

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Dalam penelitian “Uji Aktivitas Antibakteri Rebusan Daun Sirih (*Piper betle* Linn) Terhadap Bakteri *Streptococcus pyogenes*”, peneliti menggunakan jenis penelitian *true experimental design*, yang bertujuan untuk menyelidiki kemungkinan hubungan sebab-akibat dengan desain di mana secara nyata ada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol (Riyanto, 2011). Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Posttest Only Control Design* dimana pada kelompok yang diberi perlakuan disebut kelompok eksperimen sedangkan kelompok yang tidak diberi perlakuan disebut dengan kelompok kontrol (Sugiyono, 2017). Kontrol positif dan negatif digunakan sebagai kontrol kerja.

Tabel 2
Rancangan *Posttest Only Control Design*

	Perlakuan	Posttest
R _E	X	O ₂
R _K		O ₂

Keterangan :

R_E : Kelompok eksperimen merupakan rebusan daun sirih dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

R_K : Kelompok kontrol dimana kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik *Amoxicillin* sementara kontrol negatif yang digunakan adalah aquadest.

X : Perlakuan atau eksperimen berupa berbagai konsentrasi rebusan daun sirih

O₂ : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai Juli 2018.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah daun sirih berwarna hijau, berbentuk menyerupai jantung, permukaan agak licin dengan panjang 7-15 cm dan lebar 5-14 cm.

2. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah berbagai konsentrasi air rebusan daun sirih (*Piper betle Linn*) untuk menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* dengan perlakuan lima jenis konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Kontrol positif dalam penelitian ini menggunakan antibiotik *Amoxicillin*.

3. Jumlah dan besar sampel

Volume sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 50 ml air rebusan daun sirih konsentrasi 100%. Jumlah pengulangan suatu perlakuan tergantung pada derajat ketelitian yang diinginkan. Secara umum, ulangan minimal untuk percobaan laboratorium atau rumah kaca cukup 3, namun untuk percobaan lapangan minimal ulangan adalah 4 (Hanafiah, 2016).

Pada penelitian ini digunakan 6 kelompok uji yaitu kelompok perlakuan berupa konsentrasi air rebusan daun sirih 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% beserta kontrol negatif. Penelitian ini menggunakan empat kali pengulangan dan dua kali replikasi, sehingga jumlah unit sampel yang didapatkan sebanyak 40 unit sampel dari konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

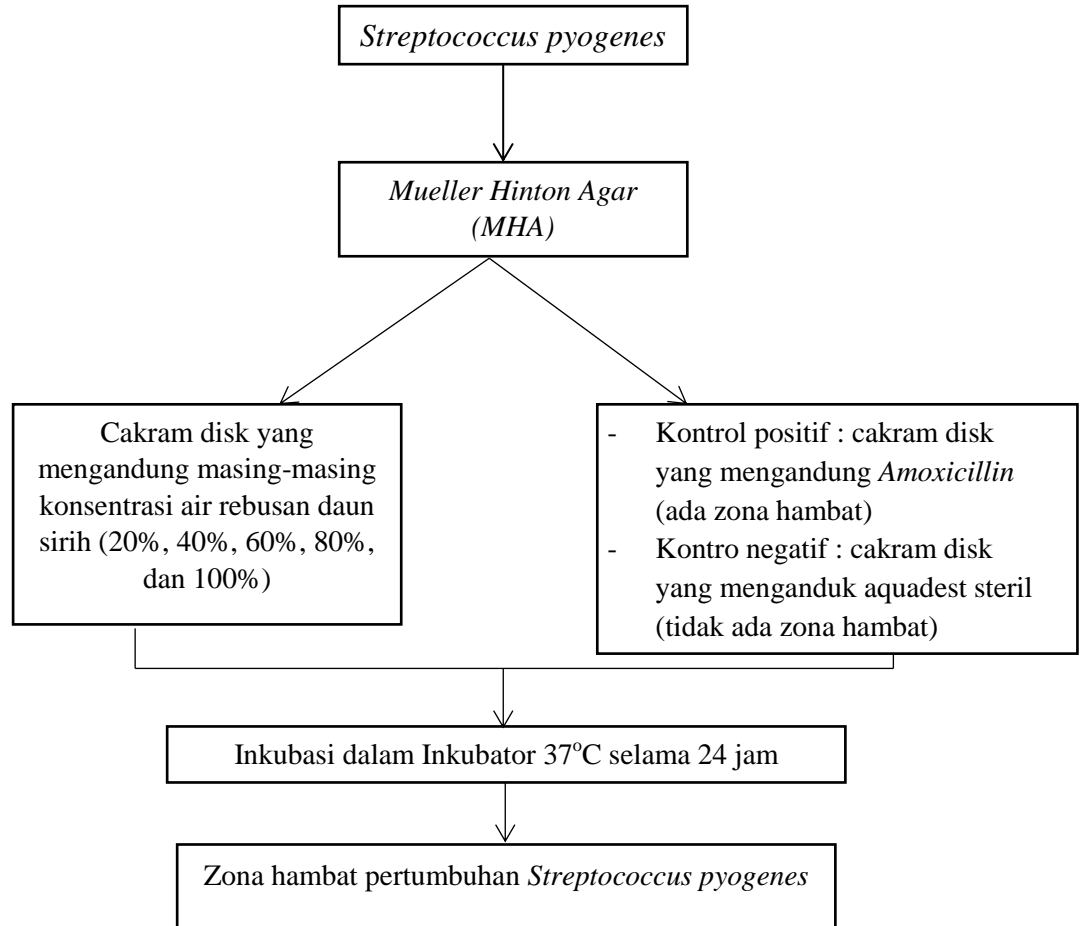
Alat yang digunakan dalam diantaranya gunting, tempat sampel, kaca arloji, neraca analitik Radwag, gelas ukur Pyrex, Erlenmeyer Pyrex, hotplate stirrer Jisico, autoclave, cawan petri steril, tabung reaksi steril, pipet ukur steril, oven, rak tabung reaksi, Biosafety Cabinet, Mc Farland densitometer, ose bulat, mikropipet, pinset, api bunsen, inkubator, ball pipet, dan jangka sorong.

2. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah air rebusan daun sirih, aquadest steril, koloni *Streptococcus pyogenes*, media Mueller Hinton Agar, standar Mc Farland 0,5%, larutan NaCl fisiologis 0,85%, cakram disk kosong, *Amoxicillin*, swab kapas steril, aluminium foil, kasa steril.

E. Kerangka Kerja dan Prosedur Kerja

1. Kerangka kerja



Gambar 5
Kerangka Kerja

Keterangan :

Bakteri *Streptococcus pyogenes* diinokulasikan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA), kemudian masing-masing cakram disk yang mengandung berbagai konsentrasi air rebusan daun sirih (20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%), kontrol positif (*Amoxicillin*) dan kontrol negatif (aquadest steril) ditempelkan pada permukaan media. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk berupa zona bening di sekitar cakram disk dihitung dan dinyatakan dalam mm (milimeter).

2. Prosedur kerja

a. Pembuatan rebusan daun sirih

- 1). Dicuci bersih daun sirih (*Piper betle Linn*), kemudian dipotong kecil-kecil.
- 2). Ditimbang daun sirih (*Piper betle Linn*) sebanyak 50 gram dengan neraca analitik.
- 3). Direbus 50 gram daun sirih (*Piper betle Linn*) dalam 50 ml aquadest, dengan suhu 90-100°C selama 15 menit.
- 4). Hasil rebusan ditampung dalam botol steril

b. Pengenceran sampel air rebusan daun sirih

- 1). Diencerkan sampel air rebusan daun sirih dalam konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dari air rebusan daun sirih konsentrasi 100%.
- 2). Digunakan rumus pengenceran sebagai berikut :

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

Keterangan rumus :

V_1 : volume air rebusan daun sirih yang akan diencerkan dari konsentrasi 100%.

V_2 : volume air rebusan daun sirih yang akan dibuat yaitu 1 ml.

C_1 : konsentrasi air rebusan daun sirih yang akan diencerkan, yaitu 100%.

C_2 : konsentrasi air rebusan daun sirih yang akan dibuat.

Tabel 3
Konsentrasi Air Rebusan Daun Sirih

No.	V_1 (ml)	C_1	V_2 (ml)	C_2	Aquadest Steril (ml)
1.	2	100%	10	20%	8
2.	4	100%	10	40%	6
3.	6	100%	10	60%	4
4.	8	100%	10	80%	2

c. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes*

- 1). Diambil koloni *Streptococcus pyogenes* dari biakan murni dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl fisiologis 0,85%.
- 2). Suspense dibandingkan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5%.
- 3). Suspense diukur dengan menggunakan Mc Farland densitometer.

d. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar*

- 1) Bubuk media *Mueller Hinton Agar* ditimbang sebanyak 3,99 gram dan dilarutkan dengan 105 ml akuades.
- 2) Media dipanaskan dengan hotplate dan diaduk hingga homogen.
- 3) Setelah homogen erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan aluminium foil.
- 4) Media disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 5) Media dituangkan ke dalam *petridisk* ±15 ml, kemudian didiamkan hingga memadat.
- 6) Apabila tidak langsung digunakan, media dapat disimpan didalam *refrigerator*.

e. Uji antimikroba

- 1). Direndam cakram disk kosong dalam berbagai konsentrasi air rebusan daun sirih (20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%) hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram disk.
- 2). Direndam cakram disk kosong ke dalam aquadest steril, sebagai kontrol negatif.
- 3). Digunakan cakram disk antibiotik *Amoxicillin* sebagai kontrol positif.
- 4). Disiapkan suspensi *Streptococcus pyogenes*.

- 5). Dichelupkan swab kapas steril ke dalam suspensi bakteri. Setelah suspensi bakteri meresap, swab kapas steril diangkat dan diperas dengan cara menekannya pada dinding tabung bagian dalam.
- 6). Digores swab kapas steril pada media *Mueller Hinton Agar*. Goresan dilakukan secara merata hingga menutupi seluruh permukaan media.
- 7). Suspensi dibiarkan meresap pada media selama 5 sampai 15 menit.
- 8). Masing-masing cakram disk yang telah jenuh dengan berbagai konsentrasi air perasan daun sirih dan kontrol negatif diletakkan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* yang sudah diinokulasi dan sedikit ditekan dengan pinset hingga melekat sempurna.
- 9). Jarak Antara satu cakram dengan cakram yang lain minimal 15 mm dan cakram yang telah ditempelkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan atau digeser.
- 10). Diinkubasi media *Mueller Hinton Agar* yang telah diberi cakram disk pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam dalam posisi terbalik.

F. Jenis dan Teknis Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang dikumpulkan adalah data primer meliputi diameter zona hambat *Streptococcus pyogenes* yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi air rebusan daun sirih.

2. Cara pengumpulan data

Pada penelitian ini cara pengumpulan data yang dilakukan adalah dengan melakukan pengukuran dengan alat ukur melalui eksperimen. Pengukuran dilakukan dengan cara mengukur diameter zona hambat air rebusan daun sirih

terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* dengan metode difusi cakram. Hasil pengukuran diameter zona hambat menunjukkan aktivitas penghambatan yang dinyatakan dalam milimeter (mm).

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang diperoleh dari pengukuran zona hambat melalui eksperimen pengujian efektivitas berbagai konsentrasi air rebusan daun sirih terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*, kemudian ditabulasikan ke dalam bentuk tabel dan naratif dan diolah dengan analisis statistik.

2. Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah analisis kualitatif yang dilakukan dengan uji statistik menggunakan bantuan perangkat lunak (*software*) komputer. Data dianalisis dengan menggunakan uji sebagai berikut :

- a. Uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk menguji apakah data berdistribusi normal atau tidak.
- b. Uji *One Way Anova* sedangkan untuk mengetahui perbedaan diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*, pada air rebusan daun sirih konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.
- c. Uji *Least Significant Deference* (LSD), uji ini digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.