

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis Penelitian yang digunakan adalah penelitian *true experimental* dengan rancangan penelitian *posttest only control group design*. Dalam desain *true experimental* peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen (Sugiyono, 2012). Menurut Notoatmodjo, (2012) gambar dari rancangan ini adalah sebagai berikut:

	Perlakuan	<i>Posstest</i>
R1 (Kelompok Eksperimen)	X	02
R2 (Kelompok Kontrol)		02

Gambar 4. Desain Penelitian *Posttest Only Control Group Design*

Keterangan:

R1 : Kelompok eksperimen, dalam penelitian ini yaitu berbagai konsentrasi dari ekstrak etanol tanaman ketumpang air 10,20,30,40 dan 50%.

R2 : Kelompok kontrol, dalam penelitian ini terdiri dari kontrol negatif berupa cakram yang mengandung etanol 96% dan kontrol positif berupa cakram antibiotik *amoxicillin*. Kelompok kontrol digunakan sebagai kontrol kerja.

X : Perlakuan (Intervensi)

02 : diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Dasar, Kimia Terapan, Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai bulan Juni 2018

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Variabilitas populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah genus *Peperomia*, termasuk *Peperomia pellucida*, *Peperomia acuminata*, *Peperomia alata*, *Peperomia alpina*, *Peperomia decipiens*, *Peperomia elongata*, *Peperomia galioides*, *Peperomia glabella*, *Peperomia hernandiifolia*, *Peperomia increscens*, *Peperomia lancifolia*, *Peperomia macrostachya*, *Peperomia obtusifolia*, *Peperomia ouabiana*, *Peperomia purpurinervis*, *Peperomia quadrangularis*, *Peperomia quaesita*, *Peperomia rotundifolia*, *Peperomia serpens*, *Peperomia tenella*, *Peperomia tenuipes*, *Peperomia tetraphylla*, dan *Peperomia trinervula* (Melo, Guimaraes, and Marccus, 2016).

2. Kriteria sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman ketumpang air, dimana kriteria inklusi dari sampel adalah tanaman ketumpang air yang tidak terlalu muda dan terlalu tua, tinggi tanaman mencapai 7-10 cm dan dengan daun yang berwarna hijau. Sementara kriteria eksklusi yaitu, tanaman yang layu atau

tidak segar, daunnya berwarna kuning, dan berlubang yang tidak memenuhi pertimbangan dari peneliti.

3. Besar sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak tanaman ketumpang air. Ekstrak tanaman ketumpang air (*Peperomia pellucida*) tersebut dibuat dengan lima konsentrasi yang berbeda yaitu 10, 20, 30, 40, dan 50%, yang dibuat dengan mengencerkan stok sampel menggunakan pelarut etanol 96% sehingga besar sampel yang dibutuhkan adalah tiga gram. Dalam penelitian ini menggunakan etanol 96%. Pada masing-masing perlakuan tersebut dilakukan replikasi dan pengulangan. Replikasi dalam penelitian ini dilakukan sebanyak dua kali. Pengulangan masing-masing seri konsentrasi dalam penelitian ini dapat ditentukan dengan persamaan berikut (Hanafiah, 2008):

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

Keterangan:

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75 = 5$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebanyak lima kali, sehingga diperoleh 50 data. Dalam penelitian ini digunakan etanol 96% sebagai kontrol negatif dan antibiotik *amoxicillin* sebagai kontrol positif, dilakukan juga pengulangan sebanyak lima kali dan replikasi dua kali sehingga diperoleh 20 data. Sehingga total data dalam penelitian ini adalah 70 data.

4. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi ekstrak etanol tanaman ketumpang air yaitu 10, 20, 30, 40, dan 50% terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

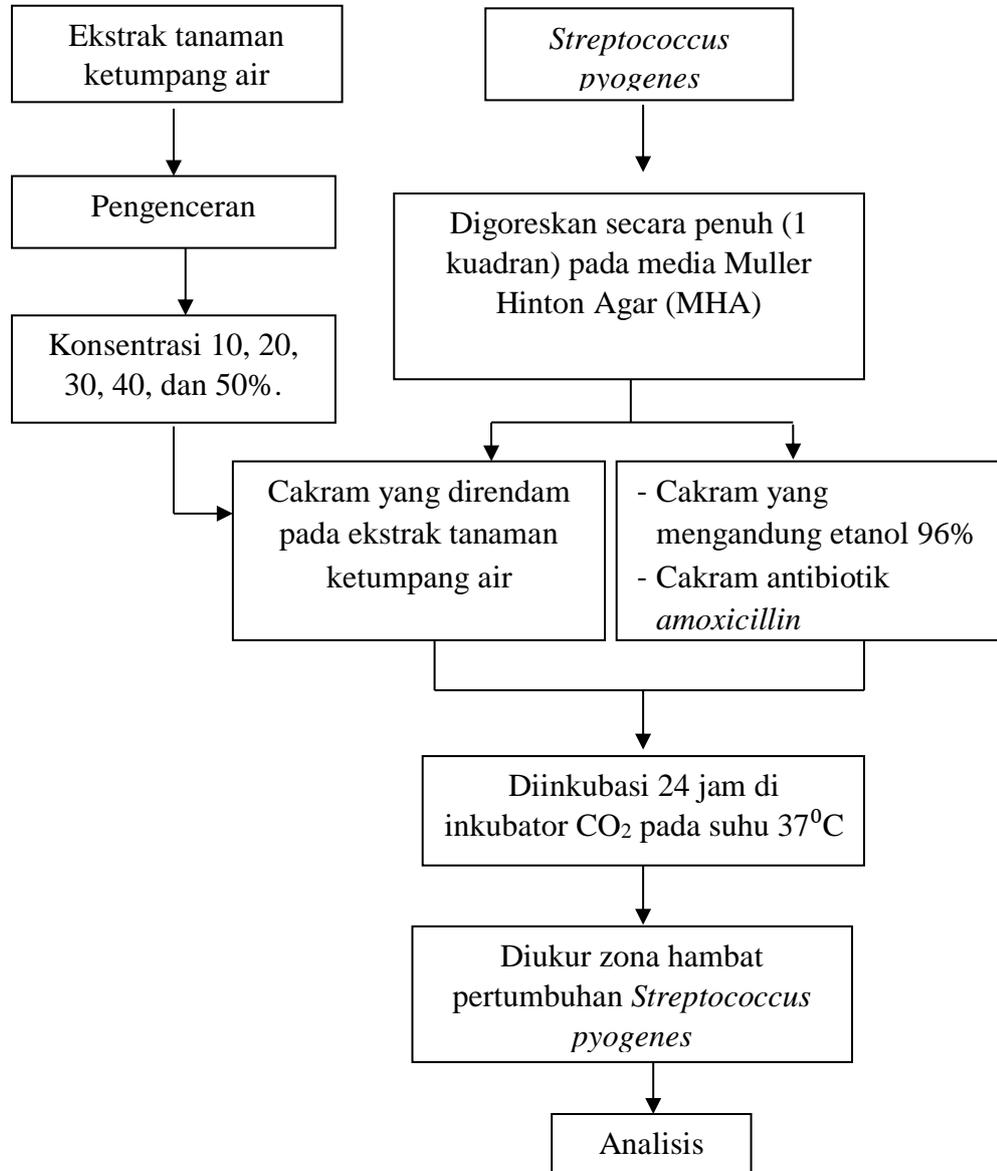
Tabung reaksi (1 buah), pipet ukur (iwaki pyrex ®) 1 ml dan 10 ml (1 buah), ball pipet (d&n ball pipet) (1 buah), cawan porselin (1 buah), gelas ukur (iwaky-pyrex®) 250 ml (1 buah), beaker glass (iwaky-pyrex®) 250 ml (1 buah) dan 800 ml (2 buah), corong (1 buah) bunsen 1 buah, petridisk steril (10 buah), jangka sorong, mikropipet 20µl-1000µl (secorex) dan tip (10 buah), blender (1 buah), neraca analitik (radwag) (1 buah), *Mac Farland* densitometer (Biosan) (1 buah), oven (1 buah) inkubator CO₂ (Esco) (1 buah), *autoclave* (Tomy Sx-500), evaporator (1 buah), dan *biosafety cabinet* (biobase).

2. Bahan

Tanaman ketumpang air, kertas saring, tabung eppendorf, dan aluminium foil, aquadest steril 1000 ml, bakteri *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, media Muller Hinton Agar, standar Mac Farland 0,5 %, NaCl fisiologis 0,9 %, cakram *disk* kosong (60 buah), cakram antibiotik *amoxicillin*, lidi kapas steril (1 buah), etanol 96%.

E. Kerangka Kerja dan Prosedur Kerja

1. Kerangka kerja



Gambar 5. Kerangka Kerja

2. Prosedur kerja

a. Persiapan sampel

- 1) Pembuatan simplisia tanaman ketumpang air
 - a) Tanaman ketumpang air dipetik sesuai kebutuhan dan selanjutnya dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci dengan air mengalir.
 - b) Tanaman ketumpang air ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.
 - c) Tanaman ketumpang air dipotong- potong menjadi bagian yang lebih kecil.
 - d) Tanaman ketumpang air dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dengan menggunakan kipas angin, setelah kering tanaman ketumpang air diblender dan diayak untuk mendapatkan simplisia berupa serbuk yang halus.
- 2) Penentuan kadar air simplisia
 - a) Ditimbang berat cawan kosong.
 - b) Ditimbang simplisia sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam cawan.
 - c) Simplisia kemudian dioven pada suhu 105°C selama 1 jam.
 - d) Kemudian cawan berisi simplisia yang sudah dioven didinginkan dan ditimbang.
 - e) Simplisia dioven kembali sampai diperoleh berat yang konstan.
 - f) Dihitung kadar air yang diperoleh.
- 3) Pembuatan ekstrak tanaman ketumpang air dengan metode maserasi
 - a) Ditimbang serbuk halus simplisia tanaman ketumpang air sebanyak 100 gram dengan menggunakan neraca analitik.
 - b) Serbuk yang sudah ditimbang kemudian dimasukkan kedalam gelas beaker, kemudian ditambah dengan etanol sebanyak 500 ml. Ditungkat dengan rapat dan

biarkan selama 3 hari terlindungi dari cahaya matahari sambil diulang-ulang diaduk selama 8 jam setiap harinya.

- c) Sesudah 3 hari kemudian disaring, filtrat ditampung ke dalam wadah (botol kaca), selanjutnya residu kembali dimaserasi dengan 500 ml etanol. Ditungkat dengan rapat dan biarkan selama 3 hari terlindungi dari cahaya matahari sambil diulang-ulang diaduk selama 8 jam setiap harinya.
 - d) Sesudah 3 hari kemudian disaring, filtrat ditampung ke dalam wadah (botol kaca yang bersih).
 - e) Semua filtrat digabung dan diuapkan menggunakan evaporator (suhu 40-60°C) sampai didapatkan ekstrak kental. Timbang bobot ekstrak kental yang diperoleh.
- 4) Pembuatan berbagai konsentrasi ekstrak etanol tanaman ketumpang air
- a) Konsentrasi ekstrak etanol tanaman ketumpang air adalah 10, 20, 30, 40, dan 50%. Konsentrasi ini dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak tanaman ketumpang air konsentrasi 100% dengan etanol 96%. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak dibuat dalam tabung eppendorf dengan volume total 1 ml.
 - b) Pengenceran dilakukan dengan:

Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol tanaman ketumpang air menggunakan presentase perbandingan konsentrasi % b/v melalui rumus berikut:

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

Keterangan:

% : variasi konsentrasi dalam satuan persen

b : masa ekstrak etanol tanaman ketumpang air (100%)

v : volume pengenceran

Adapun jumlah ekstrak tanaman ketumpang air yang diperlukan dari masing-masing konsentrasi adalah:

- (1) Konsentrasi 50% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,5 gram ekstrak tanaman ketumpang air konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
 - (2) Konsentrasi 40% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,4 gram ekstrak tanaman ketumpang air konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
 - (3) Konsentrasi 30% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,3 gram ekstrak tanaman ketumpang air konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
 - (4) Konsentrasi 20% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,2 gram ekstrak tanaman ketumpang air konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
 - (5) Konsentrasi 10% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,1 gram ekstrak tanaman ketumpang air konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
- c) Campuran masing-masing konsentrasi ekstrak tanaman ketumpang air dimasukkan ke tabung eppendorf dan dihomogenkan dihomogenkan.
- 5) Pembuatan media *Mueller Hinton Agar*
- a) Bubuk media *Mueller Hinton Agar* ditimbang sebanyak 5,7 gram dan dilarutkan dengan 150 ml akuades.
 - b) Media dipanaskan dengan hotplate dan diaduk hingga homogen.

- c) Setelah homogen erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan aluminium foil.
 - d) Media disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.
 - e) Media dituangkan ke dalam *petridisk* ±15 ml, kemudian didiamkan hingga memadat.
 - f) Apabila tidak langsung digunakan, media dapat disimpan didalam *refrigerator*.
- 6) Penjenuhan berbagai konsentrasi ekstrak tanaman ketumpang air dan kontrol ke dalam cakram
- a) Cakram kosong yang berukuran 6 mm disiapkan. Masing-masing cakram direndam ke dalam masing-masing konsentrasi ekstrak tanaman ketumpang air hingga cairan meresap sempurna.
 - b) Untuk kontrol digunakan cakram kosong direndam ke dalam etanol 96%.
- 7) Pembuatan suspensi *Streptococcus pyogenes* 0,5% *Mc Farland*
- a) Koloni *Streptococcus pyogenes* diambil dari biakan murni beberapa ose dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi larutan NaCl fisiologis steril 0,9% dengan volume 10 ml.
 - b) Kekeruhan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* diukur dengan menggunakan *Mc Farland* densitometer hingga alat menunjukkan kekeruhan suspense bakteri 0,5, dimana 0,5% *Mc Farland* yang setara dengan 1,5 x 10⁸ (Colony Forming Unit) CFU/ml.
- b. Tahap pemeriksaan
- Berdasarkan Virgianti, Rochmanah dan Resty (2017) dengan modifikasi, prosedur pemeriksaan uji daya hambat
- 1) Disiapkan lidi kapas steril, kemudian dicelupkan ke dalam suspensi bakteri 0,5

Mc Farland dan didiamkan beberapa saat hingga cairan meresap ke dalam kapas.

- 2) Lidi kapas tersebut kemudian digoreskan pada permukaan media *Muller Hinton Agar* (MHA) hingga merata.
- 3) Median *Muller Hinton Agar* (MHA) didiamkan selama 5-15 menit agar suspensi bakteri dapat meresap ke dalam media.
- 4) Cakram yang telah dijenuhkan dengan masing-masing konsentrasi ekstrak tanaman ketumpang air diletakkan pada permukaan media yang sudah ditanami bakteri. Kontrol juga diletakkan pada permukaan media tersebut. Jarak antar cakram minimal 15 mm.
- 5) Digunakan juga cakram antibiotik *amoxicillin* sebagai kontrol kerja, yang ditempelkan pada media MHA.
- 6) Media diinkubasi pada inkubator CO₂ dengan suhu 37⁰C selama 24 jam.

c. Pelaporan hasil

Diukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong dan dicatat hasilnya.

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, 2012). Data dari penelitian ini berupa diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* pada berbagai konsentrasi ekstrak tanaman ketumpang air yang diperoleh dari pengukuran di laboratorium.

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan dengan pengukuran di laboratorium terhadap zona hambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* pada berbagai konsentrasi ekstrak tanaman ketumpang air, kemudian dilakukan pengukuran dengan jangka sorong.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa zona hambat ekstrak tanaman ketumpang air terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* diolah secara tabulating data (data yang disajikan dalam bentuk tabel) dan narasi.

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*, uji ini digunakan apabila data berdistribusi normal, untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*, antara konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50%.
- c. Uji *Least Significant Deference (LSD)*, uji ini digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.