

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian yang dilakukan termasuk jenis penelitian eksperimental laboratoris murni yang dilakukan secara *in vitro*.

##### **B. Subyek Penelitian**

Subyek pada penelitian ini adalah bakteri *Enterococcus faecalis* yang diperoleh dari biakan murni laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%. Sampel penelitian berjumlah lima cawan petri dengan masing masing diberi sumuran sebanyak 5 yang akan ditetesi kalsium hidroksida sebagai kontrol positif, *aquades* sebagai kontrol negatif, ekstrak buah mahkota dewa konsentrasi 25%, ekstrak buah mahkota dewa konsentrasi 50%, ekstrak buah mahkota dewa konsentrasi 75%. Jumlah sampel penelitian dihitung berdasarkan rumus Federer (federer,1991).

Rumus Federer:

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

Keterangan:

n = jumlah sampel    t = jumlah kelompok

Perhitungan sampel:

$$(n - 1) \times (t - 1) \geq 13$$

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

### C. Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada pada bulan November 2016. Penelitian uji antibakteri buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Desember 2016.

### D. Variabel Penelitian

#### 1. Variabel pengaruh

Ekstrak etanol buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%.

#### 2. Variabel terpengaruh

Variabel penelitian ini adalah zona radikal bakteri *Enterococcus faecalis* dalam media agar *Mueller Hinton*.

### 3. Variabel terkendali

- a. Volume larutan setiap sumuran 50 $\mu$ l (diambil dengan mikropipet)
- b. Bakteri *Enterococcus faecalis*
- c. Media kultur agar *Mueller Hinton*
- d. Metode uji kepekaan yaitu metode difusi cara sumuran
- e. Waktu inkubasi 24 jam
- f. Suhu inkubasi 37<sup>0</sup>
- g. Konsentrasi bakteri 10<sup>8</sup>CFU/ml
- h. Diameter sumuran yaitu 5 mm dengan kedalaman 3 mm
- i. Etanol 70% sebagai pelarut
- j. Kapas lidi steril
- k. Cara pengolesan bakteri pada media agar
- l. Sterilitas ruangan
- m. Kematangan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)

### 4. Variabel tak terkendali

- a. Kontaminasi bakteri lain

## **E. Definisi Operasional**

1. Daya antibakteri merupakan suatu zat dalam membunuh ataupun menghambat pertumbuhan dan perbanyakan bakteri.
2. Buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) berasal dari Merapi Herbal merupakan sediaan pekat yang diproses menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan konsentrasi 25%, 50%, 75%.

3. Maserasi adalah proses perendaman simplisia yang sudah halus atau berbentuk serbuk dalam pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel sehingga zat-zat akan melarut.
4. Bakteri *Enterococcus faecalis* adalah bakteri hasil biakan murni Balai Laboratorium Kesehatan. Bakteri ditanam dalam media agar *Mueller hinton*, kemudian diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37<sup>0</sup>C.
5. Zona radikal adalah area jernih yang memberikan gambaran adanya hambatan pertumbuhan mikroorganismenya.
6. Metode difusi adalah uji kepekaan bakteri dengan cara membua lubang sumuran pada agar *Mueller hinton* yang telah ditanam bakteri *Enterococcus faecalis*, ditetesi larutan uji dan dilakukan inkubasi sehingga zona radikal yang terbentuk dapat terukur.

#### **F. Alat dan Bahan Penelitian**

1. Alat
  - a. Autoklaf .
  - b. Lampu spiritus untuk sterilisasi alat.
  - c. Almari pengering sebagai tempat untuk memekatkan ekstrak hasil evaporasi.
  - d. Alat penyerbuk untuk menghancurkan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*).
  - e. Tabung *erlemayer* untuk menampung filtrat.
  - f. Corong *buchner* untuk memisahkan filtrat dengan residu.

- g. Alat *rotary evaporator* untuk menguapkan penyari ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*).
- h. *Waterbath* berfungsi sebagai tempat untuk hasil ekstrak mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*).
- i. Neraca timbang untuk menimbang buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*), dan ekstrak.
- j. Inkubator merek *memmert* untuk mengeramkan bakteri.
- k. Oven *memmert* untuk mensterilisasi alat yang digunakan.
- l. *Anaerob jar* untuk menciptakan suana anaerob bagi bakteri *Enterococcus faecalis*.
- m. Cawan petri sebagai tempat bagi media uji kepekatan bakteri *Enterococcus faecalis*.
- n. Ose steril untuk mengambil koloni bakteri biakan murni.
- o. Mikropipet digunakan untuk mengambil larutan uji dan kontrol.
- p. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi sebagai tempat pembiakan bakteri, pengenceran ekstrak, dan suspensi bakteri.
- q. Kapas lidi steril untuk mengoleskan bakteri pada media agar.
- r. *Perforator* untuk membuat sumuran pada media agar.
- s. Jangka sorong (*Sliding caliper*) dengan ketelitian 0,05 mm untuk mengukur zona radikal disekitar sumuran pada cawan petri.
- t. Sarung tangan dan masker steril sebagai sterilisasi diri.

- u. Pipet ukur untuk mengambil larutan induk, aquades, dan larutan Kalsium Hidroksida Ca (OH)<sub>2</sub>

## 2. Bahan

- a. Kalsium Hidroksida Ca(OH)<sub>2</sub> sebagai kontrol positif.
- b. Ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%.
- c. Etanol 70% sebagai pelarut ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*).
- d. *Aquades* steril sebagai kontrol negatif.
- e. Sediaan bakteri *Enterococcus faecalis*.
- f. Agar *Mueller hinton* sebagai media untuk uji kepekaan bakteri *Enterococcus faecalis*.
- g. Media cair *Brain Heart Infusion* (BHI) sebagai pembiakan bakteri *Enterococcus faecalis* agar dicapai jumlah koloni bakteri 10<sup>8</sup> CFU/ml.

## G. Jalannya Penelitian

### 1. Pembuatan ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Pemilihan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) diperoleh dari buah yang sudah masak. Pemilihan sampel harus diperhatikan dengan cermat untuk menghindari komposisi kimia sampel yang tidak representatif, dengan ciri-ciri makroskopis buah yang segar, matang, berwarna merah marun, berbentuk bulat dan berbau manis seperti gula pasir. Daging buah berwarna putih dengan ketebalan bervariasi tergantung ketebalan buah. Ukuran buah

bervariasi dari sebesar telur ayam kampung hingga sebesar apel merah. Ketebalan kulit berkisar 0,5-1,0 mm, bijinya bulat, keras dan berwarna coklat (Winarto, 2005).

Buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) sebanyak 1500 gram dibersihkan dari kotoran, dicuci bersih dan ditimbang, lalu diiris halus kemudian dikeringkan dalam almari pengering dengan suhu 60°C-70°C selama 24 jam. Sampel yang telah kering kemudian diblender sampai menjadi serbuk simplisis seberat 150 gram.

Proses selanjutnya adalah pembuatan ekstrak yaitu serbuk serbuk dimasukan dalam toples yang berisi etanol 70% sambil diaduk minimal 30 menit dan didiamkan minimal 24 jam. Kemudian hasilnya disaring dengan corong *Buchner* sehingga diperoleh filtrat dan residu. Filtrat dievaporasi dengan *water bath* dengan suhu 70°C sehingga didapat ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*).

Ekstrak etanol buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) murni diencerkan sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan yaitu 25%, 50%, 75%. Pengenceran ekstrak etanol buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) 25%, 50%, 75% dengan cara pengenceran menggunakan aquades steril dengan perhitungan sebagai berikut:

- a. Ekstrak etanol buah mahkota dewa 25%

Ekstrak kental buah mahkota dewa sebanyak 250 mg dilarutkan dengan aquades steril sampai volume 1 mL divortex hingga homogen.

b. Ekstrak etanol buah mahkota dewa 50%

Ekstrak kental buah mahkota dewa sebanyak 500 mg dilarutkan dengan aquades steril sampai volume 1 mL divortex hingga homogen.

c. Ekstrak etanol buah mahkota dewa 75%

Ekstrak kental buah mahkota dewa sebanyak 750 mg dilarutkan dengan aquades steril sampai volume 1 mL divortex hingga homogen.

2. Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian disterilkan terlebih dahulu menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat yang disterilkan yaitu erlenmeyer, gelas ukur, petri disk, perforator, media *Mueller Hinton*, BHI dan tabung reaksi.

3. Pembuatan suspensi bakteri *Enterococcus faecalis*

Suspensi bakteri dibuat sesuai standar Brown III  $10^8$  CFU/ml. Suspensi dibuat dengan mengambil beberapa ose bakteri *Enterococcus faecalis* menggunakan ose steril kemudian dimasukkan ke dalam 1 ml NaCL dan dikocok hingga homogen, setelah itu inkubasikan selama 3-5 jam pada suhu 37°C. Larutan NaCL yang telah dicampur bakteri dimasukkan ke dalam 9ml media cair BHI sehingga sesuai dengan standar konsentrasi  $10^8$  CFU/ml.

4. Inkulasi suspensi bakteri pada media agar

Celupkan kapas lidi steril ke dalam suspensi bakteri dan tekan pada dinding tabung agar tidak terlalu basah dan oleskan pada permukaan

media *Mueller Hinton* pada setiap cawan petri yang tersedia secara merata. Lakukan perlubangan atau sumuran pada setiap cawan petri sebanyak 5 sumuran dengan diameter sumuran adalah 6 mm dengan kedalaman 3 mm.

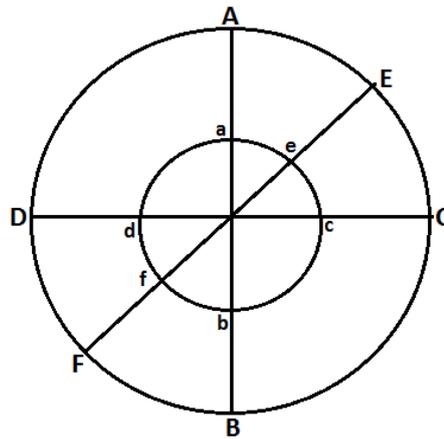
#### 5. Uji daya antibakteri

Uji daya antibakteri pada penelitian ini menggunakan metode difusi dengan teknik sumuran. Ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang telah dibuat dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% masing-masing diteteskan ke dalam lubang sumuran sebanyak 50 µl untuk setiap lubang. Kalsium hidroksida  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  sebagai kontrol positif dan aquades sebagai kontrol negatif juga diteteskan dengan jumlah yang sama. Masukkan cawan petri yang sudah ditetesi kontrol positif maupun negatif ke dalam anaerobic jar dilanjutkan dengan proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C sesuai standar supaya terjadi koloni bakteri.

#### 6. Pengukuran zona radikal

Hasil dianalisa dengan cara mengukur zona radikal menggunakan *sliding caliper*. Cara pengukurannya yaitu dengan membuat dua garis lurus yang melalui titik pusat dari lubang sumuran (garis AB dan CD). Garis yang terbentuk pada sumuran dinamakan garis ab dan cd. Pembuatan garis ketiga dilakukan dengan membuat garis diantara kedua garis tegak lurus yang sebelumnya telah dibuat (diantara garis AB dan CD). Garis yang ketiga membentik sudut 45° terhadap garis AB dan CD dan dinamakan garis EF. Garis ketiga yang terbentuk pada sumuran dinamakan dengan

garis ef. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap sumuran yang ada (Irvati, 2003). Berikut gambar 4 cara pengukuran zona hambat atau zona radikal pada sumuran.



**Gambar 4.** Cara Pengukuran Zona Radikal

Rumus pengukuran zona radikal untuk 1 sumuran (Irvati, 2003):

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

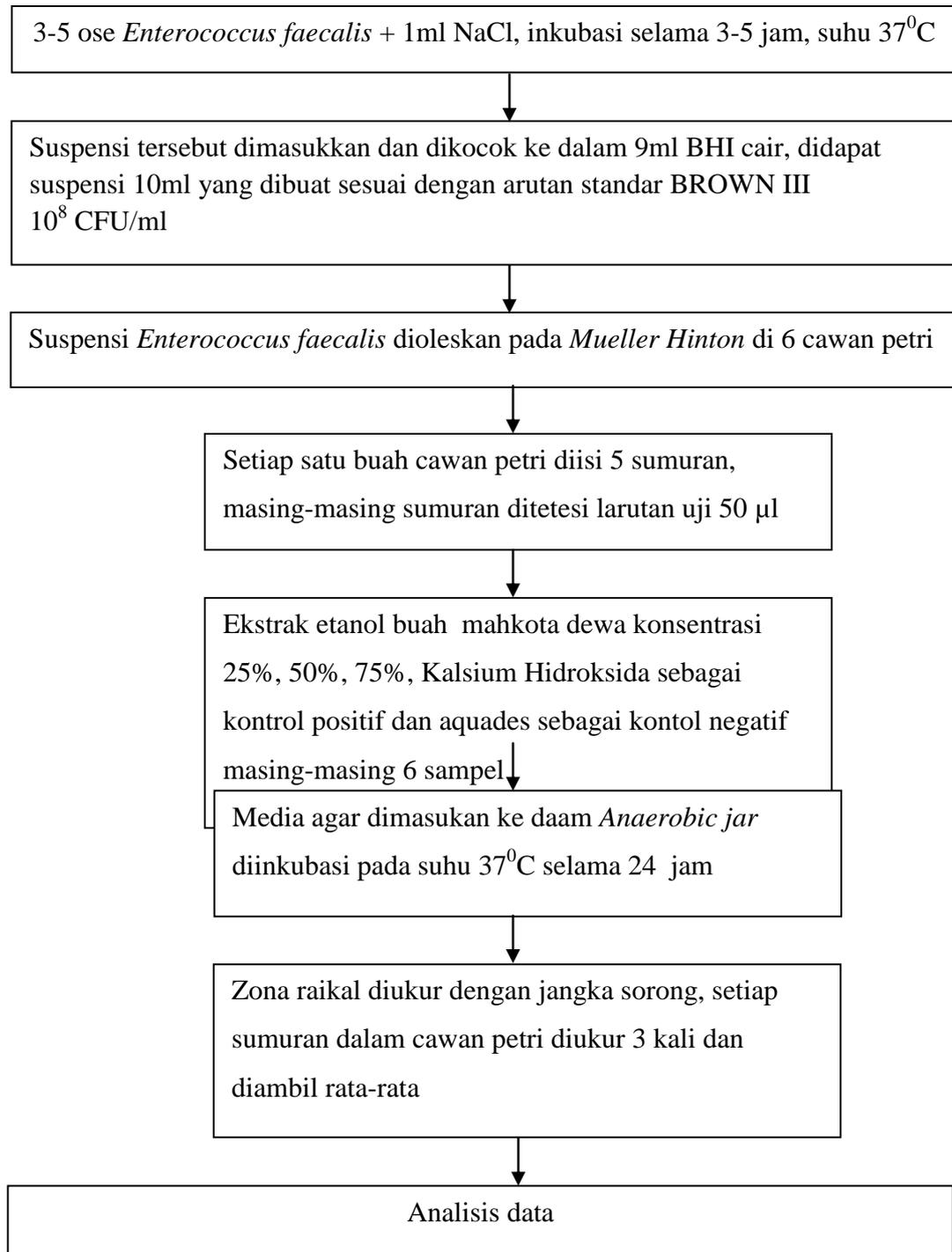
Keterangan :

Garis AB, CD dan EF : diameter daerah hambatan yang terbentuk  
 Garis ab, cd dan ef : diameter lubang sumuran yang telah dibuat (5 mm)

## H. Analisis Data

Data dari hasil penelitian didapat dengan mengukur diameter zona radikal yang terbentuk pada setiap lubang sumuran. Data yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji normalitas. Pada penelitian ini digunakan uji normalitas dengan menggunakan metode *Shapiro-wilk* karena pada penelitian ini jumlah sampel penelitian kurang dari 50. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah sampel yang dipakai berasal dari satu populasi yang terdistribusi normal. Uji homogenitas dilakukan setelah uji normalitas. Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui apakah sampel yang digunakan dalam penelitian memiliki varian sama. Apabila sudah didapatkan data yang homogen dan normal selanjutnya dilakukan uji statistik *Anova* satu jalur untuk menganalisis datanya, namun apabila data didapatkan tidak homogen maka dilakukan uji hipotesis dengan *Kruskal wallis*.

## I. Alur Penelitian



**Gambar 5.** Skema jalannya penelitian