

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorni murni secara *in vitro* mengenai daya antibakteri ekstrak kunyit putih konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20% terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

- a. Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
- b. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

2. Waktu penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Mei – Juni 2018

C. Identifikasi Variabel

1. Variabel Pengaruh

- a. Ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20%
- b. Bahan irigasi NaOCl 5,25%

2. Variabel Terpengaruh

Bakteri *Enterococcus faecalis* setelah pemberian NaOCl 5,25%, ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20%.

3. Variabel Terkendali

- a. Bakteri *Enterococcus faecalis* strain ATCC 29212 (*American Type Culture Collection*)
- b. Suhu inkubasi 37°C, waktu inkubasi 24 jam
- c. Tumbuhan kunyit putih
- d. Ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20%
- e. Kertas cakram uji aktifitas bakteri merk Oxoid
- f. Konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml (memenuhi Standar Brown III)
- g. Volume larutan uji kontrol
- h. Media pertumbuhan bakteri *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- i. Cara penuangan bakteri pada media MHA

4. Variabel Tidak Terkendali

Kontaminasi organisme lain seperti bakteri dan jamur.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 biakan murni Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

2. Besar sampel Penelitian

Sampel penelitian penelitian ini adalah kunyit putih (*Curcuma mangga*) dengan konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20% hasil dari pembuatan ekstrak di Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Rumus Federer:

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

Keterangan:

n = besar sampel

t = pengulangan

(Hidayat, 2007)

Perhitungan jumlah sampel yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah:

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

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

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

$$4r \geq 19$$

$$\geq 4,75$$

$$= 5$$

Berdasarkan perhitungan diatas maka dilakukan 5 kali pengulangan pada tiap kontrol perlakuan.

E. Definisi Operasional

Daya antibakteri adalah suatu zat yang mampu mengeliminasi bakteri pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini digunakan metode difusi cakram dengan menggunakan agar *Mueller Hinton* yang sebelumnya sudah dioles suspensi bakteri uji yaitu bakteri *Enterococcus faecalis*.

Enterococcus faecalis adalah bakteri anaerob fakultatif gram positif yang berbentuk kokus berkolonisasi sehingga membentuk biofilm yang dapat menyebabkan kegagalan perawatan saluran akar. Kegagalan perawatan saluran akar bisa dicegah dengan melakukan desinfeksi yang adekuat dengan menggunakan larutan irigasi.

Larutan irigasi adalah adalah bahan yang berfungsi untuk meminimalisir adanya bakteri pada saluran akar. Larutan ini akan membersihkan saluran akar dari sisa bakteri yang tertinggal. NaOCl memiliki sifat bakteriosid spektrum luas. Penelitian ini menggunakan NaOCl 5,25% sebagai kontrol positif.

Ekstrak kunyit putih merupakan sediaan kental yang didapatkan dari proses ekstraksi kunyit putih dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Dihasilkan beberapa konsentrasi dari pengenceran ekstrak sediaan kental yaitu 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20%.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

- a. Jangka sorong (*sliding caliper*) dengan ketelitian 0.05 mm untuk mengukur zona radikal
- b. Inkubator untuk tempat pengeraman bakteri *Enterococcus faecalis*
- c. *Anaerobic jar* digunakan untuk menciptakan suasana anaerob bagi bakteri *Enterococcus faecalis*
- d. Autoklaf yang digunakan untuk sterilisasi alat, dan bahan
- e. Lampu spiritus yang digunakan untuk mensterilkan ose dan ujung tabung reaksi
- f. Ose yang digunakan untuk mengambil koloni bakteri
- g. Mikropipet yang digunakan untuk mengambil suspensi bakteri dan BHI
- h. Timbangan analitik
- i. Cawan petri yang digunakan sebagai tempat media *Mueller Hinton* Agar (MHA)
- j. Tabung Erlenmeyer yang digunakan untuk maserasi ekstrak kunyit putih
- k. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi
- l. Corong Buchner yang digunakan untuk menyaring ekstrak kunyit putih
- m. *Waterbath* yang digunakan untuk menguapkan air pada ekstrak kunyit putih

- n. *Vacum rotary evaporator* yang digunakan untuk menguapkan etanol 70%
 - o. Mesin penggiling untuk menghaluskan ekstrak kunyit putih
 - p. *Colony Counter*
2. Bahan Penelitian
- a. Ekstrak kunyit putih sebagai larutan uji
 - b. Biakan bakteri *Enterococcus faecalis* strain ATCC
 - c. Etanol 70% sebagai pelarut ekstrak kunyit putih
 - d. Media cair *Brain Heart Infussion* (BHI) sebagai media pertumbuhan bakteri
 - e. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebagai media pertumbuhan koloni bakteri *Enterococcus faecalis*
 - f. Akuades steril sebagai kontrol negatif

G. Jalannya Penelitian

1. Persiapan penelitian

a. Perijinan penggunaan laboratorium

Membuat surat ijin penggunaan laboratorium Teknologi Farmasi FKIK UMY, dan Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY untuk penggunaan selama penelitian berlangsung.

b. Sterilisasi Alat

Alat yang akan digunakan dicuci bersih lalu dikeringkan. Alat seperti tabung *Erlenmayer*, corong *Buchner*, cawan petri, dan alat-alat yang digunakan yang terbuat dari gelas ditutup bagian mulutnya dengan kapas kemudian dibungkus dengan kertas cokelat, setelah itu disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Jarum ose disterilkan dengan cara pemijaran langsung diatas api (Rahma, dkk., 2010).

2. Jalannya Penelitian

Pembuatan ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Pembuatan ekstrak kunyit putih dilakukan dengan teknik maserasi. Sebanyak 2.000 gram kunyit putih segar dicuci bersih, dipotong menjadi bagian kecil, ditimbang, lalu dikeringkan pada suhu 45°C selama 48 jam di lemari pengering, kemudian dibuat menjadi serbuk menggunakan mesin penggiling. Maserasi dilakukan dengan cara menambahkan etanol 70% kemudian diaduk menggunakan *stirer*

magnetic setiap 6 jam sekali dan didiamkan selama 24 jam, setelah itu disaring menggunakan corong *Buchner* sehingga diperoleh residu dan filtrat. Tahapan maserasi dan penyaringan diulang sebanyak dua kali dengan pelarut yang sama untuk mendapatkan hasil yang lebih baik. Maserat diuapkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* untuk menguapkan etanol 70% selama satu jam, kemudian dihasilkan ekstrak yang kental. Ekstrak kental tersebut di masukan kedalam cawan porselin, sisa pelarut dari ekstrak kental diuapkan menggunakan *waterbath* suhu 50°C. Akan didapatkan ekstrak kunyit putih dengan berat konstan 300 gram.

Tahapan pengenceran ekstrak adalah sebagai berikut, ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) konsentrasi 100%, 10 g ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) ditambah DMSO sampai volume 10 ml dalam vortex hingga homogen. Ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) konsentrasi 80%, 8 g ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) ditambah larutan DMSO sampai volume 10 ml dalam vortex hingga homogen. Ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) konsentrasi 60%, 6 g ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) ditambah larutan DMSO sampai volume 10 ml dalam vortex hingga homogen. Ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) konsentrasi 40%, 4 g ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) ditambah larutan DMSO sampai volume 10 ml dalam vortex hingga homogen. Ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*) konsentrasi 20%, 2 g ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga*)

ditambah larutan DMSO sampai volume 10 ml dalam vortex hingga homogen (BPOM, 2010).

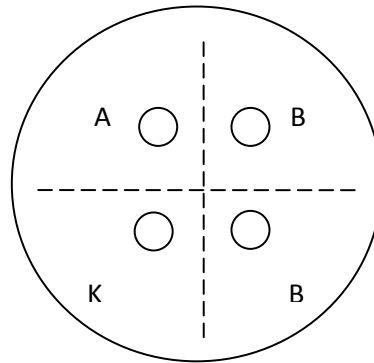
Suspensi bakteri *Enterococcus faecalis* dibuat dengan cara membuat media pertumbuhan bakteri dengan *Nutrient Agar* (NA) pada sediaan agar miring. Cara pembuatannya adalah menyiapkan bahan media NA yaitu *Beef Extract* 3 gram, pepton 5 gram, agar 15gr dan akuades 100 ml, kemudian melarutkan agar dengan akuades sebanyak 50 ml dipanaskan dan diaduk sampai homogen menggunakan *hot plate stirrer*. *Peptone* dan *beef extract* dilarutkan menggunakan larutan akuades. Apabila larutan sudah homogen, tuangkan larutan ke larutan agar dan diaduk sampai homogen, kemudian tuang larutan agar NA kedalam tabung reaksi untuk pembuatan agar miring kemudian tabung ditutup dengan kapas dan disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit setelah selesai di sterilisasi tabung dimiringkan pada rak tabung sampai dingin. Bakteri *Enterococcus faecalis* ditanamkan pada permukaan agar miring yang telah padat, kemudian agar miring yang sudah ditanamkan bakteri uji di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pembuatan suspensi bakteri *Enterococcus faecalis* dibuat sesuai dengan standar Brown III 10^8 CFU/ml. Suspensi dibuat dengan mengambil 1-3 ose bakteri *Enterococcus faecalis* dengan menggunakan ose steril yang telah dipanaskan diatas lampu spirtus, kemudian dimasukan kedalam media cair BHI (*Brain Heart Infusion*)

pada tabung reaksi sehingga didapatkan 10 ml BHI konsentrasi 10^8 CFU/ml. Setelah itu diaduk hingga homogen dan di inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C .

Pembuatan Mueller Hinton Agar (MHA) pada cawan petri dilakukan dengan cara yaitu, pertama memasukkan medium MHA, larutan akuades, dan agar kedalam tabung *Erlenmeyer*, kemudian dipanaskan diatas piringan panas (*hot plate*) dan diaduk menggunakan *stirer magnetic* sampai homogen. Kedua adalah media MHA yang sudah homogen disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, selanjutnya dimasukkan kedalam 9 buah cawan petri, kemudian ditunggu media agar sampai dingin dan mengeras. Satu cawan petri dibuat 4 sisi menggunakan spidol permanen pada *plate* bagian luar, kemudian dipanasi diatas lampu spiritus sampai memutih, sehingga didapat 35 bagian.

Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara mengambil suspensi bakteri *Enterococcus faecalis* yang telah diinkubasi 24 jam didalam larutan BHI sebanyak $50\mu\text{l}$ dicampur dengan $150\mu\text{l}$ BHI steril, kemudian dimasukkan kedalam tabung uji coba kemudian digerakkan memutar selama 5 detik. BHI kemudian dituang dan diratakan pada permukaan MHA dalam cawan petri dengan menggunakan pipet kaca yang telah dibengkokan ujungnya.



Gambar.3 Cawan petri dibagi menjadi 4 sisi

A : Larutan uji NaOCl sebagai kontrol positif

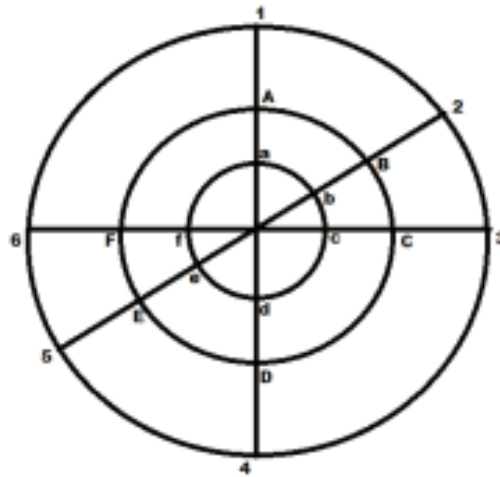
B : Larutan uji ekstrak etanol kunyit putih konsentrasi tertentu

K : Akuades sebagai kontrol negatif

Uji daya antibakteri dilakukan pada ekstrak kunyit putih yang telah dibuat yaitu konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20% masing-masing diberikan kertas uji coba aktifitas bakteri merk Oxoid yang telah dilakukan perendaman selama 30 menit. Kemudian diberikan satu persatu pada tiap sisi MHA yang sebelumnya telah dibuat, akuades sebagai kontrol negatif, NaOCl 5,25% sebagai larutan kontrol positif kemudian dimasukkan ke dalam aerobik jar, lalu diinkubasikan dalam inkubator selama 24jam pada suhu 37°C agar terjadi pertumbuhan koloni.

Pengukuran zona radikal dilakukan dengan cara menganalisa hasil pengukuran zona radikal dengan menggunakan *sliding calipper*, cara pengukurannya adalah dengan membuat garis tegak lurus melalui titik pusat kertas cakram (garis AB dan CD) kemudian dibuat garis yang

ketiga dengan membuat garis antara garis AB dan CD, garis ketiga diberi nama EF. Pada setiap kertas cakram diberi perlakuan yang sama.



Gambar.4 Penghitungan zona radikal

Rumus pengukuran zona radikal:

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

Keterangan:

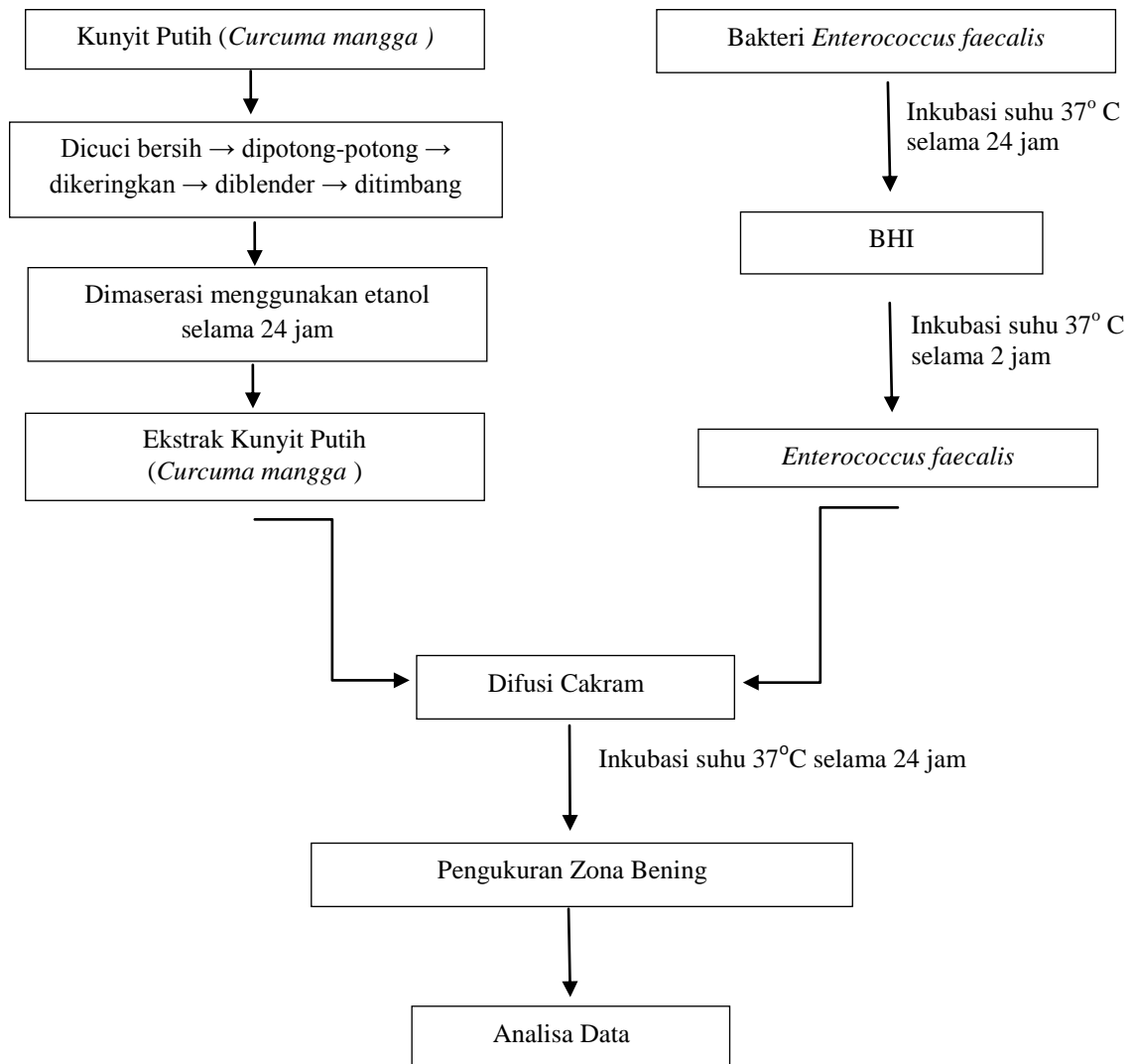
Garis AB, CD, dan EF : diameter daerah hambatan yang terbentuk

Garis ab, cd, dan ef : diameter kertas cakram

H. Analisis Data

Dari hasil penelitian ini didapatkan data hasil pengukuran diameter zona radikal yang terbentuk pada setiap kertas cakram. Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dilakukan uji normalitas dengan metode Shapiro-Wilk karena sampel kurang dari 50. Uji normalitas digunakan untuk mengetahui apakah sample yang diambil berdasarkan dari populasi yang terdistribusi normal. Dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui sampel tersebut memiliki variasi yang sama atautakah tidak. Pengujian data distribusi normal dan variasi sama maka dapat dilakukan pengujian berikutnya menggunakan uji analisa parametrik menggunakan *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan zona radikal yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi ekstrak kunyit putih sama atau tidak secara signifikan. Jika variabel tidak terdistribusi normal dan variasi tidak sama, maka alternatif ujinya adalah uji *Kruskal Wallis*. Kemudian menggunakan analisa *post hock* untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan. Jika analisa data menggunakan *One Way ANOVA* analisa *post hock* menggunakan *tukey*, dan apabila analisa data menggunakan *Kruskal Wallis* analisa *Post Hock* menggunakan *Mann Whitney* (Dahlan, 2013).

I. Alur Penelitian



Gambar.5 Alur Penelitian