

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *true experimental* dilakukan pada variabel bebas dan terikat yang memengaruhi penelitian berupa pengelompokan anggota-anggota kelompok eksperimen dan kontrol dengan menggunakan rancangan penelitian *posttest only control design*. Dalam rancangan ini, kelompok penelitian dibagi menjadi dua yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol yang masing-masing dipilih secara random (R). Kelompok pertama diberi perlakuan (X) dan kelompok yang lain tidak. Kelompok yang diberi perlakuan disebut kelompok eksperimen dan kelompok yang tidak diberi perlakuan disebut kelompok kontrol. Kedua kelompok memberikan hasil akhir (O1 dan O2) sesuai dengan perlakuan yang diberi (Hardani dkk., 2020).

Tabel 2
Bentuk rancangan penelitian

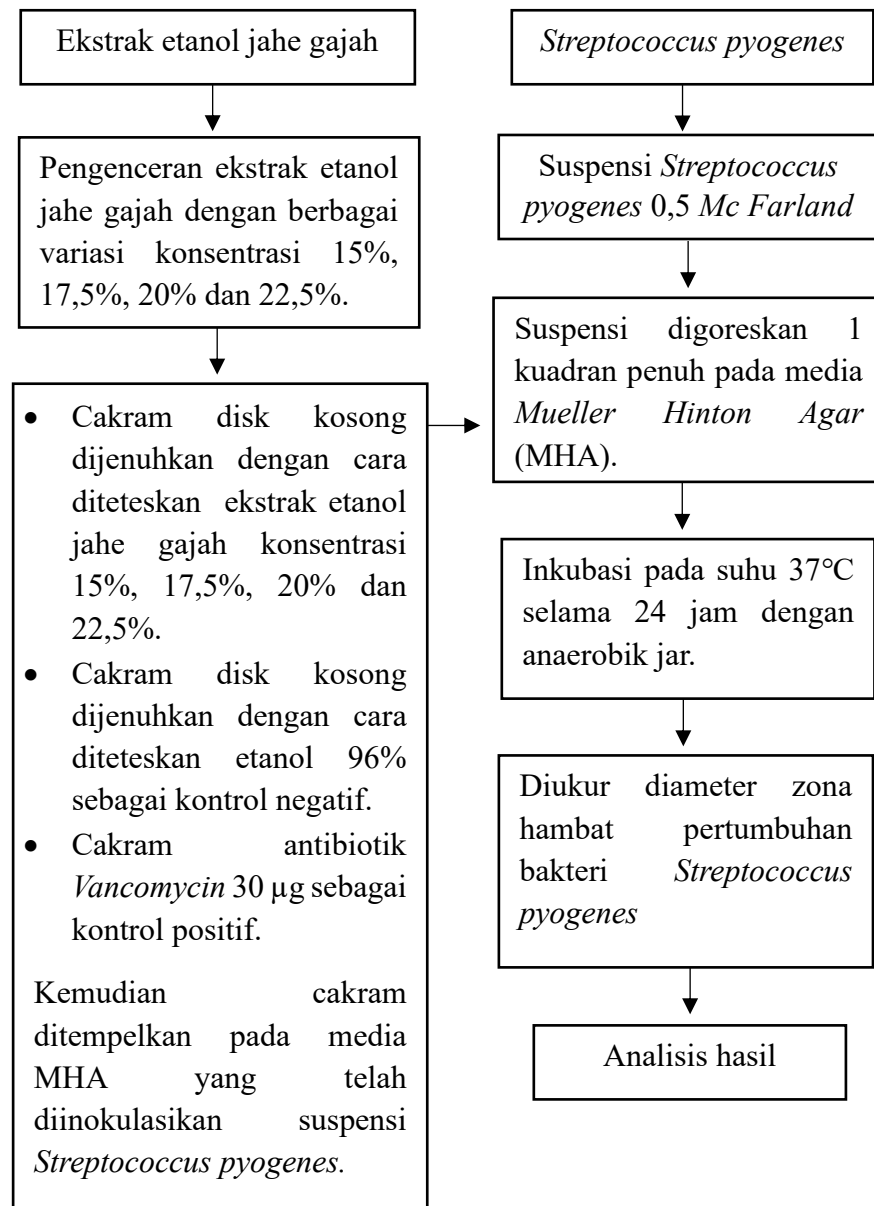
Kelompok	Perlakuan	Posttest
R1	X	O1
R2	Kontrol	O2

Keterangan :

1. R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen yaitu ekstrak etanol jahe gajah dengan konsentrasi 15%, 17,5%, 20% dan 22,5%.
2. R2 (Random 2) : Kelompok kontrol yang digunakan yaitu etanol 96% sebagai kontrol negatif dan antibiotik *Vancomycin* 30 µg sebagai kontrol positif.

3. X (Exposure) : Perlakuan atau eksperimen
4. O1 dan O2 (Observasi) : Pengukuran zona hambat ekstrak etanol jahe gajah pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

B. Alur Penelitian



Gambar 4 Alur penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO) Tabanan sebagai tempat pembuatan serbuk jahe gajah, Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO) Karangasem sebagai tempat proses evaporasi dan Laboratorium Bakteriologi, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Denpasar sebagai tempat penelitian uji daya hambat ekstrak etanol jahe gajah terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2024 sampai dengan bulan April 2025.

D. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada variasi konsentrasi ekstrak etanol jahe gajah dengan empat jenis perlakuan konsentrasi yaitu 15%, 17,5%, 20% dan 22,5%. Konsentrasi ini dipilih untuk mengetahui konsentrasi yang berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

Untuk menguji daya hambat antibakteri dari rimpang jahe gajah diperlukan ekstrak pekat dengan konsentrasi 100% yang digunakan sebagai stok sampel. Ekstrak pekat jahe gajah diuji dengan 4 perlakuan yaitu: konsentrasi 15%, 17,5%, 20% dan 22,5% dibuat dengan mengencerkan ekstrak pekat jahe gajah konsentrasi 100% menggunakan etanol 96%. Penelitian ini menggunakan kontrol negatif etanol 96% dan kontrol positif *Vancomycin* 30 µg. Kontrol positif berfungsi sebagai data pembanding dengan perlakuan yang akan dilakukan. Total perlakuan yang

digunakan dalam konsentrasi penelitian ini adalah 4 perlakuan konsentrasi dan 2 perlakuan kontrol sehingga total perlakuan dalam penelitian ini adalah 6 perlakuan.

Dalam penelitian ini, setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Dengan empat perlakuan dalam penelitian ini, maka tiga ulangan sudah memenuhi syarat untuk menghasilkan estimasi kesalahan eksperimen yang memadai. Pengulangan dilakukan untuk meningkatkan keandalan hasil, mengestimasi kesalahan percobaan, serta memastikan bahwa perbedaan yang diamati antara perlakuan benar-benar disebabkan oleh perlakuan itu sendiri dan bukan oleh faktor acak. Dalam kondisi laboratorium yang relatif homogen dan terkontrol, tiga ulangan dianggap cukup untuk mendukung validitas data yang diperoleh (Antika dkk, 2019).

1. Alat

Neraca analitik, pipet ukur, mikropipet, ball pipet, tabung *sample cup*, gelas ukur, beaker glass, rak tabung reaksi, hotplate, magnetic stirrer, lampu spritus, cawan petri, anaerobic jar, *Mc Farland* densitometer, jangka sorong, inkubator, autoclave, refrigerator, dan corong.

2. Bahan

Rimpang jahe gajah, darah, aquadest steril, biakan bakteri *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, media pertumbuhan *Muller Hinton Agar*, standar 0,5 *Mc Farland*, NaCl Fisiologis 0,9%, yellow tip, blue tip, cakram disk kosong, cakram antibiotik *Vancomycin* 30 µg, etanol 96%, aluminium foil, lidi kapas steril, microtube, kertas saring, dan kapas.

3. Prosedur kerja

Prosedur kerja pada penelitian ini, sebagai berikut :

a. Tahap persiapan (pra-analitik)

1) Pelaksanaan protokol kesehatan

Sebelum melakukan preparasi sampel, digunakan alat pelindung diri (APD) terlebih dahulu. Adapun APD yang digunakan yaitu masker, handscoon, dan jas laboratorium. Setelah menggunakan APD dan melakukan disinfeksi pada area kerja dengan menggunakan alkohol 70%.

2) Persiapan sampel ekstrak etanol jahe gajah

Pembuatan ekstrak kental jahe gajah dengan metode maserasi berdasarkan prosedur kerja yang dilakukan oleh Amin dkk, (2024) dan Fibryanto dkk, (2022) yang dimodifikasi oleh peneliti. Adapun prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:

- a) Serbuk jahe gajah diekstraksi dengan cara menimbang sebanyak 50 gram sampel serbuk jahe gajah dimasukkan ke dalam toples kaca.
 - b) Maserasi dengan etanol 96% sebanyak 500 mL sampai serbuk jahe gajah terendam. Setelah itu, wadah maserasi ditutup, disimpan dan dijauhkan dari sinar matahari selama 3x24 jam.
 - c) Sesudah 3 hari, hasil maserasi disaring, filtrat ditampung kedalam wadah (botol kaca). Residu dari penyaringan dimaserasi kembali dengan menambahkan etanol sebanyak 500 mL sampai simplisia terendam. Ditutup rapat dan dibiarkan selama 3 hari terlindungi dari cahaya matahari.
 - d) Sesudah remaserasi sekali, hasil maserasi kembali disaring dan filtratnya ditampung kedalam wadah (botol kaca).
 - e) Semua filtrate digabung dan dilanjutkan dengan proses evaporasi.
- 3) Prosedur pembuatan media uji sensitivitas (*Mueller Hinton Agar*)

- a) Bubuk media *Mueller Hinton Agar* ditimbang sebanyak 13,54 gram menggunakan neraca analitik.
 - b) Setelah proses penimbangan, bubuk media dipindahkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan 356,25 ml akuades.
 - c) Media dipanaskan dengan hotplate dan diaduk hingga homogen.
 - d) Setelah bubuk media larut sempurna dan homogen, diukur pH media dengan menggunakan pH stick (pH optimal $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C).
 - e) Erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan aluminium foil.
 - f) Media disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dihitung dari tercapainya suhu 121°C .
 - g) Media yang telah disterilisasi, didiamkan sampai agak hangat dengan suhu sekitar $\pm 40 - 50^{\circ}\text{C}$.
 - h) Tambahkan darah sebanyak 18,75 ml lalu homogenkan secara perlahan.
 - i) Media yang sudah dicampurkan dengan darah dituangkan secara aseptis ke dalam petridisk dengan volume 25 ml, kemudian didiamkan hingga memadat.
 - j) Setelah media memadat, cawan petri dibalik, dan apabila tidak langsung digunakan media yang sudah dituangkan pada cawan petri atau sisa media dalam tabung Erlenmeyer dapat dibungkus dengan kertas buram dan disimpan didalam *refrigerator*.
-
- 4) Pembuatan peremajaan bakteri *Streptococcus pyogenes*
 - a) Siapkan media steril *Mueller Hinton Agar* yang sudah bercampur dengan darah dan ose disposable.

- b) Gunakan ose disposable untuk mengambil koloni tunggal dari biakan murni bakteri *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 secukupnya.
 - c) Goreskan pada permukaan media agar dengan metode goresan 4 kuadran.
 - d) Inkubasikan media agar yang telah mendapat perlakuan dengan posisi terbalik dalam anaerobik jar pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.
- 5) Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol jahe gajah
- a) Konsentrasi ekstrak etanol jahe gajah yang digunakan adalah 15%, 17,5%, 20% dan 22,5%. Masing - masing konsentrasi tersebut dibuat dengan cara penimbangan dan pengenceran ekstrak etanol jahe gajah pekat (konsentrasi 100%) dengan pelarut etanol 96%. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak dilakukan dalam mikrotube dengan volume total 1ml.
 - b) Variasi konsentrasi ekstrak etanol jahe gajah dibuat dengan menimbang stok sampel untuk variasi konsentrasi terbesar menggunakan rumus berikut:

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

Keterangan :

M_1 : Molaritas sebelum pengenceran (%)

M_2 : Molaritas setelah pengenceran (%)

V_1 : Volume sebelum pengenceran (ml)

V_2 : Volume setelah pengenceran (ml)

- c) Pembuatan variasi konsentrasi uji adalah sebagai berikut:

- (1) Konsentrasi 22,5% disiapkan dengan cara mencampurkan 225 μ l ekstrak kental jahe gajah (konsentrasi 100%) dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 775 μ l dengan total volume 1 ml.
- (2) Konsentrasi 20% disiapkan dengan cara mencampurkan 200 μ l ekstrak kental jahe gajah (konsentrasi 100%) dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 800 μ l dengan total volume 1 ml.
- (3) Konsentrasi 17,5% disiapkan dengan cara mencampurkan 175 μ l ekstrak kental jahe gajah kental (konsentrasi 100%) dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 825 μ l dengan total volume 1 ml.
- (4) Konsentrasi 15% disiapkan dengan cara mencampurkan 150 μ l ekstrak kental jahe gajah (konsentrasi 100%) dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 850 μ l dengan total volume 1 ml.
- d) Campuran pada masing-masing konsentrasi dihomogenkan dan disimpan.
- 6) Proses penjuanan berbagai konsentrasi ekstrak jahe gajah dan kontrol ke dalam cakram kosong
 - a) Disiapkan cakram kosong yang berukuran 6 mm. Masing-masing variasi konsentrasi ekstrak etanol jahe gajah dipipet sebanyak 20 μ l dan ditetaskan ke dalam cakram hingga cairan meresap sempurna.
 - b) Untuk kontrol negatif digunakan cakram kosong yang ditetaskan dengan 20 μ l etanol 96% yang digunakan sebagai pelarut pengenceran.
 - c) Untuk kontrol positif digunakan cakram antibiotik *Vancomycin* 30 μ g. Kontrol positif berfungsi sebagai pembanding hasil pemeriksaan apabila nantinya kelompok perlakuan menghasilkan hasil positif menunjukkan terbentuknya zona hambat dan mengontrol sterilitas prosedur kerja.

7) Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes*

- a) Koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* dari media peremajaan bakteri diambil beberapa ose dan disuspensikan ke dalam tabung berbeda yang masing-masing berisi 5 ml larutan NaCl Fisiologis 0,9% steril sampai memperoleh konsentrasi 0,5 *Mc Farland* untuk setiap bakteri.
- b) Kekeruhan suspensi bakteri dibaca dengan menggunakan *Mc Farland* densitometer. 0,5 *Mc Farland* setara dengan $1,5 \times 10^8$ (*Colony Forming Unit*) CFU/mL.

b. Tahap pemeriksaan (analitik)

1) Tahap pemeriksaan uji daya hambat

Prosedur pemeriksaan uji daya hambat berdasarkan langkah kerja yang dilakukan oleh (Anggraini, 2021) yang disesuaikan dengan penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a) Lidi kapas steril disiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri 0,5 *Mc Farland Streptococcus pyogenes*. Dibiarkan sebentar agar suspense meresap kedalam kapas.
- b) Lidi kapas yang sudah berisikan suspensi bakteri 0,5 *Mc Farland Streptococcus pyogenes* digoreskan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) hingga tersebar merata pada seluruh permukaan media.
- c) Setelah diinokulasi, masing-masing cakram yang sudah ditetaskan dengan variasi konsentrasi ekstrak etanol jahe gajah konsentrasi 15%, 17,5%, 20% dan 22,5% dan kontrol negatif ditempelkan pada permukaan agar dalam satu plate yang sama dan sedikit ditekan dengan pinset sampai cakram melekat sempurna pada permukaan media.

- d) Cakram antibiotik *Vancomycin* 5 mg yang berfungsi sebagai kontrol positif ditempelkan pada media MHA yang diinokulasikan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes*.
 - e) Jarak antara cakram satu dengan yang lainnya diletakkan dengan jarak ± 15 mm dan cakram yang sudah ditempelkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan ataupun digeser.
 - f) Media yang telah ditempelkan cakram disk diinkubasi dengan posisi petridisk terbalik yang diinokulasikan dengan bakteri *Streptococcus pyogenes* diinkubasi dalam anaerobic jar pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam (Savitri dkk., 2019).
- c. Pelaporan hasil (post-analitik)

Dilihat dan diukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* yang terjadi pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat yang diukur merupakan daerah bening pada cakram (tidak ada pertumbuhan bakteri) diukur dari sisi yang satu ke sisi yang lain melalui tengah-tengah cakram.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data yang didapatkan dari penelitian ini adalah data primer dengan melakukan eksperimen laboratorium. Data yang diperoleh berasal dari hasil pengukuran zona hambat yang dihasilkan dari ekstrak jahe gajah dengan berbagai konsentrasi terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan pengukuran dengan jangka sorong melalui eksperimen laboratorium. Pengukuran dilakukan pada diameter zona hambat ekstrak etanol jahe gajah terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*. Hasil pengukuran diameter zona hambat tersebut menunjukkan adanya daya hambatan yang dinyatakan dalam millimeter (mm).

3. Instrumen pengumpulan data

Dalam penelitian ini menggunakan instrument pengumpul data yaitu : jangka sorong atau mistar, alat tulis dan kamera.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang terkumpul dari hasil eksperimen uji daya hambat ekstrak etanol jahe gajah terhadap *Streptococcus pyogenes* yaitu berupa zona hambat yang dinyatakan dalam millimeter (mm). Kemudian data ditabulasikan ke dalam bentuk tabel dan narasi.

2. Analisa data

Data yang telah diperoleh lalu dianalisis dengan uji statistik dengan bantuan *software* computer. Data diuji dengan uji statistik yang menggunakan uji normalitas *Shapiro Wilk* yang bertujuan untuk menentukan apakah data berasal dari distribusi normal. Data yang ditemukan berdistribusi normal yaitu memiliki nilai ($p > 0,05$). Kemudian dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene* dengan nilai signifikan ($p > 0,05$) dan didapatkan data bersifat homogen. Jika hasil data didapatkan berdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan uji beda dengan menggunakan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji post Hoc LSD

(*Least Significantly Difference*) untuk mengetahui setiap perbedaan. Sebaliknya, jika data tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Uji *Kruskal Wallis* adalah uji statistik nonparametrik yang digunakan untuk menguji apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara median dari tiga kelompok atau lebih yang independen. Uji ini digunakan ketika data tidak memenuhi asumsi normalitas yang diperlukan oleh uji parametrik seperti *One Way ANOVA*.