brain Heart Difussion* (BHI) sebagai pembiakan bakteri *Enterococcus faecalis* agar dicapai jumlah koloni bakteri 10^8 CFU/ml.

2. Alat Penelitian

- a. Autoklaf merk *all american*
Digunakan untuk sterilisasi bahan basah-basah.
- b. Lampu spiritus
Digunakan untuk sterilisasi alat.
- c. Almari pengering
Digunakan sebagai tempat untuk memekatkan ekstrak hasil evaporasi sehingga didapat ekstrak daun jambu biji dengan berat konstan.

- d. Alat penyerbuk
Digunakan untuk menghancurkan daun jambu biji yang sudah dikeringkan.
- e. Tabung erlenmeyer
Digunakan untuk menampung filtrat.
- f. Corong *bucher*
Digunakan untuk memisahkan filtrat dengan residu.
- g. *Vacum rotary evaporation*
Digunakan untuk menguapkan ekstrak daun jambu biji.
- h. Waterbath
Digunakan sebagai tempat hasil saringan ekstrak daun jambu biji yang akan diuapkan (menguapkan air dengan ekstrak daun jambu biji).
- i. Neraca timbangan
Digunakan untuk menimbang daun jambu biji dan ekstrak.
- j. Inkubator merek *memmert*
Digunakan untuk mengeramkan bakteri *Enterococcus faecalis*.
- k. Oven merek *memmert*
Digunakan untuk sterilisasi alat.
- l. *Anaerobic jar*
Digunakan untuk menciptakan suasana anaerob bagi bakteri *Enterococcus faecalis*.

m. Cawan petri

Digunakan sebagai tempat media uji kepekaan bakteri *Enterococcus faecalis*.

n. Ose steril

Digunakan untuk mengembangbiakan *Enterococcus faecalis*.

o. Mikropipet

Digunakan untuk meneteskan ekstrak daun jambu biji dan kontrol kedalam lubang sumuan pada cawan petri.

p. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi

Digunakan untuk pengenceran dan tempat suspensi bakteri *Enterococcus faecalis*.

q. Kapas lidi steril

Digunakan untuk mengoleskan bakteri *Enterococcus faecalis* pada TSA.

r. Pipet sebagai alat pelubang

Digunakan untuk membuat lubang sumuran pada cawan petri.

s. Jangka sorong (*sliding caliper*) dengan ketelitian 0,005 mm

Digunakan untuk mengukur zona radikal (zona bunuh) sumuran pada cawan petri.

t. Sarung tangan dan masker steril

Digunakan sebagai alat sterilisasi.

u. *Stirer magnetic*

Digunakan untuk mengaduk ekstrak daun jambu biji.

v. Pipet ukur

Digunakan untuk mengambil larutan induk, aquabides steril dan klorheksidin diglukonat 2%.

G. Jalannya penelitian

1. Pembuatan ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn)

Pembuatan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) yang dilakukan di Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Pada penelitian ini digunakan daun jambu biji daging putih dari satu pohon, dipilih daun yang masih hijau, segar dan tidak terkena hama. Langkah-langkahnya adalah sebagai berikut: pertama daun jambu biji dengan berat sekitar 3 kg dicuci dengan air mengalir, kemudian ditimbang dan dikeringkan dalam almari pengering dengan suhu 45°C selama 48 jam kemudian diserbuk menggunakan mesin penyerbuk dengan saringan diameter lubang saringan 1 mm sehingga beratnya menjadi 439,23 gram.

Berat serbuk daun jambu biji yang digunakan hanya 193,570 gram dan sisanya disimpan. Serbuk daun jambu biji diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% (2000 ml) sebagai pelarut kemudian dilakukan pengadukan kontinyu selama 30 menit menggunakan *stirer magnetic* pada suhu ruang, kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang dan di saring. Setelah 24 jam, dilakukan pengadukan kembali dan didiamkan selama 24 jam lagi kemudian di saring. Pengadukan sampai pendiaman dan

penyaringan larutan diulangi sekali lagi agar zat aktif dapat tersari dengan baik lagi oleh etanol. Larutan ini kemudian difiltrasi menggunakan corong *buchner* untuk memisahkan filtrat dengan residu. Filtrat kemudian dievaporasi menggunakan *vacum rotary evaporator* untuk menguapkan etanol pada suhu 70°C selama 1 jam, sehingga didapat larutan yang lebih kental (ekstrak kental). Ekstrak kental kemudian dimasukkan ke dalam cawan porselin menggunakan *waterbath* sisa pelarut dalam ekstrak kental dan diuapkan pada suhu 50°C sehingga didapatkan ekstrak daun jambu biji sebanyak 43,950 gram. Sebanyak 100 gram dari ekstrak daun jambu biji kental diambil dan diencerkan dengan aquabides steril sampai volume 100 ml sehingga didapatkan ekstrak daun jambu biji 100% sebagai larutan induk.

Selanjutnya untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan sebagai bahan penelitian, larutan induk ekstrak daun jambu biji tersebut diencerkan dengan aquabides steril. Dalam membuat ekstrak daun jambu biji konsentrasi 20% yaitu dengan cara mengambil larutan induk sebanyak 200 mg kemudian dilarutkan dengan aquabides steril sampai volume 1 ml divortex hingga homogen. Ekstrak dengan konsentrasi 40% dilakukan dengan mengambil larutan induk sebanyak 400 gram lalu dilarutkan dengan aquabides steril sampai volume 1 ml divortex hingga homogen. Ekstrak daun jambu biji dengan konsentrasi 60%, melarutkan larutan induk 600 gram dengan aquabides steril sampai volume 1 ml divortex hingga homogen. Ekstrak 80% dibutuhkan 800 gram larutan induk kemudian dilarutkan dengan aquabides

steril volume 1 ml divortex hingga homogen. Ekstrak disimpan pada botol gelap pada tempat teduh terlindung dari cahaya matahari secara langsung agar ekstrak dapat bertahan lama.



Gambar 3. Pohon daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn)



Gambar 4. Daun jambu biji yang sudah dipetik



Gambar 5. Almari pengering



Gambar 6. Alat penyerbuk



Gambar 7. Neraca timbangan



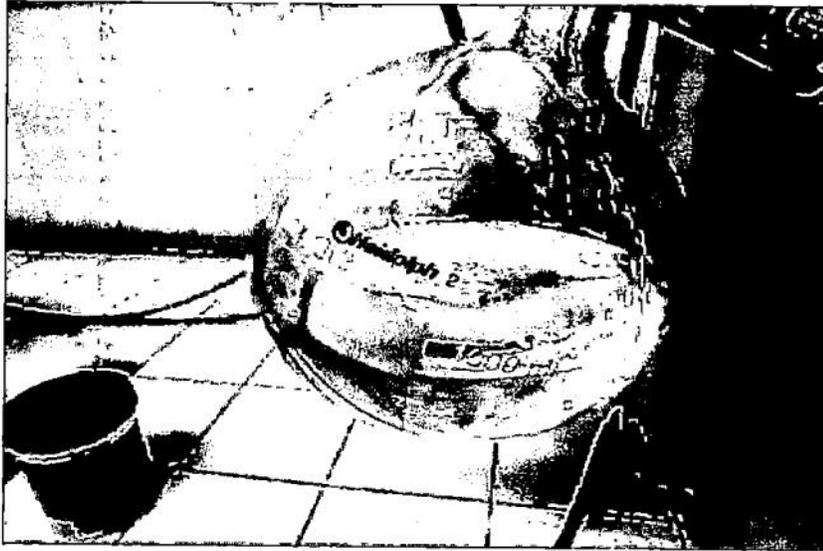
Gambar 8. *Stirer magnetic*



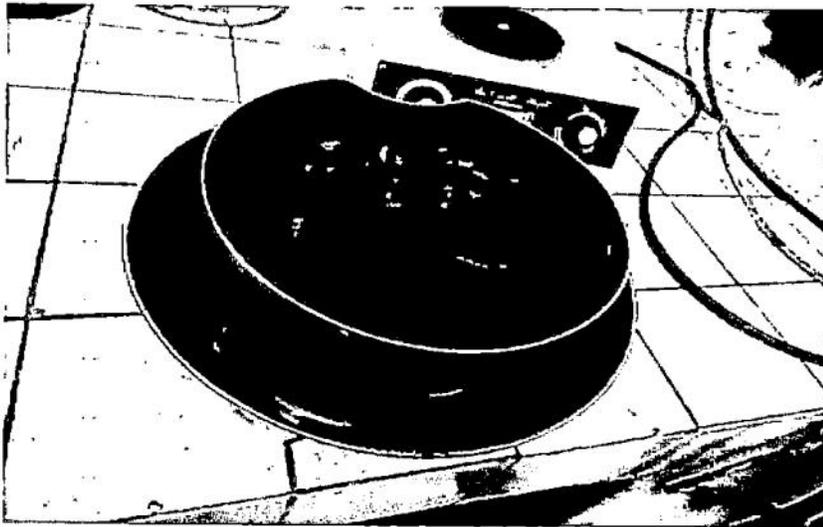
Gambar 9. Etanol



Gambar 10. *Vacum rotary evaporator*



Gambar 11. Aquabides steril



Gambar 12. *Waterbath* berisi ekstrak kental daun jambu biji

2. Pengambilan bakteri *Enterococcus faecalis*

Pengambilan spesimen bakteri saluran akar pada gigi pasien yang mengalami nekrosis pulpa yang telah dilakukan pembukaàn orifis kemudian masukkan *paper point* dan segera masukkan ke dalam apendot yang berisi NaCl lalu ditutup rapat. Apendot tersebut dimasukkan ke dalam wadah yang berisi air es kemudian dikirim ke laboratorium mikrobiologi UGM. Bakteri dimasukkan ke dalam *anaerobic jar* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C setelah itu dipindahkan ke media agar darah dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C kemudian dilakukan identifikasi bakteri *Enterococcus faecalis* dengan pengecatan gram dan diperiksa dibawah mikroskop setelah bakteri *Enterococcus faecalis* ditemukan, ditanam pada agar darah untuk mendapatkan biakan murni di dalam *anaerobic jar*.



Gambar 13. Apendot



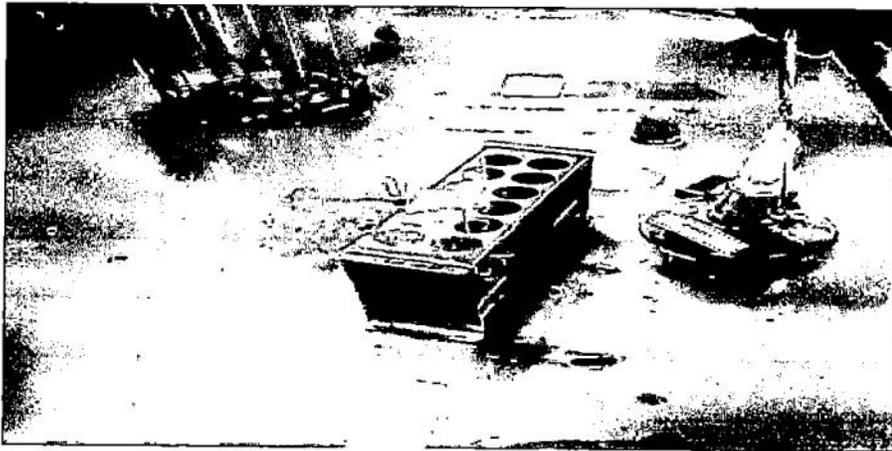
Gambar 14. Wadah es berisi apendot

3. Pembuatan suspensi bakteri *Enterococcus faecalis*

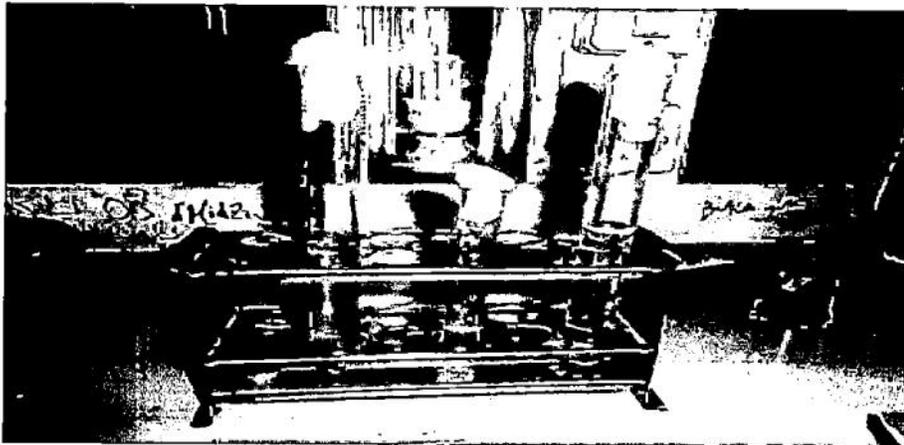
Suspensi dibuat dengan mengambil beberapa ose yaitu 3-5 bakteri *Enterococcus faecalis* dengan menggunakan ose steril dan dimasukkan ke dalam 1 ml NaCl kemudian dikocok sampai homogen dan diinkubasi selama 3-5 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, larutan NaCl yang telah dicampur dengan bakteri dimasukkan ke dalam 9 ml media cair BHI (Brain Heart Infusion) pada tabung reaksi sehingga sesuai dengan standar konsentrasi 10^8 CFU/ml.



Gambar 15. Tabung berisi *Enterococcus faecalis*



Gambar 16. Ose steril



Gambar 17. Media BHI cair

4. Perhitungan jumlah sampel

Jumlah sampel dari tiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan rumus Federer. Perlakuan terhadap ekstrak jambu biji (*Psidium guajava* Linn) ada 4 yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%, sedangkan kelompok perlakuan pada klorheksidin diglukonat 2% dan aquabides steril berjumlah satu. Jadi, variabel yang digunakan masing-masing berjumlah 6.

Rumus Federer :

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

Keterangan :

n : besar sampel tiap kelompok

t : jumlah variabel

sehingga didapatkan,

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

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

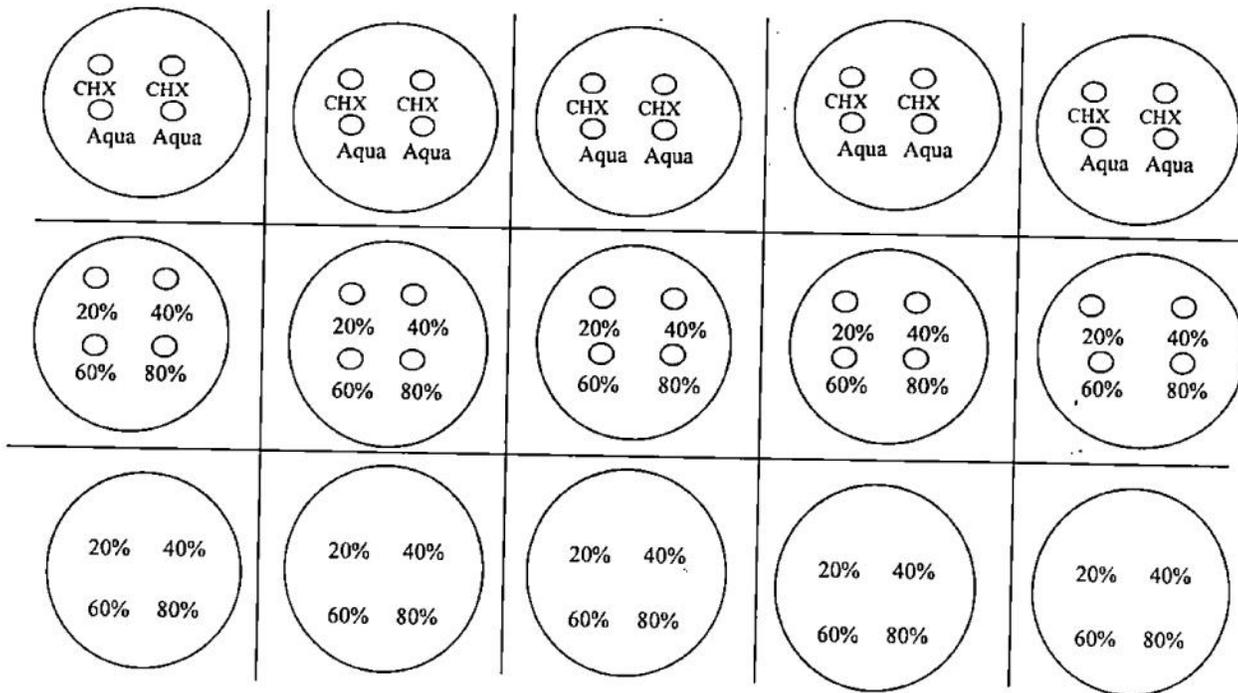
Drop out 10 % menjadi 5 sampel.

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah sampel yang diperlukan ditambah drop out 10% adalah 5 sampel pengulangan, namun pada penelitian

ini kami menggunakan 10 sampel pengulangan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan, dengan rincian sebagai berikut :

- 10 sampel untuk kelompok perlakuan klorheksidin diglukonat 2%
- 10 sampel untuk kelompok perlakuan aquabides steril.
- 10 sampel untuk masing-masing konsentrasi daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) setiap konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80 %.

Gambar 18. Cawan petri dan sumuran



Keterangan : CHX 2%

: Klorheksidin diglukonat 2%

Aqua

: Aquabides steril

20%, 40%, 60%, 80 %

: Konsentrasi ekstrak daun jambu biji.

5. Inokulasi suspensi bakteri pada media agar

Pada suspensi bakteri dicelupkan kapas lidi steril kemudian kapas tersebut ditekan pada dinding tabung agar tidak terlalu basah dan dioleskan pada permukaan media TSA pada 15 cawan petri telah tersedia secara merata. Setelah media TSA diolesi bakteri, 5 cawan petri masing-masing dilubangi menjadi 4 lubang sumuran menggunakan pipet pelubang dengan diameter 6 mm dan kedalaman 4 mm kemudian ditetesi klorheksidin diglukonat 2% dan aquabides steril. Sepuluh cawan petri lainnya dilubangi menjadi 4 sumuran, dimana dalam satu cawan petri ditetesi ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80% .



Gambar 19. Cawan petri



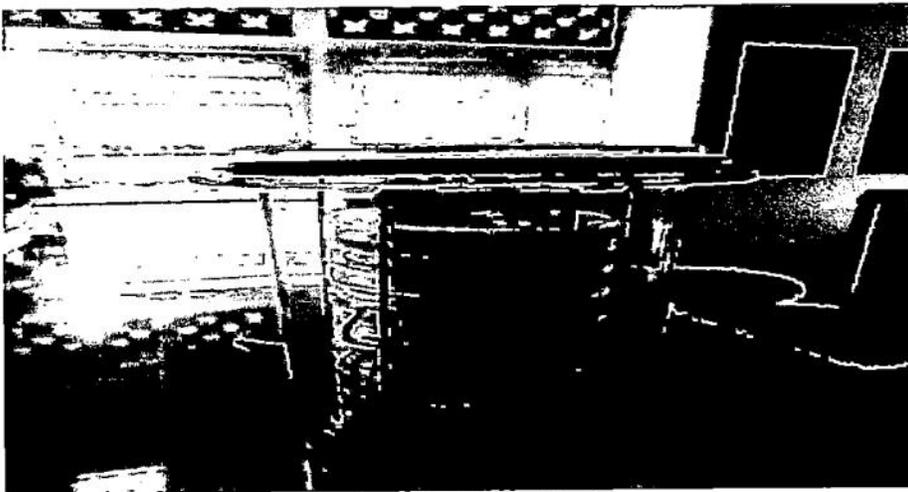
Gambar 20. Penamaan lubang sumuran pada cawan petri



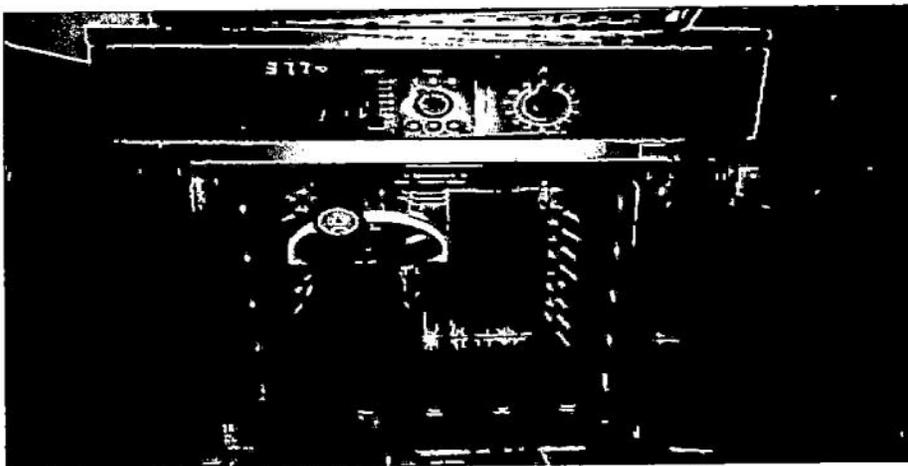
Gambar 21. Pelubangan cawan petri menggunakan mikropipet

6. Uji daya antibakteri

Ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) yang telah dibuat dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan Klorheksidin digukonat 2% masing – masing ditetaskan dengan mikropipet sebanyak 50 μ dan larutan aquabides steril dengan kontrol negatif. Media yang ditetesi dengan larutan uji kemudian dimasukkan ke dalam *anaerobic jar* dan diinkubasi dalam inkubator selama 48 jam pada suhu 37°C agar terjadi pertumbuhan koloni.



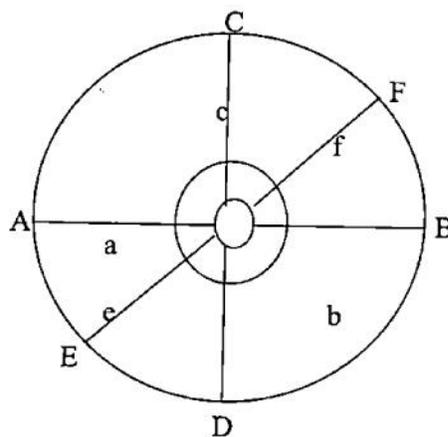
Gambar 22. *Anaerobic jar*



Gambar 23. Inkubator merek *memmert*

7. Pengukuran zona radikal

Hasil dibaca setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dengan mengukur zona radikal yaitu daerah bening di sekeliling sumuran yang tidak terdapat koloni bakteri. Pengukuran zona radikal yaitu dengan mengambil dua garis yang saling tegak lurus melalui titik sumuran (o) serta garis I garis bersudut 45° terdapat garis AB atau CD melalui sumuran yang sama dengan (ab) atau (cd). Pengukuran pertama menggunakan diameter zona radikal (AB) dikurangi diameter lubang sumuran (ab) kemudian hasilnya dibagi dua. Pengukuran kedua dengan menggunakan zona radikal (CD) dikurangi diameter lubang sumuran (cd) kemudian hasilnya dibagi dua. Pengukuran ketiga menggunakan diameter zona radikal (EF) dikurangi diameter lubang sumuran (ef) kemudian hasilnya dibagi dua. Hasil akhir dari pengukuran zona radikal adalah pengukuran pertama ditambah dengan pengukuran kedua ditambah pengukuran ketiga kemudian hasilnya dibagi tiga (Kartikasari dkk, 2008).



Gambar 24 . Cara pengukuran Zona Radikal

Keterangan :

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

AB, CD, EF : Zona radikal (daerah bening)

Ab, cd, ef : Diameter lubang sumuran

O : Pusat sumuran

Sudut AE : 45

Pengukuran zona radikal I Sumuran:

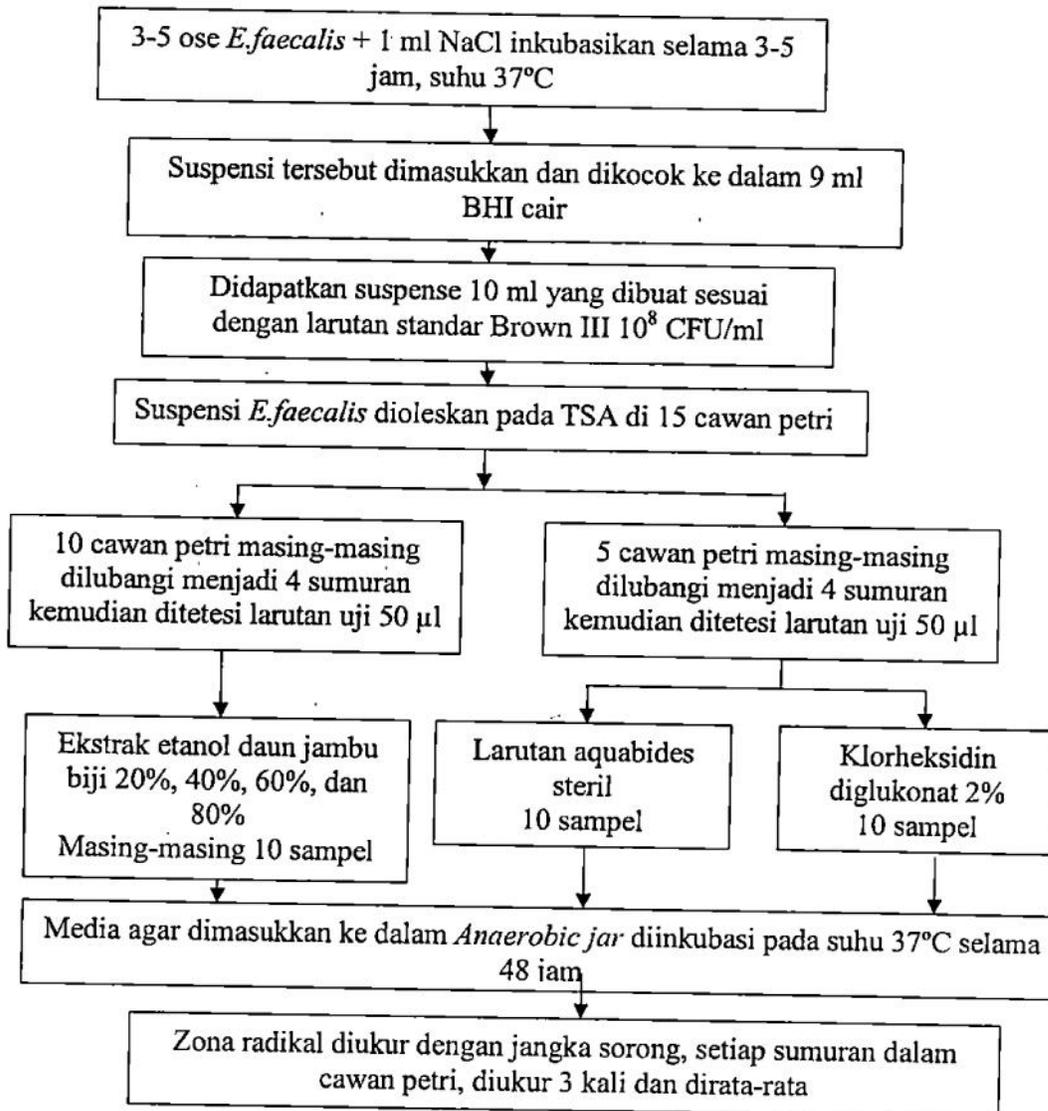
$$\frac{\frac{1}{2} (AB - ab) + \frac{1}{2} (CD - cd) + \frac{1}{2} (EF - ef)}{3}$$

H. Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dilakukan uji normalitas dengan metode *Shapiro - wilk* karena sampel berjumlah 50. Uji normalitas ini digunakan untuk mengetahui apakah sampel yang diambil berasal dari populasi yang terdistribusi normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah kelima sampel mempunyai varians yang sama. Setelah uji normalitas dan uji homogenitas terpenuhi maka untuk mengetahui perbedaan efektivitas daya antibakteri antara klorheksidin diglukonat 2% dan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) terhadap *Enterococcus faecalis* maka digunakan uji statistik *One Way Anova* dan apabila diketahui distribusi datanya tidak normal dan varians kelima sampel tidak sama, maka uji statistik yang digunakan adalah *Kruskal - Wallis*. Kemudian untuk mengetahui

perbedaan efektivitas daya anatibakteri antara setiap kelompok uji terhadap *Enterococcus faecalis* digunakan uji analisis LSD (*Least Significant Different*).

I. Alur penelitian



Gambar 25. Skema alur penelitian

Keterangan : BHI : *Brain Heart Infusion*.

NaCl : Natrium Klorida.

TSA : *Tryptone Soya Agar*.