

## BAB IV METODE PENELITIAN

### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experiment* dengan rancangan penelitian *Posttest Only Control Design*. Di dalam desain *true eksperimental*, peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen, sehingga validitas internal (kualitas pelaksanaan rancangan penelitian) dapat menjadi tinggi. Dalam rancangan ini terdapat dua kelompok yang masing-masing dipilih secara random, kelompok pertama diberi perlakuan (kelompok eksperimen) dan kelompok yang lain tidak (kelompok kontrol). Diukur pengaruh perlakuan (*intervensi*) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Sugiyono, 2011). Berikut merupakan bentuk rancangan pada penelitian ini :

Kelompok Uji	Perlakuan	Posttest
R <sub>1</sub>	X	O <sub>2</sub>
R <sub>2</sub>		O <sub>2</sub>

Gambar 4. Rancangan *Posttest Only Control Design*

Keterangan :

R<sub>1</sub> (Kelompok eksperimen) : Kelompok eksperimen dalam penelitian ini adalah berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun sembung pada konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%.

R<sub>2</sub> (Kelompok kontrol) : Kontrol yang digunakan adalah etanol 96%

X : Perlakuan atau experiment

O<sub>2</sub> (Observant) : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri

*Salmonella typhi*

## **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

### **1. Tempat penelitian**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kimia Dasar, Kimia Terapan dan laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan, Politeknik Kesehatan Denpasar.

### **2. Waktu penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai bulan Mei 2019.

## **C. Sampel Penelitian**

### **1. Sampel penelitian**

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sembung yang diperoleh dari daun sembung dengan kriteria inklusi daun sembung segar, berwarna hijau, dan dipetik dari tangkai ketiga sampai keenam dari pucuk, tidak berlubang. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu daun sembung yang tidak segar, layu, berwarna kuning kecoklatan, dan berlubang yang tidak sesuai dengan kriteria yang ditentukan peneliti. Daun sembung kemudian diekstraksi secara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Hasil ekstraksi tersebut digunakan sebagai stok sampel dengan konsentrasi 100%.

### **2. Besar sampel penelitian**

Ekstrak etanol daun sembung dengan konsentrasi 100% sebagai stok sampel yang diperoleh dari proses ekstraksi dibuat empat seri konsentrasi yang berbeda yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80% yang dibuat dengan mengencerkan stok sampel dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Dalam penelitian ini menggunakan etanol 96% sebagai kontrol yang berfungsi sebagai data

pembandingan dengan perlakuan dan untuk mengkonfirmasi bahwa pelarut yang digunakan memiliki atau tidak memiliki pengaruh terhadap bakteri uji.

Menurut Hanafiah (2016) dalam penentuan pengulangan dapat dihitung berdasarkan jumlah konsentrasi yang digunakan dan jumlah kelompok kontrol. Dalam penelitian ini terdapat 4 perlakuan konsentrasi dan 1 perlakuan kontrol, sehingga total perlakuan dalam penelitian ini adalah 5 perlakuan. Dalam penelitian ini masing-masing perlakuan diulang dengan jumlah yang dapat ditentukan dari persamaan berikut (Hanafiah, 2016) :

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

Keterangan:

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75$$

$$r \geq 5 \text{ (dibulatkan)}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, pengulangan yang dapat dilakukan dalam penelitian ini adalah lebih dari atau sama dengan lima kali. Menurut Hanafiah (2016) jumlah ulangan suatu perlakuan tergantung pada derajat ketelitian yang diinginkan oleh peneliti terhadap kesimpulan hasil percobaan.

Semakin banyak jumlah pengulangan yang dilakukan, maka derajat ketelitian juga akan semakin tinggi.

Pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini sebanyak lima kali. Menurut Hanafiah (2016) syarat minimal jumlah pengulangan yang bisa dilakukan untuk percobaan laboratorium adalah cukup tiga kali pengulangan, maka jumlah pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini sudah memenuhi syarat. Berdasarkan jumlah perlakuan dan pengulangan yang dilakukan, maka banyaknya data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah sebanyak 25 unit data. Jumlah data tersebut diperoleh dari jumlah perlakuan dikalikan dengan jumlah pengulangan.

### **3. Unit analisis**

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun sembung yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80% terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dan diameter zona hambat yang terbentuk dalam kontrol yang mengandung etanol 96%. Seri konsentrasi tersebut digunakan untuk mendapatkan konsentrasi yang paling efektif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*.

## **D. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Blender (cosmos) (1 buah), tabung vial (2 buah), neraca analitik (Radwag) (1 buah), pipet ukur (Iwaki-Pyrex®) 5 ml dan 10 ml (masing- masing 1 buah), mikropipet 5µl – 200µl (secorex) (1 buah), mikropipet 100µl - 1000µl (secorex) (1 buah), ball pipet (b&n ballppipet) (1 buah), gelas ukur (Iwaki-Pyrex®) 250ml (1 buah), evaporator (Buchi I-300) (1buah), beaker glass (Iwaki-Pyrex®) 500 ml dan

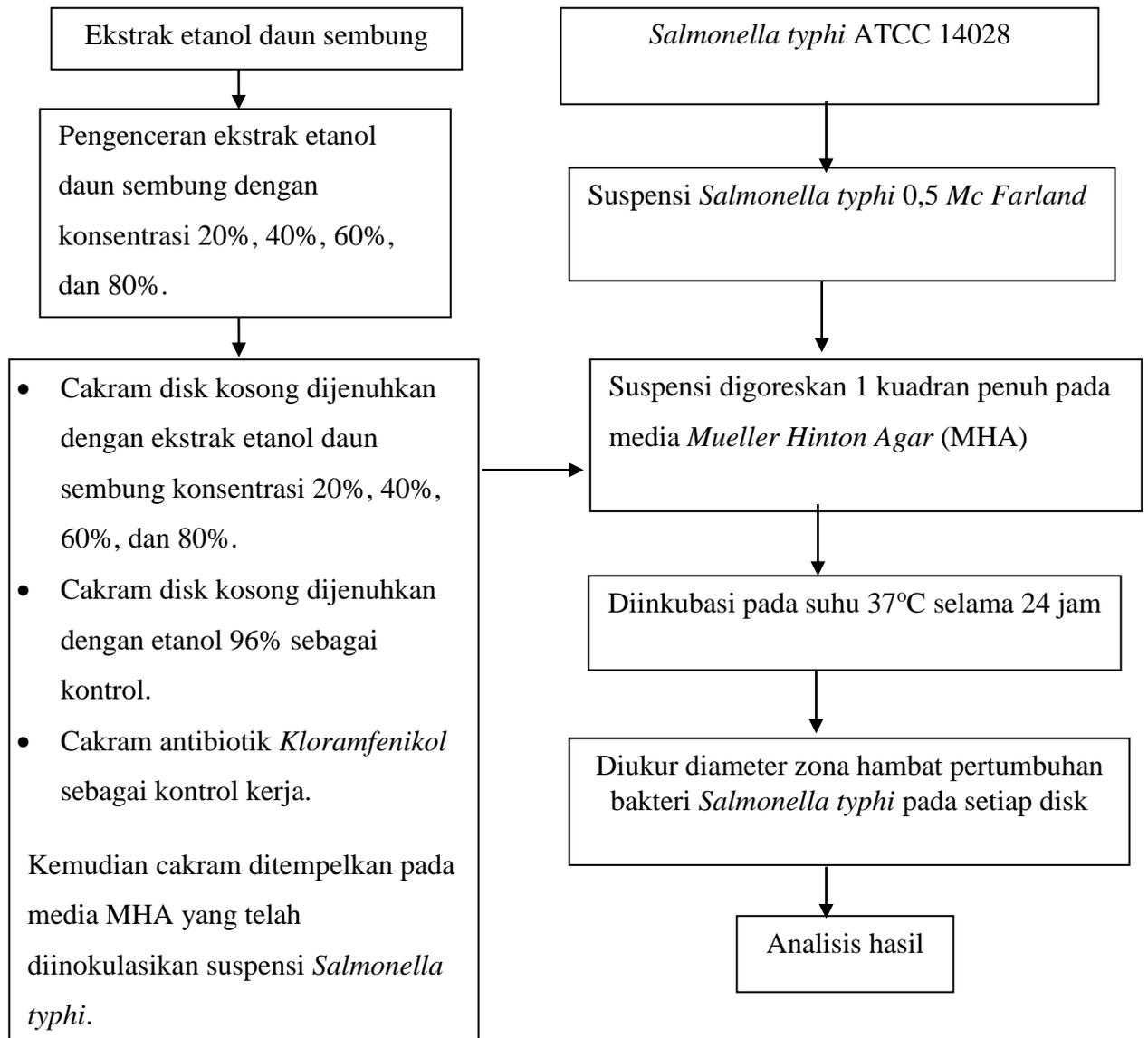
1000 ml (masing-masing 1 buah), erlenmeyer (Iwaki-Pyrex®) 250 ml dan 1000 ml (masing-masing 2 buah) rak tabung reaksi (1 buah), tabung reaksi (1 buah), ose bulat (1 buah), hotplate (Jisico) (2 buah), *magnetic stirrer* (2 buah), lampu spiritus (1 buah), *petridisk* (11 buah), *biosafety cabinet* (Biobase), *Mc Farland* densitometer (Biosan) (1 buah), jangka sorong (1 buah), inkubator (Esco) (1 buah), oven (Wagtech) (1 buah), autoclave (Tomy Sx- 500), *refrigerator* (1 buah), cawan porselin (1 buah).

## **2. Bahan**

Daun sembung, aquadest steril 1000 ml, biakan bakteri *Salmonella typhi*, media pertumbuhan *Muller Hinton Agar*, standar *0,5 Mc Farland*, NaCl Fisiologis 0,9%, yellow tip (20 buah), blue tip (20 buah), cakram *disk* kosong (30 buah), cakram antibiotik *Kloramfenikol* 30µg (5 buah), etanol teknis 96%, lidi kapas steril (5 buah), tabung *eppendorf* (20 buah), aluminium foil, kertas saring, dan kapas.

## E. Kerangka Kerja dan Prosedur Kerja

### 1. Kerangka kerja



Gambar 5. Kerangka Kerja Uji Aktivitas Antibakteri

Keterangan gambar :

Bakteri *Salmonella typhi* ATCC 14028 yang telah dibuat suspensi dengan kekeruhan yang sama dengan standar Mc Farland 0,5 (setara dengan  $1,5 \times 10^8$  sel bakteri) digoreskan pada media *Mueller Hinton Agar* secara merata. Ekstrak etanol daun sembung dilakukan pengenceran dan dibuat konsentrasi 20%, 40%,

60%, dan 80%. Selanjutnya cakram disk kosong dijenuhkan dengan masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun sembung, etanol 96% sebagai kontrol dan penyiapan cakram antibiotik *Kloramfenikol* sebagai kontrol kerja. Kemudian cakram disk yang telah dijenuhkan dengan masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun sembung, etanol 96%, dan cakram antibiotik *Kloramfenikol* ditempelkan pada media *Mueller Hinton Agar* yang telah diinokulasikan suspensi *Salmonella typhi* dengan jarak minimal tiap disk adalah 15 mm, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diukur diameter zona hambat yang terbentuk pada setiap disk dan dianalisis menggunakan uji statistik dengan bantuan perangkat lunak komputer.

## **2. Prosedur kerja**

1) Pembuatan simplisia dan ekstrak etanol daun sembung dengan metode maserasi berdasarkan prosedur kerja yang dilakukan oleh Pasril dan Yuliasanti (2014) dan Sarlina, Razak, dan Tandah (2017) yang dimodifikasi oleh peneliti. Adapun prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:

- a) Daun sembung dipetik dari tangkai ketiga sampai keenam dari pucuk sebanyak 1500 gram dan dipilih daun yang sesuai dengan kriteria yang sudah ditentukan dalam penelitian.
- b) Daun sembung kemudian dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci pada air mengalir, lalu ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.
- c) Daun sembung dipotong-potong menjadi bagian yang lebih kecil untuk memperluas daerah pengeringan.
- d) Daun sembung dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sampai daun menjadi kering.

- e) Daun yang sudah berbentuk simplisia (kering) disortasi. Tujuannya untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotoran-pengotoran lain yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering.
- f) Simplisia yang sudah kering dihaluskan dengan blender, kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk simplisia yang lebih halus dan mudah untuk dilarutkan.
- g) Serbuk simplisia yang sudah halus, diuji kadar airnya dengan cara :
- (1) Dipanaskan cawan porselen kosong dalam oven pada suhu 105<sup>0</sup>C selama 1 jam
  - (2) Didinginkan cawan dalam suhu ruang selama 10-20 menit.
  - (3) Ditimbang cawan porselen kosong tersebut.
  - (4) Dimasukkan simplisia daun sembung sebanyak 1 gram ke dalam cawan porselen yang telah diketahui beratnya.
  - (5) Kemudian dipanaskan ke dalam oven pada suhu 105<sup>0</sup>C selama 1 jam.
  - (6) Didinginkan di dalam suhu ruang selama 10-20 menit.
  - (7) Ditimbang lagi berat cawan porselen yang berisi bahan.
  - (8) Dipanaskan kembali dalam oven sampai diperoleh berat yang konstan (selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,02 gram)
  - (9) Ditentukan kadar air pada sampel (*Drying Ratio*).
- h) Serbuk simplisia yang sudah halus dengan kadar air < 10%, ditimbang sebanyak 150 gram dengan menggunakan neraca analitik.
- i) Serbuk yang sudah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam 2 erlenmeyer, masing-masing 75 gram dan dituangi dengan etanol 96% sebanyak 1000 ml

hingga simplisia terendam.

- j) Ditungkup rapat dan dibiarkan selama 7 hari terlindungi dari cahaya matahari sambil dibantu pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* selama 8 jam setiap harinya.
  - k) Sesudah 7 hari, hasil maserasi disaring, filtrat ditampung ke dalam wadah (botol kaca).
  - l) Semua filtrat diuapkan menggunakan evaporator (suhu 40 – 60°C) sampai didapatkan ekstrak kental.
  - m) Ekstrak kental ditimbang dengan neraca analitik untuk mengetahui massa total dari ekstrak yang diperoleh.
- 2) Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun sembung
- a) Konsentrasi ekstrak etanol daun sembung adalah 20%, 40%, 60% dan 80%. Konsentrasi ini dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak etanol daun sembung konsentrasi 100% dengan etanol 96%. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak dibuat dalam tabung *ependorf* dengan volume total 1 ml.
  - b) Pengenceran dilakukan dengan:  
Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun sembung menggunakan presentase perbandingan konsentrasi % b/v melalui rumus berikut:

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

Keterangan:

% : variasi konsentrasi dalam satuan persen

b : masa ekstrak etanol daun sembung (100%)

v : volume pengenceran

Adapun jumlah ekstrak etanol daun sembung yang diperlukan dari masing-masing konsentrasi adalah:

- (1) Konsentrasi 80% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,8 gram ekstrak etanol daun sembung konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
  - (2) Konsentrasi 60% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,6 gram ekstrak etanol daun sembung konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
  - (3) Konsentrasi 40% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,4 gram ekstrak etanol daun sembung konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
  - (4) Konsentrasi 20% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,2 gram ekstrak etanol daun sembung konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
- c) Campuran masing-masing konsentrasi dihomogenkan dan disimpan pada tabung *eppendorf*.
- 3) Prosedur pembuatan media uji sensitivitas (*Mueller Hinton Agar*)
- a) Ditimbang sebanyak 7,6 g media MHA, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan sebanyak 200 ml aquadest (etiket media 38,0 g medium disuspensikan ke dalam 1 L aquades).
  - b) Media dipanaskan dengan hotplate dan diaduk hingga homogen.
  - c) Setelah bubuk media larut sempurna dan homogen, diukur pH media dengan menggunakan pH stick (pH optimal  $7,3 \pm 0,1$  pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ ).

- d) Media disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit dihitung dari tercapainya suhu 121 °C.
  - e) Media yang telah disterilisasi, didiamkan sampai suhu media turun menjadi  $\pm 40 - 50$  °C.
  - f) Media dituangkan secara aseptis ke dalam *petridisk*  $\pm 15$  ml, kemudian didiamkan hingga memadat.
  - g) 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) Proses penjuhan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun sembung dan kontrol ke dalam cakram kosong
    - a) Disiapkan cakram kosong yang berukuran 6 mm. Masing-masing variasi konsentrasi ekstrak etanol daun sembung dipipet sebanyak 20  $\mu$ l dan dijenuhkan ke dalam cakram hingga cairan meresap sempurna.
    - b) Untuk kontrol digunakan cakram kosong yang dijenuhkan dengan 20  $\mu$ l etanol 96% yang digunakan sebagai pelarut pengenceran.
    - c) Untuk kontrol kerja digunakan cakram antibiotik *Kloramfenikol* 30  $\mu$ g. Kontrol kerja berfungsi sebagai pembanding hasil pemeriksaan apabila nantinya kelompok perlakuan menghasilkan hasil positif menunjukkan terbentuknya zona hambat dan mengontrol sterilitas prosedur kerja.
  - 5) Pembuatan suspensi bakteri *Salmonella typhi*
    - a) Koloni bakteri *Salmonella typhi* dari biakan murni diambil beberapa ose dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl

Fisiologis 0,9% steril sampai memperoleh konsentrasi 0,5 *Mc Farland* untuk masing-masing 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

1) Tahap pemeriksaan uji daya hambat antibakteri

Prosedur pemeriksaan uji daya hambat antibakteri berdasarkan langkah kerja yang dilakukan oleh Vandepite, dkk (2011) yang disesuaikan dengan penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a) Suspensi bakteri *Salmonella typhi* dengan kepekatan *Mc Farland* 0,5% disiapkan
- b) Swab kapas steril disiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah suspensi bakteri meresap, swab kapas steril diangkat dan diperas dengan cara menekan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar
- c) Swab kapas yang telah dicelupkan tadi disebar dengan cara digores-goreskan pada permukaan media MHA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan-goresan. Goresan dilakukan dengan merata hingga menutup seluruh permukaan media.
- d) Media MHA didiamkan 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam.
- e) Setelah permukaan media kering, masing-masing variasi konsentrasi ekstrak etanol daun sembung konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% yang sudah dijenuhkan ke dalam cakram, ditempelkan pada permukaan media MHA dan sedikit ditekan dengan pinset sampai cakram melekat sempurna

pada permukaan media.

- f) Cakram antibiotik *Kloramfenikol* dan cakram kosong yang telah dijenuhkan dengan etanol 96% ditempelkan pada media MHA.
- g) Jarak antara cakram satu dengan yang lainnya diletakkan dengan jarak  $\pm 15$  mm dan cakram yang sudah ditempelkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan ataupun digeser.
- h) Media yang telah ditanami cakram diinkubasi di inkubator selama 24 jam dengan posisi terbalik pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### c. Pelaporan hasil

- 1) Setelah inkubasi selama 24 jam dilihat zona hambat yang terbentuk dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong (satuan milimeter)
- 2) Diameter zona hambat yang diukur yaitu daerah jernih sekitar cakram disk (daerah yang tidak ada pertumbuhan bakteri) diukur dari ujung satu keujung yang lain melalui tengah-tengah cakram disk.

## **F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data**

### **1. Jenis data**

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data primer merupakan data yang diperoleh melalui pengamatan langsung yang dilakukan oleh peneliti (Sugiyono, 2011). Data dari penelitian ini berupa diameter zona hambat pertumbuhan *Salmonella typhi* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun sembung dan kontrol yang diperoleh dari pengukuran di laboratorium.

### **2. Teknik pengumpulan data**

Teknik pengumpulan data yang digunakan adalah melalui pemeriksaan laboratorium dengan melakukan pengukuran diameter zona hambat menggunakan

jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada diameter zona hambat pertumbuhan *Salmonella typhi* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun sembung dengan metode difusi cakram *Kirby-Bauer*. Hasil pengukuran diameter zona hambat dari masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun sembung yang menunjukkan aktivitas penghambatan dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

## **G. Pengolahan dan Analisis Data**

### **1. Teknik pengolahan data**

Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa diameter zona hambat pertumbuhan *Salmonella typhi* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun sembung secara *in vitro* yang dinyatakan dalam satuan mm (millimeter) diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating data yaitu data yang disajikan dalam bentuk tabel dan naratif.

### **2. Analisis data**

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan uji statistik dengan bantuan perangkat lunak komputer, dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Uji *Kolmogorof Smirnov*, uji ini digunakan untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak.
- b. Uji *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan *Salmonella typhi*, antara konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%.
- c. Uji *Least Significant Deference* (LSD), merupakan uji lanjutan dari *one way anova* yang digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi*.