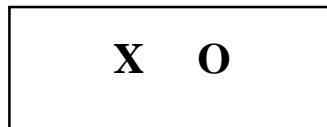


BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan jenis penelitian dengan rancangan penelitian yaitu *One-Shot Case Study* yang bertujuan untuk mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen (Sugiyono, 2017). Kontrol yang digunakan pada penelitian ini ada dua yaitu control penelitian dan control kerja yang dibuat dengan merendam cakram disk menggunakan Amoxicilin dan control penelitian menggunakan cakram disk yang direndam dengan VCO tunggal dan ekstrak daun gamal tunggal. Bentuk rancangan pada penelitian ini dapat dilihat di gambar 5.



Sumber : Sugiyono, 2017

Gambar 1. *One-Shot Case Study*

Keterangan :

- X : Treatment yang diberikan (variabel independen). Variabel independen yang dimaksud merupakan berbagai variasi konsentrasi kombinasi *Virgin Coconut Oil* (VCO) dan ekstrak daun gamal (*Gliricidia sepium*) menggunakan konsentrasi 15%, 20%, 30%, 45% dan 60%.
- O : Observasi (variabel dependen) yaitu diameter zona hambat yang terbentuk.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kemenkes Denpasar

2. Waktu Penelitian

Maret – April 2020

C. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun gamal (*Gliricidia sepium*) dan VCO . Terdapat lima perlakuan terhadap kombinasi VCO dan ekstrak daun gamal (*Gliricidia sepium*) yaitu konsentrasi 15%, 20%,30%, 45% dan 60% dengan empat kali pengulangan sehingga diperoleh sampel sebanyak 20 sampel.

Replikasi merupakan pengulangan perlakuan yang diberikan kepada unit kelompok eksperimen yang sama, pengulangan ini berfungsi meningkatkan keakuratan eskperimen atau mengurangi tingkat kesalahan dari suatu eksperimen (Triyanto, 2012). Menurut Hanafiah (2014), 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 semakin tinggi. Syarat minimal jumlah pengulangan yang bisa dilakukan untuk percobaan laboratorium dapat ditentukan dengan rumus *Federer* berikut (Hanafiah,2014):

$$(n-1).(t-1) \geq 15$$

$t =$ jumlah kelompok perlakuan (5 perlakuan variasi konsentrasi)

$r =$ jumlah ulangan

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

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

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

Berdasarkan perhitungan tersebut agar jumlah sampel memenuhi syarat maka jumlah ulangan minimal yang diperlukan adalah 5 kali pengulangan. Namun dalam penelitian ini digunakan empat kali pengulangan hal ini dikarenakan terbatasnya alat dan bahan yang tersedia di laboratorium. Maka pada penelitian ini jumlah sampel telah memenuhi syarat dimana terdapat lima kelompok perlakuan dengan jumlah pengulangan empat kali sehingga diperoleh sebanyak 20 sampel.

D. Unit analisis

Unit analisis sampel dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi kombinasi VCO dan ekstrak daun gamal yaitu 15%, 20%, 30%, 45%, 60%. Konsentrasi ini dipilih untuk mencari yang paling efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian adalah antibiotik Amoxicilin, karena Amoxicilin merupakan antibiotik bakteriosidal berspektrum luas yang aktif terhadap bakteri gram positif dan negative. Mekanisme kerja antibiotik ini melalui penghambatan sintesis dinding sel mikroba. Dan pelarut yang digunakan pada penelitian adalah Etanol.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang digunakan

Jenis data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah sumber data primer, dimana sumber data primer atau data asli adalah data yang diperoleh atau dikumpulkan langsung di lapangan oleh peneliti atau yang bersangkutan . Dalam penelitian ini data primer didapatkan yakni dengan melakukan eksperimen di dalam laboratorium dan data sekunder merupakan data yang diperoleh dari peneliti terdahulu . Data primer yang diperoleh berupa data dari hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada setiap perlakuan yang diberikan. Sedangkan data sekunder bersumber dari dokumen serta jurnal-jurnal ilmiah.

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 yang dihasilkan pada setiap unit analisis terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan metode *Kirby-Bauer*. Hasil pengukuran diameter zona hambat dari masing-masing unit analisis yang menunjukkan aktivitas penghambatan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm) kemudian disusun dalam bentuk tabel.

F. Instrumen Penelitian

1. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan untuk pengumpulan data pada penelitian ini adalah mistar, alat tulis, kamera dan peralatan laboratorium.

a. Alat dan Bahan

1) Alat

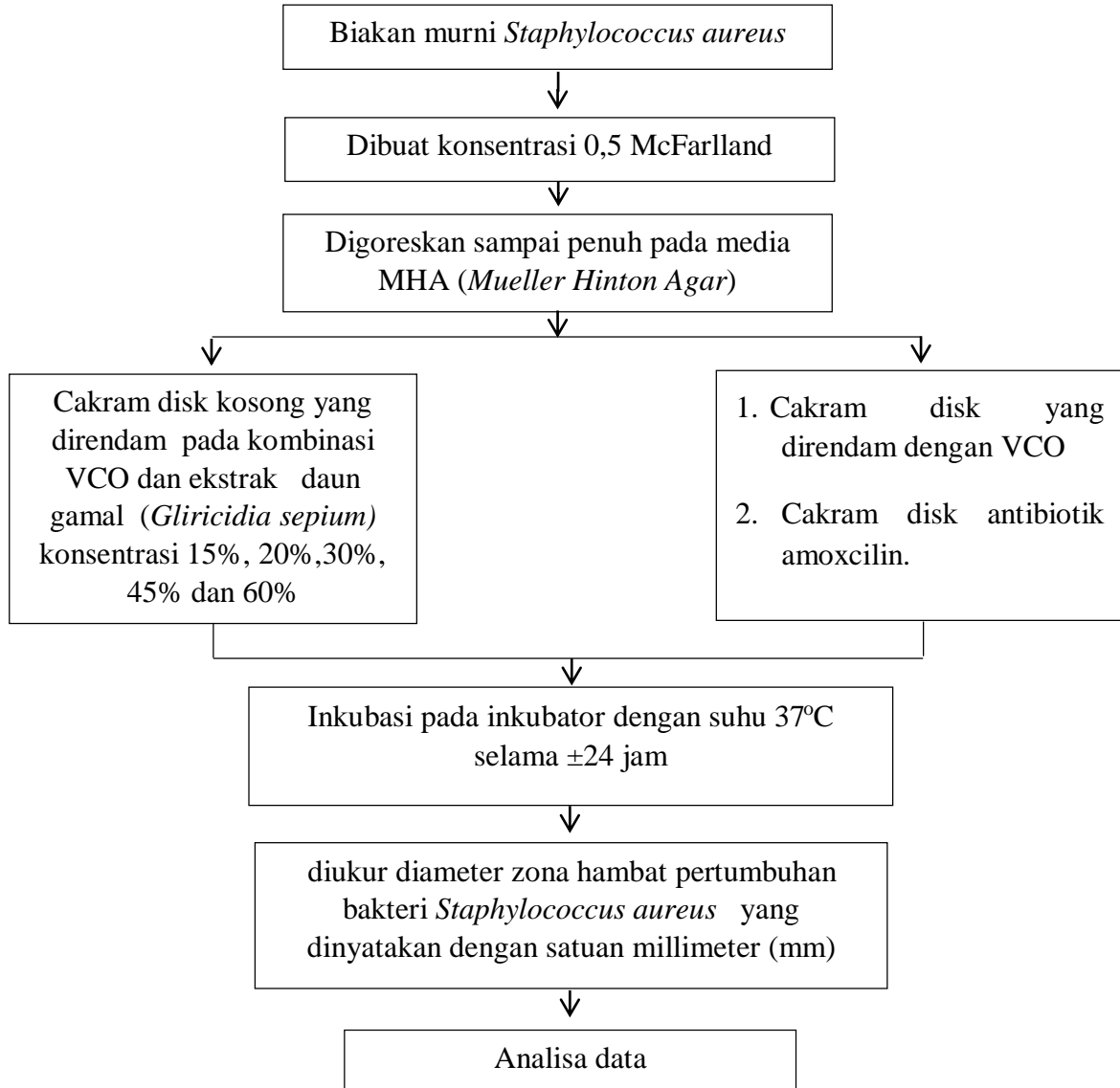
Alat yang diperlukan pada penelitian ini antar lain :biosafety cabinet (biobase), Mac Farland densitometer (biosan) (1 buah), inknbator (Escoa0 (1 buah), dan autoclave (Tomy sx-500), neraca analitik (radwag) (1buah) , mikropipet 20 µl-1000 µl (secorex), , evaporator (1 buah), beaker glass 50 ml dan 500 ml (1 buah, kasa steril (1buah), belender (philips) 1 buah, pisau (1 buah), pipet ukur (iwaki pyrex) 1 ml dan 10 ml (1buah), ball pipet (1buah) ,gelas ukur (iwaky-pyrex)) 100 ml dan 50 ml (masing-masing 1buah), spritus 1 buah, petridisk steril (7 buah), magnetic stirrer , mistar

2) Bahan

Bahan yang diperlukan pada penelitian ini antara lain : daun gamal (*Gliricidia sepium*) sebanyak tiga kilogram, (*Virgin Coconut Oil*) VCO, bakteri *Staphylococcus aureus*, Tween, media Muller Hinton Agar, cakram disk kosong (18 buah, cakram antibiotik 3 , tabung eppendorf (5 buah), yellow dan blue tip (masing-masing 20 buah), lisi kapas steril (1 buah) , Etanol dan aluminium foil, alcohol 70%, standar Mac Fallrand 0,5, NaCl fisiologis 0,9 % aquadest 1000 ml.

G. Kerangka Kerja dan Prosedur Kerja

1. Kerangka Kerja



Gambar 5. Kerangka kerja

2. Prosedur Kerja

a. Teknik Pengambilan Sampel

- 1) Memilih tempat untuk pengambilan sampel daun gamal (pengambilan sampel dilakukan .
 - 2) Mengambil daun gamal dengan jenis yang sama, daun diambil pada tangkai ketiga sampai tangkai kelima
 - 3) Pengambilan sampel diambil pada saat siang hari (dari jam 10 sampai jam 12).
Diambil secara langsung tanpa menggunakan alat khusus.
- b. Pembuatan simplisia
- 1) Pembuatan ekstrak dengan metode maserasi
 - 2) Daun gamal dipetik dari tangkai ketiga sampai keempat dan dipilih sesuai dengan kriteria sampel yang sudah ditentukan peneliti.
 - 3) Hingga diperoleh sebanyak tiga kg daun gamal.
 - 4) Selanjutnya daun dibersihkan dari kotoran dengan air bersih, lalu ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.
 - 5) Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sampai daun menjadi kering, kurang lebih selama 7 hari, kemudian dioven selama 2 hari (6 jam / per hari) pada suhu 40° C untuk memaksimalkan pengeringan.
 - 6) Bahan yang sudah kering kemudian ditimbang
 - 7) Setelah daun benar-benar kering, daun dihancurkan dengan alat blender, kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk halus.
 - 8) Serbuk simplisia ditimbang dan diuji kadar airnya (jika kadar air > 10 %, maka simplisia dioven kembali)
- c. Maserasi

- 1) Simplisia daun gamal ditimbang sebanyak 150 gram dan ditambahkan etanol 1000 mL kedalam beaker glass dan ditutup dengan aluminium foil
- 2) Maserasi dilakukan selama 7 hari (dilakukan pengadukan dengan magnetic stirrer 6 jam/hari)
- 3) Setelah 7 hari kemudian simplisia dari pelarutnya disaring menggunakan kertas saring.
- 4) Remaserasi dilakukan pada residu simplisia.
- 5) Setelah proses maserasi, filtrate maserasi pertama dan kedua digabungkan dan dilakukan pemekatan (evaporasi).

d. Evaporasi filtrat

- 1) Filtrate dari maserasi pertama dan kedua dituangkan ke labu penampung pada alat evaporator
 - 2) Proses evaporasi dilakukan dengan kondisi suhu waterbath 60°C. Hasil ekstraksi daun gamal yang dihasilkan ditampung pada tabung vial yang telah disiapkan dan kemudian ditimbang berat bersih ekstrak
- e. Pembuatan ekstrak daun gamal konsentrasi 15%, 20%, 30%, 45 % dan 60 %.

Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun gamal dengan VCO, dilakukan dengan mencampurkan kedua bahan menggunakan rumus

$$\% \frac{b}{b} = \frac{b_1}{(b_1 + b_2)} \times 100 \%$$

Persamaan (1)

Berdasarkan rumus tersebut, maka dapat dibuatkan tabel komposisi bahan setiap bahan setiap variasi konsentrasi dengan massa akhir 5 gram seperti pada tabel 5. Campuran ditambahkan Tween 80 agar terjadi pencampuran secara merata.

Tabel 5
Perbandingan pembuatan variasi konsentrasi ekstrak daun gamal

No	Konsentrasi ekstrak	B₁ (gram) Ekstrak	B₂ (gram) VCO
1	60 %	3 gram	2 gram
2	45 %	2,25 gram	2,75 gram
3	30 %	1,5 gram	3,5 gram
4	20 %	1 gram	4 gram
5	15 %	0,75 gram	4,25 gram

f. Pembuatan media Mueller Hinton Agar

- 1) Ditimbang sebanyak 19,08 gram medium dan ditambahkan sebanyak 250 ml aquadest (etikel media 38,0 gram medium disuspensikan ke dalam satu liter aquadest)
- 2) Medium dipanaskan selama satu menit pada hot plate sambil diaduk sampai serbuk benar-benar larut dan tercampur dengan sempurna
- 3) Masukkan ke dalam Erlenmeyer untuk disterilisai di dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan satu sampai dua atm
- 4) Setelah selesai, keluarkan dari autoclave dan tunggu hingga agak dingin ± suhu 40-45°C
- 5) Tuangkan ke dalam cawan petri (plate) masing-masing plate sebanyak 15 ml

- g. Pembuatan suspensi *Staphylococcus aureus*
- 1) Satu sampai tiga ose koloni *Staphylococcus aureus* dari biakan murni diambil dan disuspensikan ke dalam tabung yang bersisi 5 ml larutan NaCl fisiologis 0,85%
 - 2) Suspensi ini dibandingkan dengan kekeruhan standar 0,5 Mc Farland menggunakan alat densitometer
- h. Tahap pemeriksaan
- 1) Cakram disk kosong disiapkan dan cakram disk ini diteteskan 60 µl masing-masing konsentrasi ekstrak daun gamal hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram disk
 - 2) Swab kapas steril disiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah suspensi bakteri meresap, swab kapas steril diangkat dan diperas dengan cara menekannkan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar.
 - 3) Swab kapas yang telah dicelupkan tadi digores-goreskan pada permukaan media Mueller Hinton Agar (MHA) sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan-goresan yang dilakukan secara merata.
 - 4) Media Mueller Hinton Agar (MHA) didiamkan selama 5 sampai 15 menit untuk memberikan waktu bagi bakteri menempel pada media.
 - 5) Masing-masing disk cakram yang telah jenuh dengan konsentrasi ekstrak daun gamal dan kontrol penelitian yang berisi VCO dan kontrol positif disk antibiotik Amoxicilin kemudian ditempelkan pada permukaan media Mueller Hinton Agar (MHA) yang sudah digoreskan suspensi bakteri

- 6) Cakram disk ditempelkan dan sedikit ditekan-tekan pada media Mueller Hinton Agar (MHA) yang telah digoreskan suspensi bakteri tersebut
 - 7) Jarak antara cakram satu dengan cakram yang lainnya 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 selama 24 jam dengan posisi terbalik
- i. Pelaporan hasil
 - 1) Setelah inkubasi selama 24 jam dilihat zona hambat yang terbentuk dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong (satuan millimeter)
 - 2) Diameter zona hambat yang diukur yaitu daerah bening sekitar cakram disk (daerah yang tidak ada pertumbuhan bakteri) diukur dari ujung satu keujung yang lainnya melalui tengah-tengah disk

H. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang diperoleh melalui penelitian langsung di dalam laboratorium kemudian data yang diperoleh diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating (data disajikan dalam bentuk tabel) dan narasi (deskriptif).

2. Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis kuantitatif. Kegiatan analisis data dalam penelitian kuantitatif meliputi pengolahan dan penyajian

data, melakukan berbagai perhitungan untuk mendeskripsikan data, serta melakukan analisis untuk menguji hipotesis. Perhitungan dan analisis data kuantitatif dilakukan menggunakan teknik statistik. dilakukan dengan memakai uji statistic menggunakan bantuan perangkat lunak computer (*software*). Analisis data dilakukan dengan beberapa tahap, antara lain :

- a. Untuk menguji data distribusi normal atau tidak digunakan uji *Kolmogorov smirnov*. uji *Kolmogorov smirnov* merupakan analisis komparatif untuk menguji hipotesis keomparatif dua sampel yang independen dari dua atau lebih data ordinal.
- b. Untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 15%, 20%,30%, 45% dan 60% VCO yang disuplementasi dengan ekstrak Etanol daun gamal (*Gliricidia sepium*) apabila data distribusi normal maka digunakan uji *one way anova*. Uji One Way Anova merupakan pengujian hipotesis komparatif data interval atau ratio dari sampel (lebih dari dua sampel) yang berkolerasi dengan satu factor yang berpengaruh.
- c. Untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 15%, 20%,30%, 45% dan 60% VCO yang disuplementasi dengan ekstrak Etanol daun gamal (*Gliricidia sepium*) apabila data distribusi tidak normal digunakan uji *kriskal wallis*. Uji Kriskal Wallis merupakan pengujian hipotesis komparatif untuk data ordinal dari sampel jumlah 1 atau lebih yang idependen dengan satu factor yang berpengaruh sehingga merupakan alternative dari analisis varians satu arah.

d. Uji Statistik LSD (*Least Significant Deference*)

Uji ini digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.