

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true experimental post test only control group design*, dengan fokus penelitian pada keadaan koloni bakteri *Enterococcus faecalis* yang ditunjukkan setelah perlakuan pemberian obat sterilisasi saluran akar *Cresophene* dan ChKM secara *in vitro*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan efektivitas obat sterilisasi saluran akar *Cresophene* dan ChKM terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis* dengan metode difusi cakram.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan September 2014 sampai Oktober 2014.

4.3 Sampel

Sampel yang dipergunakan di dalam penelitian ini adalah bakteri *Enterococcus faecalis* yang dibeli dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

4.3.1 Estimasi Jumlah Pengulangan

Jumlah pengulangan penelitian yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Solimun, 2001):

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan 3 macam perlakuan, yaitu *Cresophene*, ChKM, dan akuades sebagai kontrol negatif, maka :

$$p(n-1) \cong 15$$

$$3(n-1) \cong 15$$

$$3n - 3 \cong 15$$

$$3n \cong 18$$

$$n \cong 6$$

Jadi pada penelitian ini masing-masing perlakuan dilakukan 6 kali pengulangan.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah diameter zona hambat yang terbentuk dalam satuan milimeter dengan menggunakan kaliper.

4.4.2 Variabel Bebas

Obat sterilisasi saluran akar yang sudah tersedia di pasaran, yaitu *Cresophene* dan ChKM.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

4.5.1.1 Alat untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. Gelas Objek
2. Ose

3. Pembakar spiritus

4.5.1.2 Alat untuk Tes Katalase

1. Gelas Objek
2. Pipet
3. Tabung reaksi

4.5.1.3 Alat untuk Tes Toleransi Garam (*Salt Tolerance Test*)

1. Tabung reaksi
2. Pipet

4.5.1.4 Alat untuk Tes Biokimia

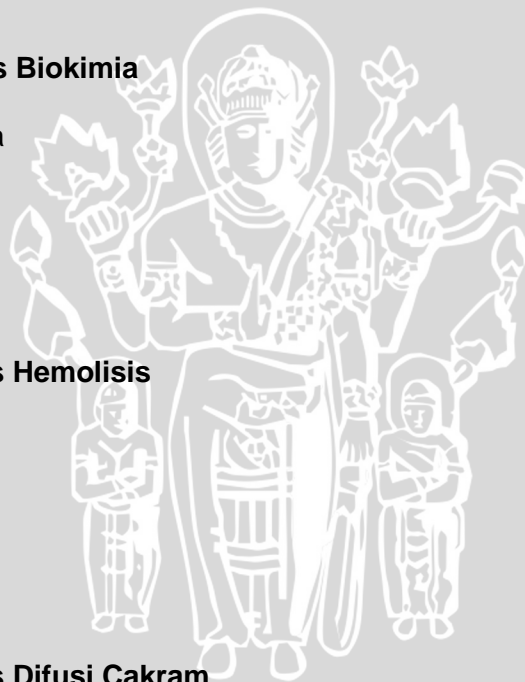
1. Sumur uji biokimia
2. Mikropipet
3. Ose

4.5.1.5 Alat untuk Tes Hemolisis

1. Ose
2. Inkubator
3. Pembakar spiritus

4.5.1.6 Alat untuk Tes Difusi Cakram

1. Tabung reaksi
2. Cawan petri
3. Mikropipet
4. Inkubator
5. Pinset steril
6. Kaliper dengan ketelitian 0,05 mm



4.5.2 Bahan

4.5.2.1 Bahan untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. Pewarnaan gram (kristal, violet, lugol, alkohol 96%, safranin)
2. Biakan bakteri *Enterococcus faecalis*

4.5.2.2 Bahan untuk Tes Katalase

1. Perbenihan cair
2. H₂O₂ 3%
3. Biakan bakteri *Enterococcus faecalis*

4.5.2.3 Bahan untuk Tes Toleransi Garam (*Salt Tolerance Test*)

1. NaCl
2. BHIB (*Brain Heart Infusion Brooth*)
3. Biakan bakteri *Enterococcus faecalis*

4.5.2.4 Bahan untuk Tes Biokimia

1. Reagen biokimia (L-arabinose, arginine dihidrolase, manitol)
2. *Normal saline* (NaCl 0,9%)
3. Akuades
4. Biakan bakteri *Enterococcus faecalis*

4.5.2.5 Bahan untuk Tes Hemolisis

1. *Blood Agar Plate* (BAP)
2. Biakan bakteri *Enterococcus faecalis*

4.5.2.6 Bahan untuk Tes Difusi Cakram (Uji Efektivitas *Cresophene* dan ChKM)

1. *Creshopene*
2. ChKM
3. Akuades steril
4. BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*)
5. Kultur bakteri *Enterococcus faecalis*
6. *Blank disk*

4.6 Definisi Operasional

1. Daya antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona hambat. Zona hambat menunjukkan kemampuan suatu bahan dalam menghambat pertumbuhan bakteri, yang dalam penelitian ini ditandai dengan adanya daerah jernih di sekitar *blank disk*. Diameter zona hambat diukur dengan menggunakan kaliper dalam satuan mm.
2. *Cresophene* merupakan salah satu obat sterilisasi saluran akar dengan kandungan paraklorofenol, timol, deksametason, dan kamfer.
3. ChKM merupakan salah satu obat sterilisasi saluran akar dengan kandungan paraklorofenol, kamfer, dan mentol.
4. Akuades merupakan larutan kontrol negatif yang digunakan sebagai pembanding.
5. *Enterococcus faecalis* merupakan salah satu jenis bakteri gram positif bentuk kokus yang sedikit lonjong (ovoid) yang sering di temukan pada nekrosis pulpa.

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari prosedur identifikasi bakteri *Enterococcus faecalis* (pewarnaan gram, tes katalase, tes toleransi garam, tes biokimia, dan tes hemolisis) dan dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri *Cresophene* dan ChKM terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*, serta dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambatan (difusi cakram).

4.7.1 Tes Identifikasi Bakteri

4.7.1.1 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. Dibuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan udara.
2. Sesudah kering difiksasi di atas api bunsen.
3. Sediaan dituangi kristal violet selama 1 menit.
4. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
5. Sediaan dituangi lugol selama 1 menit.
6. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik.
8. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
9. Sediaan dituangi safranin selama 0,5 menit.
10. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
11. Dikeringkan dengan kertas penghisap.
12. Diamati dengan mikroskop pembesaran 100-400x dengan intensitas sinar rendah.
13. Hasil untuk *Enterococcus faecalis* adalah berbentuk kokus sedikit lonjong (ovoid) dan Gram positif.

4.7.1.2 Tes Katalase

1. Sediakan pembenihan cair bakteri pada gelas objek.
2. Kemudian sediaan tersebut ditetesi larutan H₂O₂ 3%.
3. Diamati ada tidaknya gelembung udara yang terjadi.
4. Hasil untuk *Enterococcus faecalis* adalah katalase negatif (tidak terjadi gelembung udara).

4.7.1.3 Tes Toleransi Garam (*Salt Tolerance Test*)

1. Campurkan NaCl dengan BHIB, hingga terbentuk konsentrasi 6,5%.
2. Masukkan 1-2 koloni dari kultur selama 18-24 jam ke larutan NaCl 6,5%.
3. Masukkan ke dalam inkubator dengan suhu 35°C selama 48 jam.
4. Periksa dan amati untuk pertumbuhan bakteri hingga maksimal 48 jam.
5. Hasil untuk *Enterococcus faecalis* adalah terlihat kekeruhan dalam larutan dengan atau tanpa perubahan warna dari ungu menjadi kuning (Forbes, 2007).

4.7.1.4 Tes Biokimia

1. Ambil 5 koloni terpisah dari biakan *Enterococcus faecalis* yang masih berusia 18-24 jam kemudian larutkan dalam 1 cc *normal saline*.
2. Masukkan reagen L-arabinose, arginin dihidrolase dan manitol masing-masing sebanyak 100 µl pada sumur uji biokimia yang berbeda. Buat dua sumur untuk setiap satu reagen.
3. Ambil 100 µl larutan koloni *Enterococcus faecalis* dengan menggunakan mikropipet, lalu masukkan ke satu sumur berisi reagen L-arabinose, satu sumur berisi arginin dihidrolase dan satu sumur berisi manitol.

4. Ambil 100 µl akuades dengan menggunakan mikropipet, lalu masukkan ke satu sumur berisi reagen L-arabinose, satu sumur berisi arginin dihidrolase dan satu sumur berisi manitol. Sumur berisi akuades berlaku sebagai kontrol.
5. Amati perubahan yang terjadi pada sumur yang diisi dengan larutan koloni.
6. Bakteri *Enterococcus faecalis* akan menunjukkan hasil tes positif terhadap arginin dihidrolase dan manitol, serta hasil tes negatif terhadap L-arabinose (Manero, 1999).

4.7.1.5 Tes Hemolisis

1. Melakukan *streaking* pada *Blood Agar Plate* (BAP).
2. Dengan ose steril, spesimen ditanam di media agar darah.
3. Inkubasi di inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
4. Amati perubahan warna yang terjadi.
5. *Enterococcus faecalis* adalah hemolisis positif muncul sebagai adanya zona berwarna kehijauan (hemolisis alfa) sampai hampir transparan (hemolisis beta) (Triyana, 2013).

4.7.2 Prosedur Uji Antimikroba

4.7.2.1 Cara Pembuatan Sampel

Untuk pembuatan sampel dan bahan yang akan diuji adalah sebagai berikut:

1. Media yang dibutuhkan untuk pembiakan *Enterococcus faecalis* adalah media agar darah.
2. Satu *blank disk* dengan media agar darah dibagi menjadi tiga bagian yang sama besar. Cara membagi cawan petri menjadi tiga bagian adalah dengan

membalik cawan petri tersebut kemudian bagian belakang cawan petri diberi tanda garis dengan menggunakan spidol.

Untuk menumbuhkan *Enterococcus faecalis* pada media agar darah dilakukan tahap sebagai berikut:

1. Strain bakteri *Enterococcus faecalis* dibeli dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Yogyakarta dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB).
2. *Enterococcus faecalis* yang telah diidentifikasi, dibiakkan pada medium cair dengan menggunakan *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dan disimpan dalam *anaerobic jar* selama 24 jam pada suhu 37°C.
3. Lalu *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) berisi bakteri dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer kemudian diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda = 625 \text{ nm}$. Dari hasil yang diperoleh (OD=1) sebanding dengan $1 \times 10^9 \text{ CFU/ml}$ (Murray, 1999).
4. Dari hasil pengenceran itu, bakteri diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 1 cc dan ditetaskan ke dalam cawan petri yang telah berisi media agar darah dan diratakan dengan ose.

4.7.2.2 Cara Perlakuan Sampel

Metode zona hambatan mempergunakan *blank disk* berbentuk lingkaran kemudian sampel diletakkan di atasnya. Terdapatnya pori-pori pada *blank disk* maka sampel yang diletakkan di atasnya akan berdifusi pada media pertumbuhan bakteri.

Disiapkan enam cawan petri yang berisi *Enterococcus faecalis* dalam media agar darah dengan bahan uji *Cresophene*, ChKM, dan akuades steril (kontrol) dalam masing-masing cawan petri dengan tahapan sebagai berikut :

1. Siapkan isolat bakteri *Enterococcus faecalis*.
2. Siapkan enam cawan petri yang telah berisi media agar darah dan bakteri *Enterococcus faecalis*.
3. Siapkan *Cresophene*, ChKM dan akuades pada *blank disk*. *Cresophene* dan ChKM diambil menggunakan mikropipet sampai jenuh ($\pm 20-40 \mu\text{l}$) dan diteteskan pada *blank disk*. Kemudian pada sisi bagian kontrol ditetesi akuades steril sampai jenuh ($\pm 20-40 \mu\text{l}$).
4. Dilakukan uji sensitivitas dengan cara :
 - a. Melakukan *full streaking* pada agar darah yang telah dibagi menjadi tiga bagian.
 - b. Mengambil *blank disk* dengan pinset steril, kemudian diletakkan di tengah area evaluasi.
5. Setelah diaplikasikan pada seluruh media agar darah, kemudian seluruh sampel dimasukkan ke dalam *anaerobic jar* dan diinkubasi ke dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C .

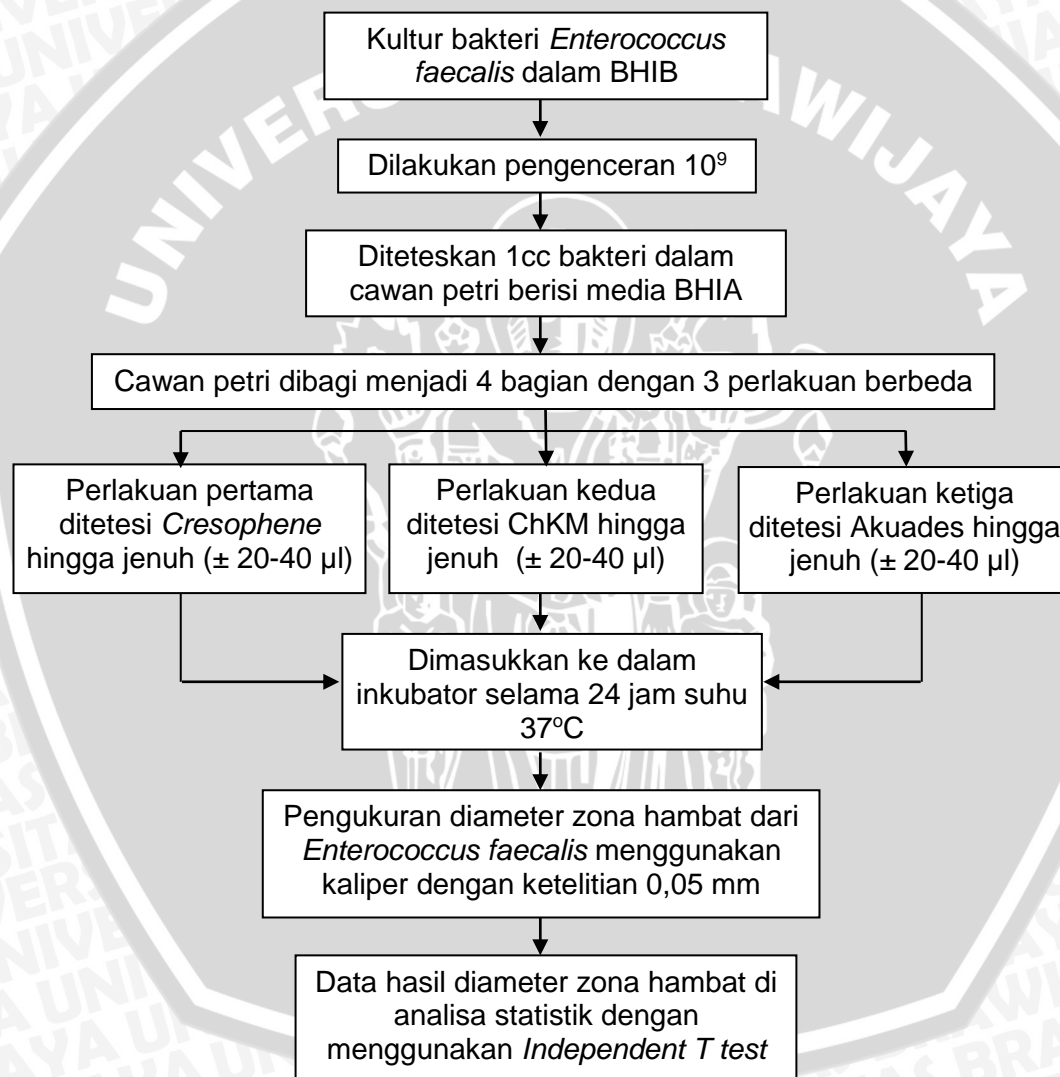
Untuk mengetahui daya antibakteri masing-masing bahan, parameter yang digunakan adalah diameter zona hambatan yang dihasilkan, yaitu dengan cara mengukur diameter zona yang bebas bakteri pada masing-masing *blank disk* pada cawan petri.

4.7.3 Pengamatan dan Pengukuran

Bahan yang diletakkan pada *blank disk* tersebut akan memberikan suatu zona bebas bakteri mengelilingi lempeng kertas dimana diameternya tergantung pada kekuatan sampel dalam menghambat bakteri, semakin luas zona yang ditimbulkan maka akan semakin kuat pula daya hambat sampel terhadap pertumbuhan bakteri. Zona hambat yang dihasilkan mempunyai bentuk lingkaran

dan diukur menggunakan kaliper dengan ketelitian 0,05 satuan millimeter (mm). Pengukuran diameter zona hambat dilakukan sebanyak empat kali (arah vertikal, horizontal dan dua arah diagonal) dan di hitung rata-ratanya. Diameter diukur dari batas teratas atau terluar dan zona hambat dari satu sisi ke sisi lainnya.

4.8 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian

4.9 Skema Data Hasil Penelitian

Tabel 4.1 Skema Data Hasil Penelitian *Cresophene* dan ChKM

Pengulangan	Kontrol Negatif (Akuades)	<i>Cresophene</i>	ChKM
1	... mm	... mm	... mm
2	... mm	... mm	... mm
3	... mm	... mm	... mm
4	... mm	... mm	... mm
5	... mm	... mm	... mm
6	... mm	... mm	... mm

4.10 Analisis Data

Hasil pengukuran yang diperoleh diuji dengan *Independent T test*. Diperlukan pemenuhan syarat untuk *Independent T test* yaitu distribusi data harus normal dan varians data harus sama. Uji normalitas digunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Data yang berdistribusi normal dapat dilakukan *Independent T test* dan akan menunjukkan perbedaan signifikansi jika terdapat $p < 0,05$.