

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

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

Desain penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris In Vitro.

##### **B. Populasi dan Sampel Penelitian**

Subyek pada penelitian ini yaitu bakteri *Enterococcus faecalis* yang diperoleh dari hasil biakan murni laboratorium mikrobiologi Yogyakarta dan ekstrak buah kapulaga (*Amomum compactum*) dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 70% . Sampel penelitian berjumlah 6 buah cawan petri dengan masing masing diberi sumuran sebanyak 5 lubang yang akan ditetesi dengan sodium hipoklorit sebagai kontrol positif, aquades steril sebagai kontrol negatif, ekstrak buah kapulaga 25%, ekstrak buah kapulaga 50%, dan ekstrak buah kapulaga 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

### C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak buah kapulaga (*Amomum compactum*) dilakukan di Laboraturium Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian uji daya antibakteri ekstrak buah kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dilakukan di Laboraturium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

### D. Variabel Penelitian

#### 1. Variabel pengaruh

Ekstrak buah kapulaga dengan konsentrasi 10%, 20%, 40% dan 80%.

#### 2. Variabel terpengaruh

Zona pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media *Mueller Hinton Agar*.

#### 3. Variabel terkendali

- a. Bakteri *Enterococcus faecalis*
- b. Konsentrasi suspensi bakteri  $10^8$  CFU/ml
- c. Suhu inkubator  $37^{\circ}$  C
- d. Lama inkubasi 24 jam
- e. Ekstrak buah kapulaga dengan konsentrasi 10%, 20%, 40% dan 80%
- f. Volume larutan uji 5ml secara keseluruhan
- g. Volume larutan pada tiap sumuran 50  $\mu$ l
- h. Diameter sumuran yakni 6 mm
- i. Larutan etanol 70%

- j. Jenis media kultur bakteri HMA
  - k. Kedalaman medium pada cawan petri yakni 3 mm
  - l. Cara meneteskan larutan dengan mikropipet
  - m. Cara mengolesi bakteri dengan metode apus di seluruh permukaan agar
  - n. Alat untuk mengolesi bakteri yakni lada steril
4. Variabel tak terkendali
- a. Sterilisasi ruang laboratorium
  - b. Penyebaran bakteri pada cawan petri

#### **E. Definisi operasional**

1. 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.
2. Daya antibakteri ialah kemampuan suatu bahan dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan dan perbanyakkan diri dari bakteri.
3. Ekstrak buah kapulaga (*Amomum compactum*) merupakan sediaan pekat yang diproses menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan konsentrasi 25%, 50%, 75%.
4. Maserasi adalah proses perendaman simplisia yang sudah halus atau berbentuk serbuk dalam pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel sehingga zat-zat akan melarut.
5. Zona radikal adalah area jernih yang memberikan gambaran adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme.

6. Metode difusi adalah uji kepekaan bakteri dengan cara membuat 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 alat
- b. Lampu spiritus untuk sterilisasi
- c. Ose steril untuk mengambil koloni bakteri
- d. Almari penyimpanan untuk menyimpan media
- e. Mikropipet untuk mengambil cairan
- f. Tabung erlenmeyer untuk wadah larutan
- g. Magnetic stirer untuk alat pengaduk
- h. Neraca timbangan untuk menakar media
- i. Inkubator digunakan untuk menginkubasi koloni
- j. Mesin penggiling untuk membuat serbuk
- k. Oven untuk mengeringkan buah kapulaga
- l. Anaerobic jar untuk menciptakan suasana anaerob bagi bakteri *Enterococcus faecalis*
- m. Cawan petri untuk media tumbuh koloni bakteri
- n. Corong *buchner* digunakan untuk memisahkan filtrat dengan residu
- o. Jangka sorong
- p. Mikropipet untuk mengambil cairan

- q. Vacuum rotary evaporation untuk menguapkan ekstrak buah kapulaga
- r. Waterbath
- s. Kapas lidi steril untuk mengoleskan bakteri pada TSA
- t. Pipet ukur untuk mengambil larutan induk aquades

## 2. Bahan Penelitian

- a. Ekstrak buah kapulaga
- b. Larutan etanol 70%
- c. Bakteri *Enterococcus faecalis*
- d. Aquades steril sebagai kontrol negatif
- e. Sodium hipoklorit sebagai kontrol positif
- f. Media HMA

## G. Jalannya Penelitian

### 1. Pembuatan ekstrak buah kapulaga

Buah kapulaga dicuci bersih dan dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dalam almari pengering dengan suhu 60-70°C selama 24 jam. Setelah kering potongan buah kapulaga digiling dengan menggunakan blender hingga menghasilkan serbuk buah kapulaga. Serbuk lalu diekstraksi dengan cara maserasi yaitu serbuk kering dimasukkan ke dalam toples yang berisi etanol 70% sambil diaduk dua kali sehari dengan lama pengadukan minimal 30 menit lalu didiamkan minimal 24 jam. Lakukan hal tersebut selama 5-7 hari. Hasilnya disaring menggunakan corong buchner sehingga diperoleh filtrat. Filtrat dievaporasi menggunakan waterbath kemudian dilanjutkan dengan menggunakan vacuum rotary pada suhu 60-70°C

sehingga didapatkan hasil berupa ekstrak kental dari buah kapulaga. Ekstrak kental tersebut selanjutnya diuapkan menggunakan waterbath sehingga didapatlah ekstrak kering. Ekstrak buah kapulaga kering tersebut kemudian diencerkan sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan yaitu 25%, 50%, dan 70%.

## 2. Sterilisasi Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Peralatan yang disterilkan yaitu erlenmeyer, petri disk, gelas ukur, perforator, media HMA, BHI dan tabung reaksi.

## 3. Pembuatan Suspensi bakteri *Enterococcus faecalis*

Suspensi bakteri dibuat sesuai dengan standar Brown III  $10^8$  CFU/ml. Pembuatan suspensi dimulai dengan mengambil beberapa ose bakteri *Enterococcus faecalis* menggunakan ose steril lalu dimasukkan ke dalam 1 ml NaCl. Larutan NaCl yang telah dicampur bakteri selanjutnya dimasukkan ke dalam 9 ml media cair BHI sehingga sesuai dengan standar konsentrasi  $10^8$  CFU/ml.

## 4. Inokulasi Suspensi Bakteri pada Media Agar

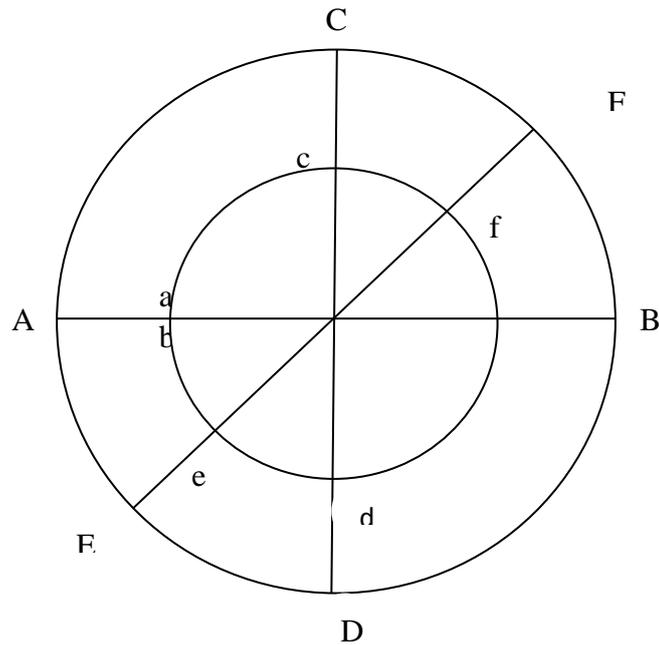
Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri dan tekan pada dinding tabung agar tidak terlalu basah lalu oleskan pada media HMA pada setiap cawan petri yang ada secara merata. Buatlah sumuran pada setiap cawan petri sebanyak 6 sumuran dengan diameter 6 mm dan kedalaman 3 mm.

## 5. Uji Daya Antibakteri

Metode yang digunakan untuk uji daya antibakteri pada penelitian ini adalah metode difusi dengan teknik sumuran. Ekstrak buah kapulaga yang telah dibuat dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 70% masing-masing diteteskan ke dalam tiap sumuran sebanyak 50 ml. NaOCl sebagai kontrol positif dan aquades sebagai kontrol negatif diteteskan juga dalam jumlah yang sama. Cawan petri yang sudah ditetesi kemudian dimasukkan ke dalam anaerobic jar lalu dilanjutkan dengan proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C sesuai Standar Nasional Indonesia tentang cara uji mikrobiologi, supaya terjadi kolonisasi 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 (Iavati, 2003)



*Gambar 2. Cara pengukuran zona radikal*

Rumus pengukuran zona radikal untuk satu sumuran (Irvati, 2003)

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

Keterangan:

Garis AB, CD, EF : diameter daerah hambat yang terbentuk

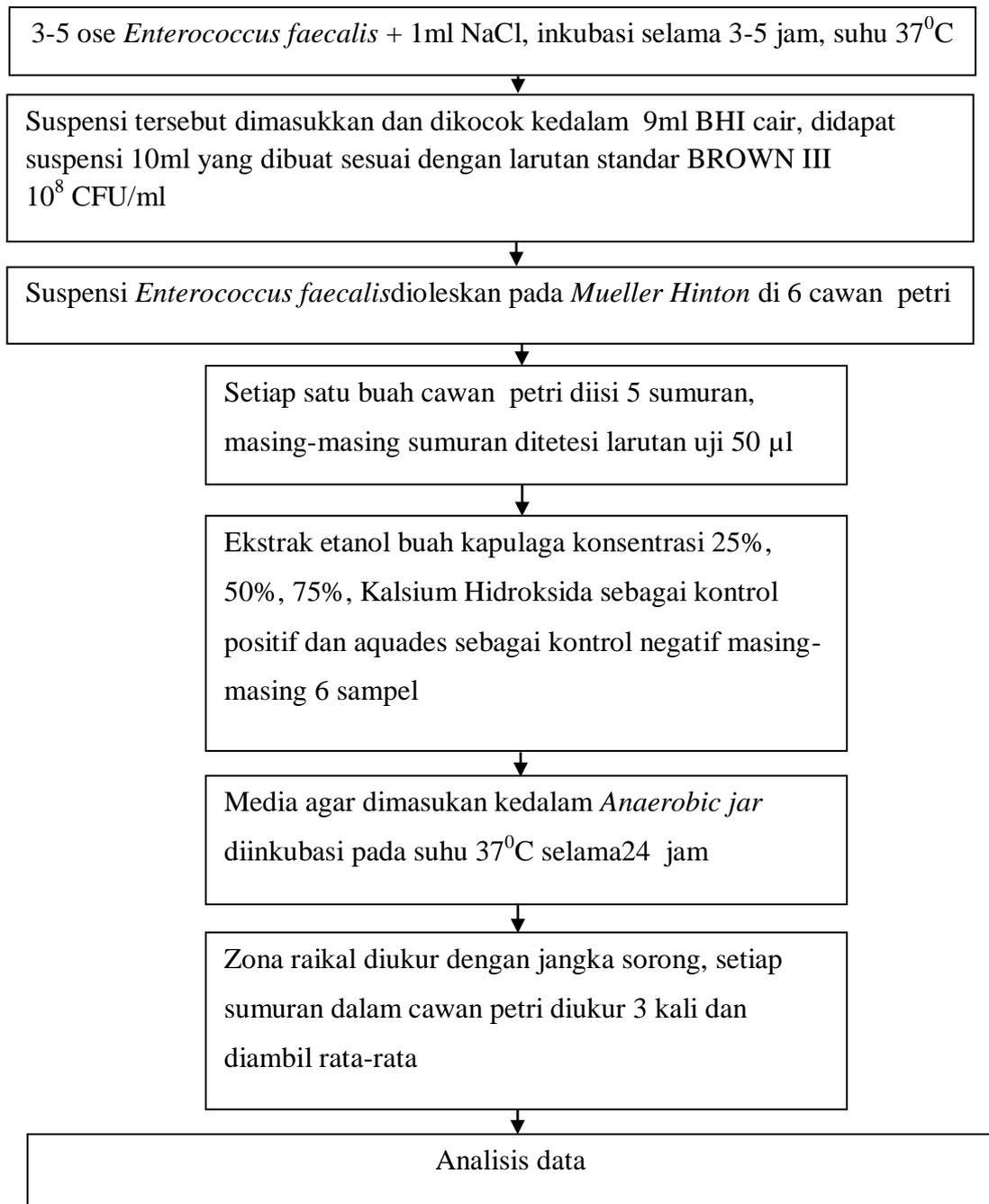
Garis ab, cd, ef : diameter lubang sumuran

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

### I. Alur Penelitian



Gambar 3. Skema Uji Daya Antibakteri

