

BAB IV
METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experiment* (eksperimen murni). Di dalam desain *true experiment*, peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen (Sugiyono, 2017). Sedangkan rancangan penelitian yang digunakan adalah *Posttest Only Control Group Design*. Pada rancangan ini kelompok yang diberi perlakuan disebut kelompok eksperimen yaitu ekstrak buah pare konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%, sedangkan kelompok yang tidak diberi perlakuan disebut dengan kelompok kontrol yaitu kontrol negatif dan kontrol positif yang digunakan sebagai kontrol kerja. Bentuk rancangan pada penelitian ini sebagai berikut:

	Perlakuan	Posttest
R_E	X	O2
R_K		O2

Gambar 5. Rancangan penelitian *Posttest Only Group Design*
Sumber: (Sugiyono, 2017)

Keterangan:

R_E : Kelompok eksperimen yang merupakan konsentrasi ekstrak buah pare yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%

R_K : Kelompok kontrol yang digunakan yaitu etanol 96% sebagai kontrol negatif dan antibiotik *Amoxicillin* sebagai kontrol positif

X : Perlakuan atau eksperimen berupa berbagai konsentrasi ekstrak buah pare

O2 : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Laboratorium Kimia Terapan, dan Laboratorium Kimia Dasar Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei sampai bulan Juni 2018.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah buah pare dengan genus *Momordica* dan spesiesnya adalah *Momordica charantia* L. yang didapat di Perkebunan Percobaan Universitas Udayana.

2. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada berbagai konsentrasi ekstrak buah pare dengan perlakuan empat jenis konsentrasi yaitu 20, 40, 60, dan 80%. Konsentrasi tersebut dipilih untuk mengetahui konsentrasi yang paling efektif menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.

3. Jumlah dan besar sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak buah pare dengan besar sampel sejumlah 4 gram ekstrak buah pare konsentrasi 100%, dimana terdapat empat perlakuan terhadap ekstrak buah pare yaitu pengenceran ekstrak pekat (100%) menjadi konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% dengan

melakukan replikasi. Dimana untuk konsentrasi 20% massa ekstrak yang diperlukan yaitu 0,2 gram, konsentrasi 40% 0,4 gram, konsentrasi 60% 0,6 gram, dan konsentrasi 80% 0,8 gram.

Replikasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak dua kali, dan pengulangan yang dilakukan adalah sebanyak empat kali pengulangan terhadap masing-masing konsentrasi tersebut. Menurut Hanafiah (2016), syarat minimal jumlah pengulangan yang bisa dilakukan untuk percobaan laboratorium adalah cukup 3 kali pengulangan, maka pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini sudah memenuhi syarat. Sehingga dapat ditentukan jumlah sampel pemeriksaan yang diperoleh pada penelitian ini adalah sebesar 32 unit sampel.

D. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja

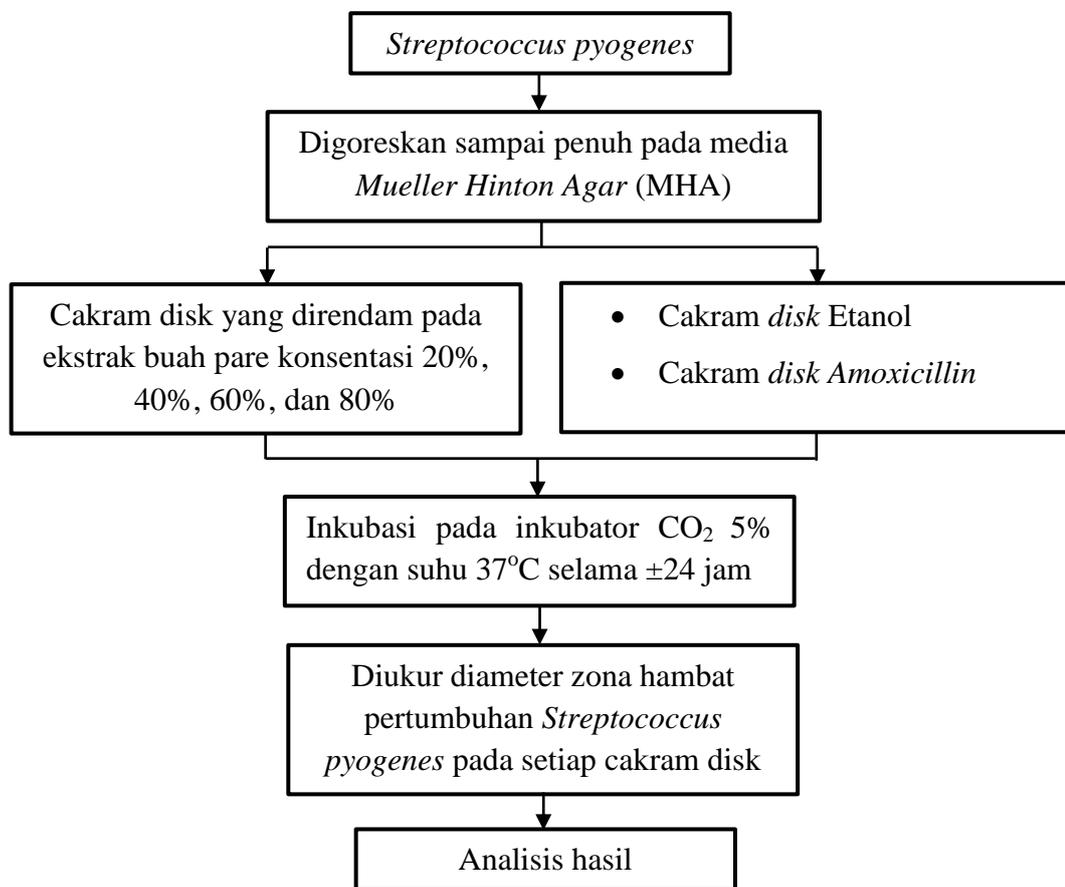
1. Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pisau (1 buah), blender (Philips) (1 buah), penyaringan (1 buah) tabung vial (1 buah), pipet ukur (Iwaki-pyrex) 1 mL dan 10 mL (masing-masing 1 buah), ball pipet (d&n ball pipet) (1 buah), gelas ukur (Iwaky-pyrex) 1000 mL dan 50 mL (masing-masing 1 buah), spiritus 1 buah, *petri dish* steril (14 buah), tabung reaksi (Iwaky-pyrex) (6 buah), rak tabung (1 buah), ose (1 buah), *biosafety cabinet* (Biobase), *Mc Farland* densitometer (Biosan) (1 buah), inkubator CO₂ (Esco) (1 buah), *autoclave* (Tomy Sx-500), neraca analitik (Radwag) (1 buah), mikropipet 20 µl-1000 µl (Secorex), *rotary evaporator* (1 set), *hotplate* (1 buah), gelas beaker 50 mL dan 500 mL (masing-masing 1 buah), *refrigerator* (1 buah), *magnetic stirer* (1 buah), jangka sorong (1 buah).

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah buah pare, aquadest steril 100 mL, bakteri *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, cakram *disk* kosong (30 buah), cakram antibiotik *Amoxicillin*, etanol 96%, aluminium foil, alkohol 70%, tabung *ependorf*, yellow tip (30 buah), media *Muller Hinton Agar*, standar *Mc Farland* 0,5, NaCl fisiologis 0,9 %, *cotton swab* (lidi kapas steril) (6 buah)

3. Kerangka kerja



Gambar 6. Kerangka Kerja

Keterangan gambar:

Bakteri *Streptococcus pyogenes* yang telah dibuat suspensi *Mc Farland* 0,5 (setara dengan $1,5 \times 10^8$ sel bakteri) digoreskan pada media *Mueller Hinton*

Agar secara merata. Cakram *disk* dari masing-masing konsentrasi ekstrak buah pare serta kontrol ditempelkan pada media *Mueller Hinton Agar* dengan jarak minimal tiap *disk* adalah 15 mm, kemudian 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.

4. Prosedur kerja

a. Persiapan sampel

- 1) Pembuatan ekstrak buah pare dengan metode maserasi
- a) Buah pare muda yang berwarna hijau dipetik sebanyak 6 kg dan selanjutnya dibersihkan dari kotoran dengan dicuci menggunakan air mengalir, lalu ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.
- b) Selanjutnya buah pare dipisahkan dari bagian dalam dan bijinya, lalu diiris tipis-tipis menggunakan pisau untuk mempercepat proses pengeringan.
- c) Kemudian keringkan buah pare selama 10 hari tanpa terkena sinar matahari langsung.
- d) Kemudian buah pare kering dihancurkan dengan alat blender dan diayak menggunakan penyaringan untuk mendapatkan simplisia berupa serbuk yang halus, dan didapatkan serbuk simplisia sebesar 520 g.
- e) Kadar air pada simplisia dihitung (syarat baku kadar air simplisia adalah < 10%).
- f) Serbuk buah pare ditimbang sebanyak 100 g menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker dan ditutup dengan aluminium foil.

- g) Ditambahkan etanol 96% sebanyak 500 mL hingga serbuk buah pare terendam sempurna dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil.
 - h) Kemudian didiamkan selama 3 hari terlindungi dari cahaya matahari sambil diaduk dengan bantuan *magnetic stirrer* selama 8 jam setiap harinya.
 - i) Setelah 3 hari, kemudian disaring dengan kertas saring, filtrat ditampung dalam wadah (botol kaca) dan ditutup rapat.
 - j) Selanjutnya dilakukan maserasi kedua (remaserasi) dengan menambahkan sebanyak 500 mL etanol dan ditutup menggunakan aluminium foil.
 - k) Kemudian didiamkan selama 3 hari terlindungi dari cahaya matahari sambil diaduk dengan bantuan *magnetic stirrer* selama 8 jam setiap harinya.
 - l) Setelah 3 hari, kemudian disaring dengan kertas saring, filtrat ditampung dalam wadah (botol kaca) baru dan ditutup rapat.
 - m) Semua filtrat digabung dan diuapkan menggunakan evaporator (suhu 40-60°C) sampai didapatkan ekstrak kental.
 - n) Hasil ekstraksi buah pare yang dihasilkan ditampung dalam tabung vial yang telah disiapkan.
- 2) Pembuatan ekstrak buah pare konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%
- a) Konsentrasi ekstrak buah pare adalah 20%, 40%, 60%, dan 80%. Konsentrasi ini dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak buah pare konsentrasi 100% dengan etanol. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak dibuat dalam tabung eppendorf dengan volume total 1 mL.
 - b) Pengenceran dilakukan dengan:
 Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak buah pare menggunakan presentase perbandingan konsentrasi % b/v melalui rumus berikut:

$$\% = b/v \times 100$$

Keterangan:

% : variasi konsentrasi dalam satuan persen

B : masa ekstrak buah pare (100%)

V : volume pengenceran

- (1) Konsentrasi 80% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,8 g ekstrak buah pare konsentrasi 100% dengan etanol sampai 1 mL.
 - (2) Konsentrasi 60% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,6 g ekstrak buah pare konsentrasi 100% dengan etanol sampai 1 mL.
 - (3) Konsentrasi 40% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,4 g ekstrak buah pare konsentrasi 100% dengan etanol sampai 1 mL.
 - (4) Konsentrasi 20% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,2 g ekstrak buah pare konsentrasi 100% dengan etanol sampai 1 mL.
- 3) Pembuatan media uji sensitivitas (*Mueller Hinton Agar*).
- a) Bubuk media *Mueller Hinton Agar* ditimbang sebanyak 3,8 gram dan dilarutkan dengan 100 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.
- 4) Penjujukan berbagai konsentrasi ekstrak buah pare dan kontrol ke dalam

cakram

- a) Cakram *disk* kosong yang berukuran 6 mm disiapkan. Kemudian cakram *disk* ini diteteskan 20 µl masing-masing konsentrasi ekstrak buah pare hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram *disk*.
 - b) Untuk kontrol digunakan cakram *disk* kosong yang diteteskan dengan 20 µl etanol.
- 5) 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 suspensi bakteri 0,5, dimana 0,5 *Mc Farland* yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ (*Colony Forming Unit*) CFU/mL.
- b. Tahap pemeriksaan
- 1) *Cotton swab* disiapkan, kemudian dicelupkan ke dalam suspensi bakteri 0,5 *Mc Farland* % dan didiamkan beberapa saat hingga cairan meresap ke dalam kapas.
 - 2) *Cotton swab* tersebut kemudian digoreskan pada permukaan media *Muller Hinton Agar* (MHA) hingga merata.
 - 3) Media *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 buah pare dan kontrol diletakkan pada permukaan media yang sudah ditanami

bakteri. Jarak antar cakram minimal 15 mm.

- 5) Dalam penelitian ini, juga digunakan 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

- 1) Adanya zona hambat dilihat dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong (dalam satuan mm).
- 2) Diameter zona hambat yang diukur yaitu daerah jernih sekitar cakram *disk* (tidak ada pertumbuhan bakteri) diukur dari ujung satu keujung yang lain melalui tengah-tengah cakram *disk*.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data primer yakni dengan melakukan eksperimen laboratorium. Data yang diperoleh berupa data dari hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* pada berbagai konsentrasi ekstrak buah pare.

2. Teknik pengumpulan data

Dalam penelitian ini cara atau teknik yang digunakan untuk mendapatkan data adalah dengan melakukan eksperimen laboratorium dengan mengukur diameter zona hambat ekstrak buah pare terhadap *Streptococcus pyogenes* dengan metode *Kirby-Bauer*. Hasil pengukuran diameter zona hambat dari masing-masing konsentrasi ekstrak buah pare yang menunjukkan aktivitas penghambatan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan untuk mengumpulkan data pada penelitian ini adalah jangka sorong, alat tulis, dan kamera.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diperoleh melalui proses eksperimen/pemeriksaan langsung pada laboratorium kemudian diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating (data disajikan dalam bentuk tabel) dan narasi.

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis kuantitatif, dilakukan dengan memakai uji statistik menggunakan bantuan perangkat lunak komputer (*software*). Analisis data dilakukan dengan beberapa tahap, antara lain:

- a. Untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak digunakan uji *Kolmogorov Smirnov*.
- b. Untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan menggunakan ekstrak buah pare antara konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% apabila data berdistribusi normal digunakan *One Way Anova*.
- c. Untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*, uji statistik yang digunakan adalah LSD (*Least Significant Deference*).