

BAB IV
METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat analitik yang dilakukan di dalam laboratorium (*Laboratory research*), dimana jenis penelitian yang digunakan adalah *True Experimental* dengan menggunakan rancangan penelitian yaitu *Posttest Only Control Group Design* yang bertujuan untuk mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Sugiyono, 2017). Kontrol yang digunakan pada penelitian ini ada 2 kontrol yaitu kontrol negatif yang dibuat dengan merendam cakram disk menggunakan etanol 96%, sedangkan kontrol positif yaitu disk antibiotik *Amoxicillin* 25 µg. Penggunaan kontrol positif pada penelitian ini hanya digunakan sebagai kontrol kerja. Bentuk rancangan pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar 5 :

| | Unit Analisa | Posttest |
|-------------------------|--------------|----------------|
| R (Kelompok Eksperimen) | R X | O ₂ |
| R (Kelompok Kontrol) | K | O ₄ |

Gambar 5 Desain Penelitian *Posttest Only Control Group Design*

Sumber : (Sugiyono, 2017)

Keterangan :

R : Kelompok eksperimen yang merupakan konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh dengan konsentrasi yaitu 20, 40, 60, dan 80% (Kelompok yang di beri perlakuan)

K : Kelompok kontrol yang digunakan yaitu etanol 96% sebagai kontrol negatif dan antibiotik *Amoxicillin* 25 µg sebagai kontrol positif

O2:O4 : Pengukuran kedua (posttest) yaitu diameter zona hambat yang terbentuk

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

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

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai bulan Juni 2018

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Variabilitas populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah buah belimbing dengan genus *Averrhoa* dan spesiesnya adalah *Averrhoa bilimbi* L.

2. Kriteria sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah belimbing wuluh muda yang berwarna hijau hingga hijau kekuningan dengan ukuran 4-5,6cm. Sementara kriteria eksklusi yaitu, buah belimbing wuluh yang rusak/buahnya tidak

utuh, berlubang, layu dan sudah tua (berwarna kuning pucat) sehingga tidak memenuhi pertimbangan penulis.

3. Jumlah dan besar sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Massa sampel ekstrak etanol buah belimbing wuluh yang diperlukan yaitu 4 gram dengan konsentrasi 100%. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi yaitu 20, 40, 60 dan 80% dengan cara mengencerkan ekstrak pekat dengan etanol 96%. Kontrol negatif pada penelitian ini adalah pelarut yang digunakan yaitu etanol 96%.

Tabel 3 Perbandingan Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (%b/v)

| No. | Massa (gram) | C ₁ | V ₂ (ml) | C ₂ | Akuades (ml) |
|-----|-----------------|----------------|------------------------|----------------|-----------------|
| 1 | 0,2 | 100% | 1 | 20% | Hingga 1 ml |
| 2 | 0,4 | 100% | 1 | 40% | Hingga 1 ml |
| 3 | 0,6 | 100% | 1 | 60% | Hingga 1 ml |
| 4 | 0,8 | 100% | 1 | 80% | Hingga 1 ml |

Jumlah pengulangan sebanyak empat kali dan replikasi sebanyak dua kali (Hanafiah, 2008). Dengan demikian besar sampel dalam penelitian ini sebanyak 32 data dan ditambah dengan kontrol negatif mengandung etanol 96% dan kontrol positif *Amoxicillin*.

Menurut Hanafiah (2008), syarat minimal jumlah pengulangan yang bisa dilakukan untuk percobaan laboratorium adalah minimal tiga kali pengulangan, maka pengulangan yang akan dilakukan dalam penelitian ini sudah memenuhi syarat.

4. Unit analisa

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada variasi konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan empat jenis konsentrasi yaitu 20, 40, 60 dan 80%. Konsentrasi ini dipilih untuk mengetahui konsentrasi yang paling efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

Kontrol negatif yang digunakan adalah etanol 96%, sedangkan kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik 25 µg. *Amoxicillin* dipilih karena *Amoxicillin* adalah obat semi sintetis, yang termasuk dalam golongan antibiotik yang disebut penisilin (antibiotik β-laktam). Obat ini telah terbukti efektif terhadap berbagai macam infeksi yang disebabkan bakteri gram positif dan gram negatif (Elizalde *dkk*, 2016).

D. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang digunakan

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 belimbing wuluh.

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 etanol buah belimbing wuluh terhadap bakteri *Streptococcus puogenes* dengan metode *Kirby-Bauer*. Hasil pengukuran diameter

zona hambat dari masing-masing konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh 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/mistar, alat tulis, dan kamera.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

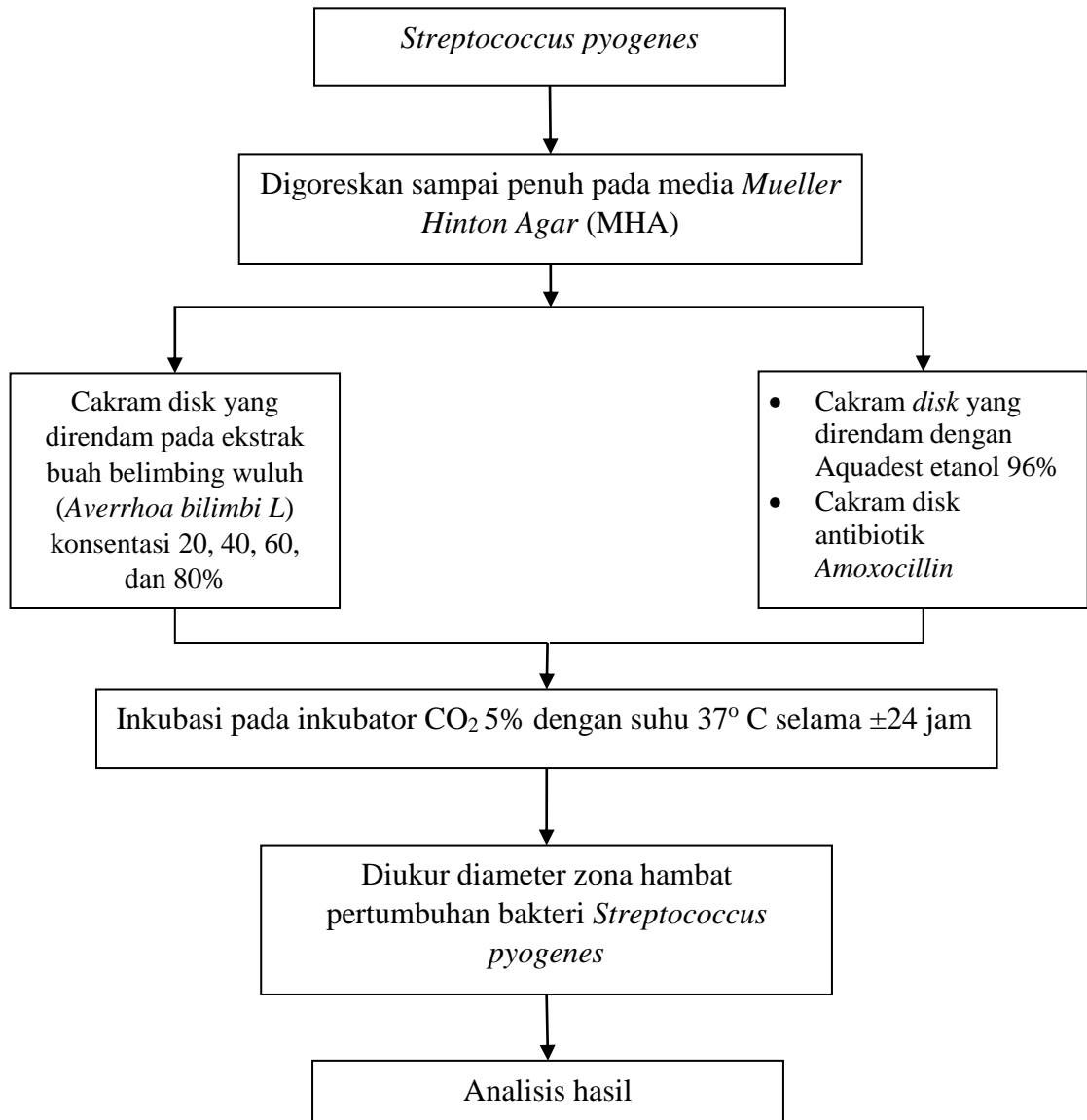
Alat yang diperlukan dalam penelitian ini: pisau (1 buah), pipet ukur (Iwaki pyrex) 1 ml dan 10 ml (1 buah), ball pipet (D&n ball pipet) (1 buah), gelas ukur (Iwaki-pyrex) 1000 ml dan 50 ml (masing-masing 1 buah), spiritus 1 buah, petridisk steril (12 buah), tabung reaksi/ependoft (18 buah), (1 buah), beaker glass 50 ml dan 500 ml (1 buah), kasa steril (1 buah), lumpang dan alu (1 buah), mikropipet 20 μ l-1000 μ l (Secorex) dan tip (20 buah), blender (1 buah), neraca analitik (radweg) (1 buah), Mc Farland densitometer (Biosan), inkubator CO₂ (Esco) (1 buah), dan autoclave (Tomy Sx-500), evaporator (1 buah) biosafety cabinet (Biobase).

2. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini: buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) sebanyak 2 kg, bakteri *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, cakram disk kosong (32 buah), etanol 96% 2000 ml, media *Muller Hinton Agar* (MHA), aquadest steril 1000 ml, standar Mc Farland 0,5, NaCl fisiologis 0,85 %, cakram antibiotik *Amoxicillin* 25 μ g sebagai kontrol kerja (2 buah), lidi kapas steril (1 buah), alkohol 70%, kertas saring, aluminium foil.

F. Kerangka Kerja dan Prosedur Kerja

1. Kerangka kerja



Gambar 6 Kerangka kerja penentuan zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*

Keterangan gambar :

Bakteri *Streptococcus pyogenes* yang telah dibuat suspensi dengan kekeruhan yang sama dengan standar 0,5 *McFarland* (setara dengan $1,5 \times 10^8$ sel bakteri) digoreskan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) secara merata.

Cakram *disk* dari masing-masing konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh serta kontrol ditempelkan pada media *Mueller Hinton Blood Agar* dengan jarak minimal tiap *disk* adalah 15 mm, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C didalam inkubator CO₂ 5% 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

a. Persiapan sampel

- 1) Pembuatan ekstrak etanol buah belimbing wuluh dengan metode maserasi
 - a) Buah belimbing wuluh yang berwarna hijau dan memiliki ukuran 4-6,5 cm dipetik sebanyak 3 kg, selanjutnya buah dibersihkan dari kotoran dengan dibilas menggunakan air bersih, lalu ditiriskan untuk menghilangkan sisa air
 - b) Lalu dipotong-potong menjadi bagian yang lebih kecil menggunakan pisau.
 - c) Kemudian di keringkan dengan cara diangin anginkan dan dikenakan sinar matahari langsung beberapa hari (6-7 hari) hingga kering (Maryam, Juniasti and Kosman, 2015)
 - d) Lalu dihitung kadar airnya (kadar air minimal 10%)
 - e) Setelah kering kemudian dihaluskan dengan alat blender dan diayak agar mendapatkan serbuk yang lebih halus, serbuk yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk ekstraksi
 - f) Serbuk buah belimbing wuluh ditimbang sebanyak 100 gr, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker yang bersih dan ditutup dengan aluminium foil

- g) Ditambahkan etanol 96% 500 ml hingga serbuk buah belimbing wuluh terendam sempurna kemudian maserasi selama tiga hari dengan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 24 jam (8 jam berturut-turut selama 3 hari)
 - h) Hasil maserasi buah belimbing wuluh disaring dengan kertas saring dan filtrat ditampung ke dalam botol kaca bersih. Dilakukan remaserasi atau maserasi ulang terhadap residu buah belimbing wuluh tersebut
 - i) Kemudian filtrat dari hasil maserasi pertama dan kedua ditampung dalam labu penampung pada alat evaporator
 - j) Setelah itu dimasukkan kedalam alat evaporator
 - k) Dilakukan proses evaporasi pada alat evaporator secara *automatic*
 - l) Hasil evaporasi buah belimbing wuluh yang dihasilkan ditampung dalam botol vial yang telah disiapkan
- 2) Pembuatan ekstrak etanol buah belimbing wuluh konsentrasi 20, 40, 60, dan 80%
- a) Rumus pengenceran yang digunakan adalah

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

Keterangan rumus :

- % : variasi konsentrasi dalam satuan persen
- b : massa ekstrak etanol buah belimbing wuluh (100%)
- v : volume pengenceran

- b) Jumlah ekstrak buah belimbing wuluh konsentrasi 100% yang diperlukan untuk masing-masing konsentrasi adalah sebagai berikut :
- (1) Konsentrasi 80% dibuat dengan menimbang 0,8 gram ekstrak buah belimbing wuluh konsentrasi 100% kemudian ditambahkan aquadest steril sampai tanda batas 1 ml pada tabung eppendorf
 - (2) Konsentrasi 60% dibuat dengan menimbang 0,6 gram ekstrak buah belimbing wuluh konsentrasi 100% kemudian ditambahkan aquadest steril sampai tanda batas 1 ml pada tabung eppendorf
 - (3) Konsentrasi 40% dibuat dengan menimbang 0,4 gram ekstrak buah belimbing wuluh konsentrasi 100% kemudian ditambahkan aquadest steril sampai tanda batas 1 ml pada tabung eppendorf
 - (4) Konsentrasi 20% dibuat dengan menimbang 0,2 gram ekstrak buah belimbing wuluh konsentrasi 100% kemudian ditambahkan aquadest steril sampai tanda batas 1 ml pada tabung eppendorf
- c) Cakram *disk* kosong disiapkan dan cakram *disk* ini diteteskan 20 μ l masing-masing konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram *disk*
- d) Untuk kontrol negatif digunakan cakram *disk* yang direndam ke dalam 20 μ l etanol 96%
- 3) Pembuatan media MHA (*Mueller Hinton Agar*)
- a) Bubuk media *Mueller Hinton Agar* ditimbang sebanyak 19,08 gram menggunakan neraca analitik.
 - b) Setelah proses penimbangan, bubuk media dipindahkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan 250 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 suhu media turun menjadi $\pm 40 - 50^{\circ}\text{C}$
 - h) Media dituangkan secara aseptis ke dalam *petridish* ± 15 ml, kemudian didiamkan hingga memadat.
 - i) Setelah media memadat, cawan petrik 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 suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes*
1. Satu sampai tiga ose koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* dari biakan murni diambil dan disuspensikan kedalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl fisiologis 0,85%
 2. Suspensi ini dibaca menggunakan densitometer standar 0,5 Mc Farland
- b. Tahap pemeriksaan
- 1) Suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan kepekatan 0,5 Mc Farland disiapkan
 - 2) Swab kapas steril disiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri 0,5 Mc Farland. Setelah suspensi bakteri meresap, swab kapas steril diangkat dan

diperas dengan cara menekankan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputas-putar

- 3) Swab kapas yang telah dicelupkan tadi digores-goreskan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan gores-goresan yang dilakukan secara merata
- 4) Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) didiamkan selama 5 sampai 15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam media
- 5) Masing-masing cakram *disk* kosong yang telah diisi dengan 20µl konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh dan kontrol yang berisi etanol 96% kemudian didiamkan selama 30 menit atau hingga mengering lalu ditempelkan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang sudah digoreskan suspensi bakteri dan sedikit ditekan dengan pinset sampai melekat sempurna
- 6) Kontrol kerja (antibiotik *Amoxicillin*) juga ditempelkan pada media MHA
- 7) Jarak antara cakram satu dengan cakram yang lain minimal 15 mm dan cakram yang telah ditempelkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan atau digeser
- 8) Media yang telah ditanami cakram *disk* diinkubasi pada suhu 37° C pada inkubator CO₂ 5% selama 24 jam dengan posisi terbalik
- 9) Diukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong

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*.

G. 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 diawali dengan uji *Kolmogorov Smirnov* untuk mengetahui distribusi data, apabila distribusi data normal digunakan *One Way Anova*, namun apabila distribusi data tidak normal maka digunakan *Kruskal-Wallis* terhadap variabel yang ada untuk mengetahui adanya perbedaan dari berbagai konsentrasi ekstrak buah Belimbing wuluh terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Analisis data dilakukan dengan beberapa tahap, antara lain:

- a. Untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak digunakan uji *kolmogorov smirnov*.
- b. Untuk mengetahui variasi zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan menggunakan ekstrak etanol buah Belimbing wuluh antara

konsentrasi 20, 40, 60 dan 80% apabila data berdistribusi normal digunakan uji *one way anova*.

- c. Untuk mengetahui variasi zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan menggunakan ekstrak etanol buah Belimbing wuluh antara konsentrasi 20, 40, 60 dan 80% apabila data berdistribusi tidak normal digunakan uji *kruskal walls*.
- d. Untuk mengetahui variasi zona hambat antara masing-masing konsentrasi ekstrak etanol buah belimbing wuluh yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*, uji statistik yang digunakan adalah LSD (*Least Significant Deference*)