

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian yang digunakan adalah *True Experimental* dengan metode *Posttest Only Control Group Design* sebagai rancangan penelitian yang bertujuan untuk untuk menilai efek perlakuan dengan membandingkan hasil antara kedua kelompok, sehingga memungkinkan peneliti untuk menentukan pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diteliti (Heryani, 2016). Bentuk rancangan pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 3
Desain Penelitian *Posttest Only Control Group Design*

	Group	Variabel Terikat	Posttest
R1	Group Ekesperimen	X	O1
R2	Group Kontrol	Kontrol	O2

Keterangan :

- R1 (*Random 1*) : Kelompok eksperimen dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol bunga hortensia (*Hydrangea macrophylla*) kosentrasi 5%, 10%, 20% dan 40%
- R2 (*Random 2*) : Kelompok kontrol dalam penelitian ini berupa kontrol positif adalah *Ampicillin* dan kontrol negatif adalah etanol 96%
- X (*Exposure*) : Perlakuan (Intervensi)
- O2 (*Observasi*) : Diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*

B. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar dan Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis serta Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2024 hingga bulan April 2025.

D. Unit Analisis dan Kriteria Sampel

1. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah zona hambat yang muncul sebagai respon adanya pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol bunga hortensia (*Hydrangea macrophylla*) yaitu konsentrasi 5%, 10%, 20 dan 40% dengan konsentrasi pelarut etanol 96%.

2. Sampel penelitian

Sampel yang akan diuji pada penelitian ini adalah bunga hortensia (*Hydrangea macrophylla*) yang dipilih menurut kriteria inklusi yang telah ditetapkan peneliti.

3. Kriteria sampel

a. Kriteria sampel

- 1) Kriteria Inklusi Sampel dari penelitian ini sampel bunga hortensia (*Hydrangea macrophylla*) yang sudah mekar, bunga yang segar dan berwarna biru.



(Sumber : Dokumentasi pribadi, 2024)

Gambar 6. Kriteria Inklusi Sampel Bunga Hortensia

- 2) Kriteria Eksklusi yaitu bunga hortensia (*Hydrangea macrophylla*) yang berwarna kecoklatan dan layu tidak dengan kriteria yang ditentukan peneliti.

4. Teknik pengambilan sampel

a. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : pisau, blender, botol gelap, botol urine, corong kaca, erlemeyer, batang pengaduk, tabung reaksi, Labu alas bulat, *rotary evaporator*, rak tabung reaksi, *hot plate*, *magnetic stirrer*, erlenmeyer 250ml, *Ph paper*, cawan petri, *autoclave*, neraca analitik, oven, *refrigerator*, pinset, inkubator, *ose steril disposable*, UV BSC, vortex, Mcfarland biosan, mikropipet 20-100 µl, jangka sorong, bunsen, korek api, labu alas bulat gelas ukur dan *anaerobic jar*.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak bunga hortensia (*Hydrangea macrophylla*), etanol 96%, biakan bakteri *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *tissue*, blank *disc*, cakram *Ampicillin*, aluminium foil, kertas saring, kapas berlemak, plastik *polypropylene* laboratorium, kertas buram, spidol, *cotton swab*, MHA (*Muller Hinton Agar*), aquadest steril, NaCl Fisiologis 0,9%, standar 0,5% McFarland dan *yellow tip*.

c. Prosedur Kerja

1) Tahap pra-analitik

a) Penggunaan APD

Penerapan penggunaan alat pelindung diri (APD) terlebih dahulu. Cuci tangan menggunakan sabun dan air mengalir sebelum mengenakan APD. Adapun APD yang digunakan sebagai penunjang selama melakukan penelitian di laboratorium yaitu jas laboratorium, masker, *nurse cap* dan *handscoon*. Setelah menggunakan APD, disinfeksi pada area kerja yang akan digunakan selama penelitian dengan menggunakan alkohol 70%.

b) Pembuatan simplisia

Sampel yang digunakan adalah bunga hortensia (*Hydrangea macrophylla*).

- (1) Sampel dipilah sesuai dengan kriteria peneliti dan dicuci hingga bersih.
- (2) Pisahkan bunga dengan batang dan daunnya
- (3) Selanjutnya, bunga diletakkan di atas nampan di ruangan terbuka tidak terpapar sinar matahari langsung. Bunga dikeringkan secara alami dengan bantuan hembusan angin. Setelah bunga setengah kering, bunga di oven selama 2 jam dengan suhu 60°C

- (4) Setelah benar – benar kering, bunga hortensia diblender hingga menjadi serbuk halus disebut simplisia (Amanda and Raharjo, 2022). Selanjutnya, simplisia ditimbang.

c) Proses ekstraksi dengan metode maserasi dan evaporasi

Metode ekstraksi secara maserasi dengan pelarut etanol 96% yang nanti hasilnya akan disaring untuk memisahkan filtrat dan residunya. Kemudian filtrat akan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 45°C sampai didapatkan ekstrak kental.

- (1) Proses Maserasi : dengan pembuatan rendaman simplisia dengan perbandingan 1:10 (Issusilaningtyas dkk., 2023). Perbandingan yakni 2.000 ml pelarut etanol 96% kemudian dimasukkan ke dalam toples kaca gelap maserasi dengan menampung 200 gram simplisia.
- (2) Wadah simplisia ditutup dengan aluminium foil dibiarkan selama 3x24 jam dijauhkan dari sinar matahari.
- (3) Rendaman setelah 3 hari, hasil maserasi di saring menggunakan kertas saring hingga mendapatkan filtrat ekstraknya dan filtrat ditampung dalam erlenmeyer.
- (4) Selanjutnya, sisanya dimaserasi kembali dengan etanol 96% sebanyak 1.000 ml pada suhu kamar yang terlindung dengan cahaya selama 3 hari.
- (5) Setelah 3 hari, hasil maserasi di saring menggunakan kertas saring hingga mendapatkan filtrat ekstraknya dan filtrat digabung ditampung dalam erlenmeyer. Dimaserasi ulang selama 3 hari hingga menghasilkan 3 ekstrak.
- (6) Hasil maserasi ditampung di labu bundar. Lalu dipekatkan dengan metode evaporasi.
- (7) Evaporasi dengan uapkan menggunakan evaporator pada suhu 40-60°C sampai

mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak yang didapat kemudian ditampung pada botol urine kemudian ditimbang massa total dengan neraca analitik lalu disimpan pada *refrigerator*.

d) Preparasi media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Uji sensitivitas kepekaan bakteri dilakukan dengan pembuatan stok media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang diletakkan dalam cawan petri kemudian diinokulasi sebagai media nutrisi dan kultur pada bakteri *Streptococcus pyogenes*. Preparasi media berdasarkan (Ayen, Rahmawati dan Mukarlina, 2017) :

- (1) Dengan menggunakan neraca analitik, 5,415 gram media MHA ditimbang. Timbang dengan berat yang sama untuk dimasukkan pada 2 buah Erlenmeyer. Selanjutnya dipindahkan dalam erlenmeyer dan dilarutkan 142,5 mililiter aquadest pada masing-masing erlenmeyer.
- (2) Media dipanaskan di hotplate dan homogenkan dengan magnetic stirrer hingga serbuk benar-benar larut sepenuhnya. Ukur pH media dengan pH stick.
- (3) Selanjutnya, tutup media dengan aluminium foil dan kapas lemak. Sterilisasi media pada autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° celcius.
- (4) Media MHA yang telah disterilisasi, didiamkan sampai agak hangat dengan perkiraan suhu sekitar $\pm 40 - 50^{\circ}\text{C}$.
- (5) Kemudian, tambahkan darah sebanyak 7,5 ml pada masing-masing media MHA lalu homogenkan secara perlahan.
- (6) Setelah sterilisasi selesai, keluarkan media dari autoklaf dan tunggu hingga suhunya menurun. Sebanyak 25,4 ml media dituang secara aseptis ke dalam masing-masing cawan petri berdiameter 90 mm dengan ketebalan media 4 mm. Kemudian, tunggu hingga memadat. Apabila media yang sudah dituangkan

tidak langsung digunakan, maka cawan petri disimpan didalam *refrigerator*.

e) Peremajaan bakteri

- (1) Sebanyak 1 ose bakteri uji *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 diambil dari biakan murni.
- (2) Inokulasikan dengan cara digoreskan 4 kuadran pada medium MHA (*Mueller-Hinton Agar*) selanjutnya diinkubasi pada anaerobic jar di inkubator selama 1x24 jam (Isnaeni, Rasyid dan Rahmawati, 2021).

f) Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol bunga hortensia (*Hydrangea macrophylla*)

- (1) Ekstrak etanol bunga hortensia akan dibuat dengan konsentrasi 5%, 10%, 20% dan 40%. Setiap konsentrasi dibuat dengan menimbang dan mengencerkan ekstrak bunga hortensia (dengan konsentrasi 100%) dengan 2 ml etanol 96%.
- (2) Untuk mengencerkan, variasi konsentrasi ekstrak etanol bunga hortensia dihitung dengan persentase konsentrasi :

$$\% = \frac{b \times 100}{v}$$

Keterangan :

% : variasi konsentrasi (%)

b : masa ekstrak etanol bunga hortensia (100%)

v : yaitu volume pelarut/pengencer (etanol 96%)

- (3) Perbandingan antara masing-masing konsentrasi ekstrak pekat dan pelarut etanol 96% ditunjukkan di bawah ini :

Tabel 4
Perbandingan Konsentrasi Ekstrak

Konsentrasi	Berat Ekstrak (g)	Volume Etanol (ml)
5%	0.1 gram	2 ml
10%	0.2 gram	2 ml
20%	0.4 gram	2 ml
40%	0.8 gram	2 ml

- (4) Perbandingan berat ekstrak (g) masing-masing konsentrasi ditimbang dengan neraca analitik selanjutnya diletakkan pada masing-masing tabung reaksi.
- (5) Tambahkan masing-masing konsentrasi dengan etanol 96% sebanyak 2 ml.
- (6) Tutup permukaan tabung kemudian homogenkan menggunakan vortex mixer.

g) Preparasi *disc*

- (1) Siapkan 15 *blank disc* steril dengan diameter 6 mm dan 3 cakram antibiotik
- (2) Letakkan 3 *blank disc* steril masing-masing konsentrasi 5%, 10%, 20%, 40% dan kontrol negatif serta 3 *disc* antibiotik dengan menggunakan pinset steril pada cawan petri steril.
- (3) Cawan petri I : konsentrasi 5% berisi 3 *blank disc* steril dalam 1 cawan petri
Cawan petri II : konsentrasi 10% berisi 3 *blank disc* steril dalam 1 cawan petri
Cawan petri III : konsentrasi 20% berisi 3 *blank disc* steril dalam 1 cawan petri
Cawan petri IV : konsentrasi 40% berisi 3 *blank disc* steril dalam 1 cawan petri
Cawan petri V : Kontrol negatif berisi 3 *blank disc* steril dalam 1 cawan petri
Cawan petri VI : Kontrol positif berisi 3 *disc* antibiotik dalam 1 cawan petri
- (4) Dilanjutkan dengan penjujukan ekstrak pada masing-masing *disc* konsentrasi dengan menggunakan pipet mikro sebanyak 20 µl.
- (5) Untuk kontrol negatif digunakan *blank disc* yang dijujukan dengan etanol 96% menggunakan pipet mikro sebanyak 20 µl.

- (6) Untuk kontrol positif digunakan cakram *Ampicillin* menggunakan 3 *disc* antibiotik.
- (7) Tunggu hingga *disc* konsentrasi dan disc kontrol negatif terdifusi sempurna pada cakram.

h) Pembuatan suspensi *Streptococcus pyogenes*

- (1) *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 dari biakan murni yang berusia 24 jam, dicuplik beberapa koloni menggunakan ose secara aseptis dan disuspensikan ke dalam 5 tabung berbeda yang masing-masing berisi 3 ml larutan NaCl Fisiologis 0,9% steril.
- (2) Suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* diamati kekeruhannya menggunakan McFarland standar 0,5.
- (3) Bandingkan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan McFarland standar 0,5.

i) Inokulasi bakteri

- (1) Pastikan cawan petri berada pada suhu ruang sebelum diinokulasi
- (2) Celupkan kapas steril (*cotton swab*) ke dalam suspensi bakteri 0,5 *McFarland* tersebut, lalu sebar menyeluruh di seluruh permukaan media MHA.
- (3) Putar cawan petri 60° dan ulangi proses swabbing sebanyak 3 kali untuk memastikan distribusi merata.
- (4) Cawan petri terinokulasi harus segera diletakkan cakram dalam waktu < 15 menit.

2) Tahap analitik

a) Uji peletakan *disc*

- (1) Dengan menggunakan pinset steril dan api bunsen, letakkan *disc* berisi ekstrak, *disc* antibiotik *ampicillin* dan *disc* yang sudah dijenuhkan etanol 96% masing-masing dalam 1 cawan petri yang sama pada permukaan media MHA yang telah diinokulasi bakteri.
- (2) Tekan perlahan setiap *disc* agar menempel sempurna pada agar.
- (3) Pastikan jarak antar cakram cukup ± 15 mm untuk menghindari tumpang tindih zona hambat yang akan terbentuk.
- (4) Balikan cawan petri dan pastikan *disc* tidak jatuh.
- (5) Inkubasi pada anaerobic jar dengan kadar CO₂ 5% selama 18 ± 2 jam pada suhu $35 \pm 1^\circ\text{C}$ dalam kondisi aerob.

3) Tahap pasca analitik

a) Pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri

- (1) Ukur diameter zona hambat adalah daerah tanpa pertumbuhan bakteri, diukur dari sisi ujung satu ke sisi ujung lainnya melalui tengah-tengah *disc*.
- (2) Kategorikan diameter menggunakan jangka sorong setelah diinkubasi selama 18 ± 2 jam.
- (3) Ukur skala utama dan skala nonius kemudia interpretasikan hasil pengukuran dalam satuan milimeter (mm).

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang digunakan adalah data primer dan data sekunder. Data primer adalah data diameter diperoleh langsung melalui percobaan di laboratorium, berupa pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk akibat pemberian ekstrak etanol bunga hortensia (*Hydrangea macrophylla*) dengan berbagai variasi konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Sedangkan data sekunder yang diperoleh dari penelitian ini berupa penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa ekstrak bunga hortensia (*Hydrangea macrophylla*) yang diisolasi dengan 2 senyawa turunan yaitu hidrangenol dan thunberginol dengan metode ekstraksi dan fraksinasi dengan metode kromatografi, analisis spektroskopi dan uji antibakteri senyawa isolat terhadap bakteri patogen : *Salmonella thypi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* mendapatkan hasil uji antibakteri lemah (MIC values were 31.25-125 µg/mL) (Agustini dkk., 2020).

2. Cara pengumpulan data

Pengumpulan data penelitian ini melalui observasi dan penelitian laboratorium dengan metode difusi cakram *Kirby Bauer*. Penggunaan jangka sorong sebagai alat ukur untuk mengukur diameter zona hambat yang terbentuk.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Hasil eksperimen pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol bunga hortensia (*Hydrangea macrophylla*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* yang diinterpretasikan dalam skala satuan mm (millimeter) kemudian dilakukan

pengolahan data menggunakan teknik secara tabulating data sehingga data disajikan dalam bentuk tabel yang berisi naratif.

2. Analisis data

Analisis kuantitatif serta dengan uji statistik menggunakan bantuan perangkat lunak komputer dengan beberapa tahap, antara lain:

- a) Uji *Shapiro Wilk* : untuk menguji data berdistribusi normal jika nilai signifikansi $(p) > 0,05$ atau tidak.
- b) Selanjutnya apabila data yang diuji berdistribusi normal dilakukan Uji *One Way Annova* untuk mengetahui perbedaan daya hambat dalam setiap perlakuan. Jika data tidak berdistribusi normal dilakukan uji *Kruskall-Wallis*.
- c) Uji *Post Hoc LSD Test (Least Significant Deference)* untuk mengetahui adanya perbedaan kontrol positif dengan kontrol negatif.