

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

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

B. Bahan Uji dan Bakteri Uji

Bakteri uji pada penelitian ini yaitu bakteri *Enterococcus faecalis* yang diperoleh dari hasil biakan murni laboratorium mikrobiologi Yogyakarta dan bahan uji berupa ekstrak daun pare (*Momordica charantia*) dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75%. Sampel penelitian berjumlah 6 buah cawan petri dengan masing-masing diberi sumuran sebanyak 5 lubang yang akan ditetesi dengan *Kalsium Hidroksida* ($Ca(OH)_2$) sebagai kontrol positif, aquades steril sebagai kontrol negatif, ekstrak daun pare 25%, ekstrak daun pare 50%, ekstrak daun pare 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 :

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

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

$$4 (t-1) \geq 15$$

$$4t - 4 \geq 15$$

$$4t \geq 19$$

$$t \geq 4,75$$

Jadi, berdasarkan perhitungan didapatkan hasil 4,75 sehingga peneliti mengambil 2 angka diatas hasil perhitungan tersebut yaitu 5 atau 6 untuk sampelnya.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak daun pare (*Momordica charantia*) dilakukan di Laboraturium Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian uji daya antibakteri ekstrak daun pare (*Momordica charantia*) terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

Ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia*) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%.

2. Variabel Terpengaruh

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

3. Variabel Terkendali

- a. Volume larutan pada tiap sumuran 50 μ l (diambil dengan mikropet)
- b. Bakteri *Enterococcus faecalis*
- c. Media agar *Mueller Hinton*
- d. Metode uji kepekaan yaitu metode difusi cara sumuran
- e. Waktu inkubasi 24 jam
- f. Suhu inkubasi 37°C
- g. Konsentrasi bakteri
- h. Etanol 70% sebagai pelarut
- i. Cara pengolesan bakteri pada media agar

4. Variabel Tak Terkendali

- a. Kontaminasi bakteri lain
- b. Sterilisasi ruangan

E. Definisi Operasional

1. Daya antibakteri merupakan suatu zat dalam membunuh ataupun menghambat pertumbuhan dan perbanyakan bakteri.
2. Ekstrak daun pare (*Momordica charantia*) 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 37⁰C.
5. Zona radikal adalah area jernih yang memberikan gambaran adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme.
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 Penelitian
 - a. *Autoklaf* untuk sterilisasi bahan basah.
 - b. Lampu spiritus untuk sterilisasi alat.
 - c. Almari pengering digunakan sebagai tempat untuk memekatkan ekstrak hasil evaporasi.
 - d. Alat penyerbuk untuk menghancurkan daun pare (*Momordica charantia*).
 - e. Tabung *Erlenmeyer* untuk menampung filtrat.
 - f. Corong *Buchner* untuk memisahkan filtrat dengan residu.
 - g. *Vacuum rotary evaporator* untuk menguapkan penyari ekstrak daun pare (*Momordica charantia*).
 - h. *Waterbath* berfungsi sebagai tempat hasil saringan ekstrak daun pare (*Momordica charantia*) pada saat akan diuapkan.

- i. Neraca timbang untuk menimbang daun pare (*Momordica Charantia*)
 - j. Inkubator untuk mengeramkan bakteri.
 - k. Oven untuk mensterilisasi alat-alat yang digunakan.
 - l. *Anaerobic jar* untuk menciptakan suasana anaerob bagi bakteri *Enterococcus faecalis*.
 - m. Cawan petri tempat bagi media uji kepekaan bakteri *Enterococcus faecalis*.
 - n. Ose steril untuk mengambil koloni bakteri biakan murni.
 - o. Mikropipet digunakan bersama dengan tip kuning untuk mengambil larutan uji dan kontrol
 - p. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi untuk tempat pembiakan bakteri, pengenceran ekstrak dan suspensi bakteri.
 - q. Pipet *pasteur* plastik digunakan untuk membuat sumuran media agar.
 - r. Jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm digunakan untuk mengukur zona radikal disekitar sumuran pada *cawan petri*.
 - s. Sarung tangan dan masker sebagai perlindungan diri.
 - t. Pipet ukur untuk mengambil larutan induk, aquades steril dan *Kalsium Hidroksida (Ca(OH)₂)*
2. Bahan penelitian
 - a. *Kalsium Hidroksida (Ca(OH)₂)* sebagai kontrol positif.

- b. Ekstrak daun pare (*Momordica charantia*) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%.
- c. Larutan *etanol* 70% sebagai pelarut ekstrak daun pare.
- d. Aquades steril sebagai kontrol negatif.
- e. Bakteri *Enterococcus faecalis*.
- f. *MH (Mueller hinton)* media uji kepekaan bakteri.
- g. Media cair *Brain Heart Infusion* untuk pembiakan bakteri *Enterococcus* supaya dicapai jumlah koloni bakteri CFU/ml.

G. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak daun pare (*Momordica charantia*)

Daun pare (*Momordica charantia*) dicuci bersih, kemudian keringkan di dalam almari pengering pada suhu 50°C selama 80 jam. Setelah kering masukkan daun pare (*Momordica charantia*) ke dalam blender untuk di haluskan. Proses ekstraksi dilakukan secara maserasi yaitu serbuk kering dimasukkan ke dalam toples yang berisi etanol 70% sambil diaduk 2 kali dalam sehari dengan lama pengadukan minimal 30 menit, dan didiamkan minimal 24 jam. Lakukan selama 5-7 hari. Saring atau filtrasi hasilnya dengan menggunakan *corong buchner* sehingga didapat filtrat dan residu. Filtrat dievaporasi dengan menggunakan *watrebath* kemudia dilanjutkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 60-70°C sehingga didapatkan hasil berupa ekstrak kental dari daun pare. Ekstrak daun pare (*Momordica caharantia*) yang sudah kental kemudia diuapkan menggunakan pemanas *watrebath*

sehingga diperoleh ekstrak daun pare kering. Ekstrak daun pare kering diencerkan sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan yaitu 25%, 50%, 75%.

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 *TSA*, *BHI* dan tabung reaksi.

3. Pembuatan suspensi bakteri *Enterococcus faecalis*

Suspensi bakteri dibuat sesuai standar Brown III CFU/ml. Suspensi dibuat dengan mengambil beberapa ose bakteri *Enterococcus faecalis* menggunakan ose steril kemudian dimasukkan ke dalam 1 ml NaCL dan diaduk hingga homogen, setelah itu di inkubasi selama 2-4 jam pada suhu 37°C. Larutan NaCL yang telah dicampur bakteri dimasukkan ke dalam 9 ml media cair BHI sehingga sesuai dengan standar konsentrasi CFU/ml.

4. Inokulasi suspensi bakteri pada media agar

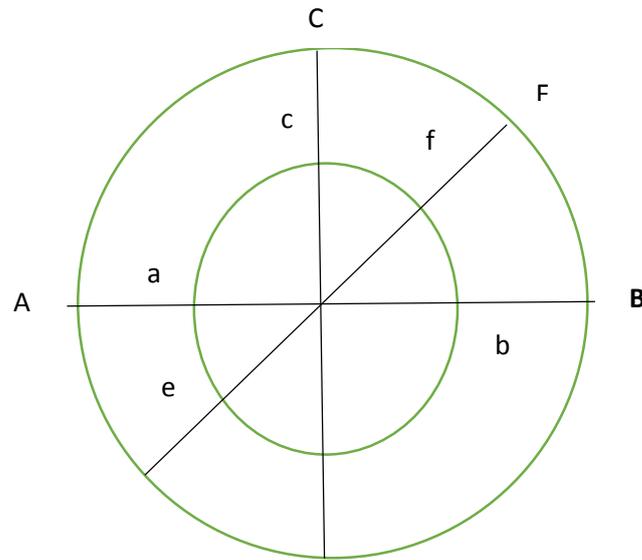
Celupkan kapas lidi steril ke dalam suspensi bakteri dan tekan pada dinding tabung agar tidak terlalu basah dan oleskan pada permukaan media *TSA* pada setiap cawan petri yang tersedia secara merata. Lakukan perlubangan atau sumuran pada setiap *cawan petri* sebanyak 5 sumuran dengan diameter sumuran adalah 6 mm dengan kedalaman tergantung tebal dan tipis media, biasanya 3 mm.

5. Uji daya antibakteri

Uji daya antibakteri pada penelitian ini menggunakan metode difusi dengan teknik sumuran. Ekstrak daun pare (*Momordica charantia*) yang telah dibuat dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% masing-masing diteteskan ke dalam lubang sumuran sebanyak 50 µl untuk setiap lubang. *Kalsium Hidroksida* ($Ca(OH)_2$) 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 membentuk 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 (Iravati, 2003).



Gambar 1. Cara Pengukuran Zona Radikal

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

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

Keterangan :

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

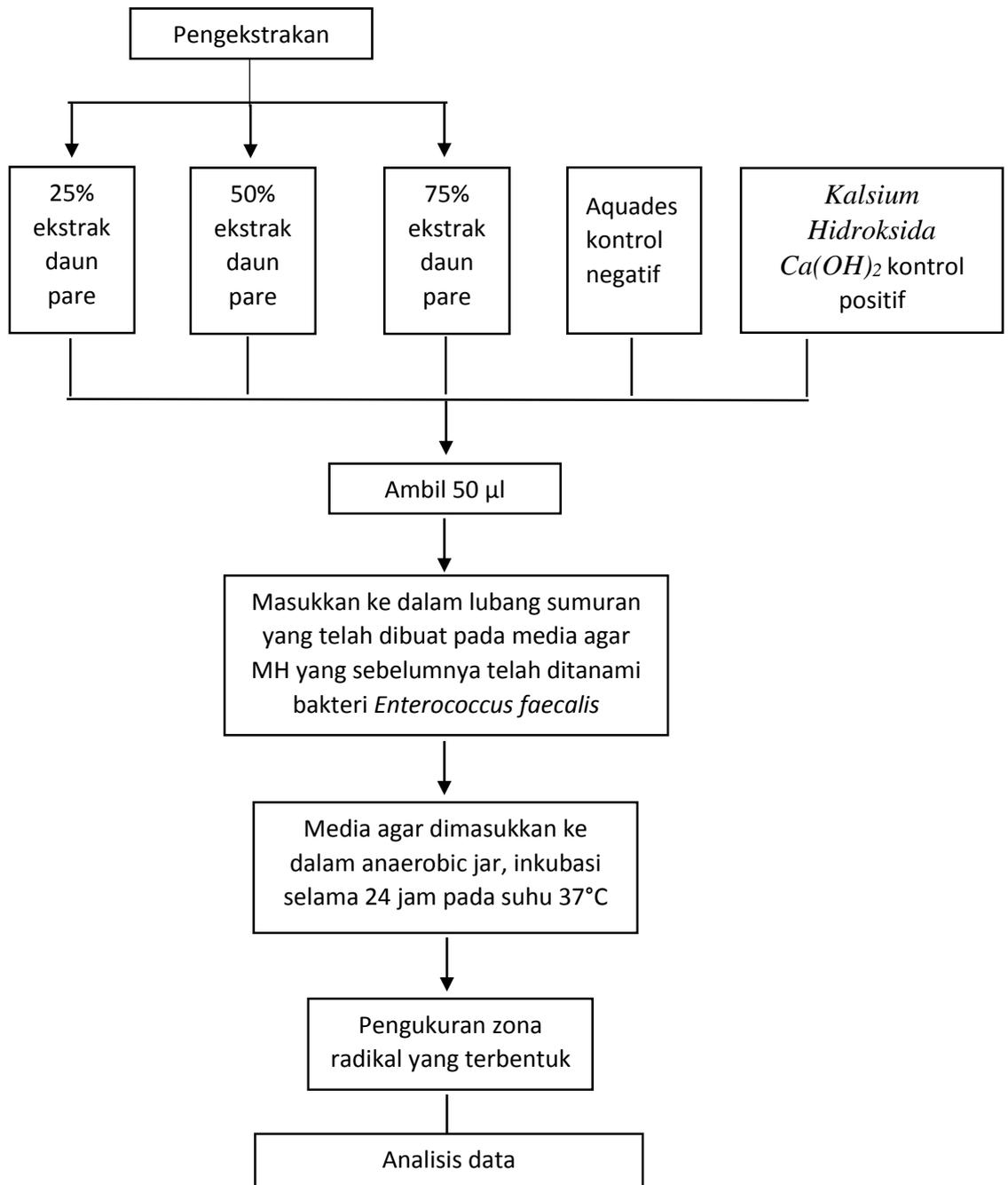
Garis ab, cd dan ef : diameter lubang sumuran.

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 yang didapatkan tidak homogen maka dilakukan uji hipotesis dengan *Kruskal wallis*.

I. Alur Penelitian



Gambar 2. Skema Jalannya Penelitian

