

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian dengan metode eksperimental semu.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisa dan Instrumentasi Jurusan Teknik Kimia Universitas Sriwijaya untuk pembuatan ekstrak dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Madang untuk pengujian terhadap bakteri dari tanggal 23 April-18 Mei.

3.3 Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan bakteri *Streptococcus viridans*.

3.4 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan rumus Federer :³²

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

Keterangan: t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah pengulangan

Jumlah perlakuan ada 6, maka jumlah ulangan tiap perlakuan dapat dihitung:

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut didapat jumlah pengulangan dari masing-masing perlakuan adalah 4 kali pengulangan. Peneliti melebihi satu sampel menjadi 5 kali pengulangan untuk tiap kelompok perlakuan, sehingga total keseluruhan sampel sebanyak 30.

3.5 Pengelompokan Sampel

Sampel pada penelitian ini dibagi menjadi beberapa kelompok berdasarkan kelompok perlakuan dan besar konsentrasinya, yaitu:

1. Kelompok kontrol
 - a. Kelompok kontrol negatif : akuades
 - b. Kelompok kontrol positif : klorheksidin glukonat (CHX) 2%.
2. Kelompok perlakuan 1 : ekstrak buah pala dengan konsentrasi 4%.
3. Kelompok perlakuan 2 : ekstrak buah pala dengan konsentrasi 8%.
4. Kelompok perlakuan 3 : ekstrak buah pala dengan konsentrasi 12%.
5. Kelompok perlakuan 4 : ekstrak buah pala dengan konsentrasi 16%.

3.6 Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang ada pada penelitian ini adalah:

3.6.1 Variabel Terikat

Diameter zona hambat *Streptococcus viridans*

3.6.2 Variabel Bebas

Ekstrak buah pala dengan konsentrasi 4%, 8%, 12%, 16%.

3.6.3 Variabel Terkendali

1. Kriteria buah pala (buah muda utuh, berumur sekitar 4-5 bulan, kulit buah berwarna hijau, biji lembut dan lunak saat ditekan dengan ujung kuku ibu jari, berwarna putih dan tidak memiliki penyakit-penyakit tumbuhan).
2. Pengeringan buah pala
3. Waktu lamanya maserasi
4. Konsentrasi pengenceran

3.6.4 Variabel Tidak Terkendali

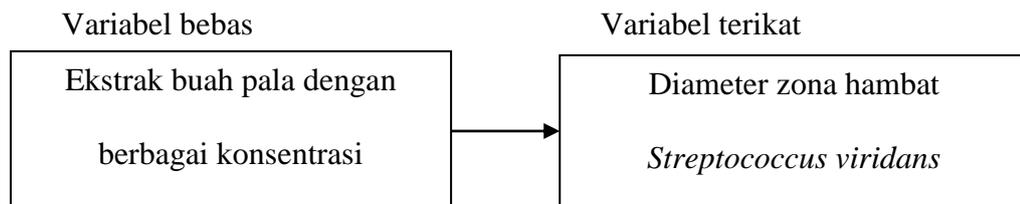
1. Proses penanaman buah pala.

3.7 Definisi Operasional

1. Daya antibakteri adalah kemampuan kerja ekstrak buah pala untuk menghambat pertumbuhan *Streptococcus viridans* dengan terlihatnya zona hambatan pertumbuhan bakteri di sekitar sumuran pada media agar.
2. Ekstrak buah pala adalah bentuk sediaan yang dibuat dari buah pala yang dikeringkan dan dihaluskan dengan blender hingga berbentuk serbuk. Serbuk tersebut dimaserasi dengan etanol 96% selama 3 hari dan dievaporasi sampai ekstrak menjadi pekat, kemudian dibuat dalam konsentrasi 4%, 8%, 12%, 16%.
3. Zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus viridans* adalah wilayah jernih pada media biakan *Streptococcus viridans* di sekitar sumuran yang telah ditetesi dengan berbagai kelompok perlakuan yang kemudian

diameter hambatnya diukur menggunakan jangka sorong. Data yang dihasilkan berupa data dengan skala ukur rasio.

3.8 Kerangka Konsep



3.9 Alat dan Bahan Penelitian

3.9.1 Alat

- a. *Petridish* (Pyrex, Japan) dan Ose
- b. *Disposable syringe* (Terumo, Japan)
- c. *Autoclave* (tipe HS-85E SN.AA 11003, Hanshin)
- d. Tabung *Erlenmeyer* dan pengaduk
- e. Tabung reaksi (Pyrex, Japan)
- f. Inkubator (Binder, Germany)
- g. Neraca (Ohaus, Germany)
- h. Gelas ukur
- i. Rak tabung reaksi
- j. Blender
- k. *Dry heat oven* (Mettler, Germany)
- l. *Rotary evaporator*
- m. Corong Saring
- n. Kompor

- o. Jangka sorong dengan derajat ketelitian 0,5 mm (Medesy, Italy)
- p. Spidol
- q. Pisau
- r. Masker
- s. *Handscoon*
- t. *Microwave*

3.9.2 Bahan

- a. Akuades steril (Aqua)
- b. Buah pala segar
- c. Media biakan : BHIB, BHIA
- d. Sediaan *Streptococcus viridans*
- e. Klorheksidin glukonat (CHX) 2%
- f. Etanol 96%
- g. Alkohol 70%

3.10 Prosedur Penelitian

3.10.1 Tahap Persiapan

- a. Sterilisasi Alat

Semua alat yang terbuat dari kaca dan logam dicuci bersih, kemudian dimasukkan kedalam *dry heat oven* selama 1 jam dengan suhu 170° C (340° F). Semua alat yang terbuat dari plastik dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian dibilas alkohol 70%.

b. Pembuatan Ekstrak Buah Pala

Pembuatan ekstrak buah pala dilakukan di laboratorium pengujian terpadu Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Sriwijaya. Lokasi pengambilan sampel di Kecamatan Padangsidimpuan Kab. Tapanuli Selatan, Provinsi Sumatera Utara. Sebanyak 9 kg buah pala segar dikupas kemudian dipotong dan dipisahkan antara daging, gada, dan biji. Biji pala diambil dan diiris tipis kemudian dicuci sampai bersih lalu dikeringkan selama 7 hari pada suhu kamar (25° C). Sampel dijauhkan dari panas, lembap, dan sinar matahari, setelah kering sampel dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk.²⁶ Serbuk buah pala kemudian dilarutkan selama 3 hari menggunakan bahan pelarut etanol 96% sebanyak 700 ml sampai seluruh bagian terendam, dan dilakukan pengadukan sesering mungkin selama proses perendaman. Serbuk buah pala yang dilarutkan tadi disaring menggunakan corong saring sehingga didapatkan ekstrak dalam bentuk cair. Ekstrak cair kemudian diuapkan sampai bebas dari pelarut etanol menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40° C selama 3 jam, sehingga menjadi ekstrak pekat dengan konsentrasi 100%, untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan maka digunakanlah rumus pengenceran.

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan:

M1 : Molaritas awal

M2 : Molaritas akhir

V1 : Volume awal (mililiter)

V2 : Volume akhir (mililiter)

Cara pengenceran :

1. Konsentrasi 100% diambil dari ekstrak pekat buah pala langsung, untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak yang diinginkan lainnya, konsentrasi pekat ekstrak buah pala (konsentrasi 100%) diambil sebanyak 2 ml, kemudian dilakukan penambahan akuades untuk mencapai volume akhir yang sesuai dengan hasil perhitungan.

2. Konsentrasi 4%

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100\% \times 2 = 4\% \times V2$$

$$1 \times 2 = 0,04 \times V2$$

$$V2 = 50 \text{ ml}$$

Volume hasil pengenceran ekstrak buah pala dari konsentrasi 100% menjadi konsentrasi 4% adalah 50 ml. Secara matematis, perlu penambahan akuades sebanyak 48 ml.

3. Konsentrasi 8%

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100\% \times 2 = 8\% \times V2$$

$$1 \times 2 = 0,08 \times V2$$

$$V2 = 25 \text{ ml}$$

Volume hasil pengenceran ekstrak buah pala dari konsentrasi 100% menjadi konsentrasi 8% adalah 25 ml. Secara matematis, perlu penambahan akuades sebanyak 23 ml.

4. Konsentrasi 12%

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100\% \times 2 = 35\% \times V2$$

$$1 \times 2 = 0,12 \times V2$$

$$V2 = 17 \text{ ml}$$

Volume hasil pengenceran ekstrak buah pala dari konsentrasi 100% menjadi konsentrasi 12% adalah 17 ml. Secara matematis, perlu penambahan akuades sebanyak 15 ml.

5. Konsentrasi 16 %

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100\% \times 2 = 16\% \times V2$$

$$1 \times 2 = 0,16 \times V2$$

$$V2 = 12,5 \text{ ml}$$

Volume hasil pengenceran ekstrak buah pala dari konsentrasi 100% menjadi konsentrasi 16% adalah 12,5 ml. Secara matematis, perlu penambahan akuades sebanyak 10,5 ml.

c. Persiapan media

1. Persiapan media BHI-B (Brain Heart Infusion Broth)

BHI-B sebanyak 3 gram ditimbang menggunakan neraca. Akuades steril sebanyak 100 ml diukur menggunakan gelas ukur. Kedua bahan tersebut dimasukkan dalam tabung *Erlenmeyer* dan diaduk dengan spatula sampai homogen, kemudian dipanaskan sampai mendidih. Media tersebut disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang steril akan tetap jernih dan menjadi keruh jika terkontaminasi.

2. Persiapan Media BHI-A (Brain Heart Infusion Agar)

Bubuk BHI-A sebanyak 7 gram ditimbang menggunakan neraca. Akuades steril sebanyak 150 ml diukur menggunakan gelas ukur. Bahan tersebut dimasukkan dalam tabung *Erlenmeyer*, kemudian diaduk dengan spatula sampai homogen, kemudian dipanaskan sampai mendidih. Tabung *Erlenmeyer* ditutup dengan kapas steril supaya tidak ada kontaminan yang masuk. Kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

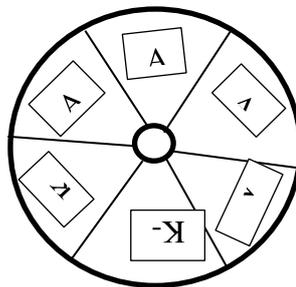
1. Persiapan kultur *Streptococcus viridans*

Sediaan bakteri *Streptococcus viridans* diambil 1 ose dari stok kuman yang telah diidentifikasi, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 2 cc media BHI-B, dimasukkan ke dalam *desicator* dan diinkubasi dalam inkubator

selama 1x24 jam dengan suhu 37°C. Bakteri distandarisasi dengan standar 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml), setelah diinkubasi.

3.10.2 Tahap Perlakuan

- a. Bagian bawah *petridish* yang akan diisi media BHI-A dan *Streptococcus viridans* dibagi menjadi 6 daerah yang masing-masing ditandai dengan menggunakan spidol, huruf A (A1-A4: untuk ekstrak buah pala) dengan berbagai konsentrasi, K- (kontrol negatif) dan K+ (kontrol positif). Pada bagian tengah diberi tanda nomor urut *petridish* 1 sampai 5 untuk membedakan ke-5 *petridish*. Ilustrasi penandaan bagian *petridish* sesuai kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 4.



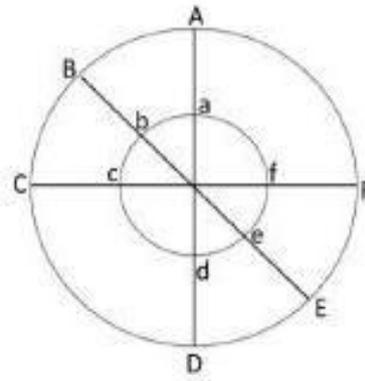
Gambar 3.1. Ilustrasi pembagian daerah perlakuan

- b. Media BHI-A hangat dituang kedalam *petridish* yang telah disterilisasi, masing-masing sebanyak 25 ml.
- c. Suspensi bakteri *Streptococcus viridans* diambil dari tabung reaksi menggunakan syringe sebanyak 0.5 ml, kemudian dituangkan kedalam media BHI-A yang steril dan masih cair. Suspensi bakteri *Streptococcus viridans* dibiarkan selama 15 menit agar dapat beradaptasi dengan media agar.
- d. Selanjutnya siapkan kertas cakram

- e. Kertas cakram diambil menggunakan pinset, kemudian dicelupkan pada ekstrak buah pala berdasarkan masing-masing konsentrasi, selanjutnya kertas cakram ditempelkan pada media agar, untuk K (+) kertas cakram diambil dan dicelupkan pada klorheksidin 2% kemudian ditempelkan pada media agar, dan untuk K(-) kertas cakram diambil lalu dicelupkan pada akuades kemudian ditempelkan pada media agar.
- f. Selanjutnya *Petridish* diinkubasi pada suhu 37% C selama 24 jam.

3.10.3 Tahap Pengukuran

- a. *Petridish* dikeluarkan dari inkubator setelah 24 jam, kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat dengan cara membalikkan *petridish* sehingga terlihat daerah hambatan yang kelihatan transparan (jernih) di sekitar kertas cakram.
- b. Pengukuran dilakukan dengan jangka sorong pada dua sisi yang berlainan (saling tegak lurus) dikurangi dengan diameter kertas cakram kemudian diambil rata-ratanya.
- c. Hasil penelitian dicatat sesuai dengan diameter zona hambat yang dihasilkan.



Gambar 3.2. Cara pengukuran diameter zona hambat

Keterangan gambar :

- Lingkaran tengah : kertas cakram
- Garis lurus : arah pengukuran zona hambat
- Pengukuran I (mm) : AD - ad
- Pengukuran II (mm) : BE - be
- Pengukuran III (mm) : CF - cf
- Zona hambat (mm) : (pengukuran I+ II+III) / 3

$$\text{Zona hambat} = \frac{(AD-ad) + (BE-be) + (CF-cf)}{3}$$

3.11 Analisis Data

Data yang didapat dalam penelitian berupa angka atau data numerik, yaitu angka diameter zona hambat yang dihasilkan. Data hasil penelitian dilakukan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitasnya, dan uji *Levene Test* untuk menguji homogenitasnya. Apabila kedua uji menunjukkan distribusi data normal dan homogen ($p > 0,05$), maka dilakukan uji *oneway ANOVA* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rata-rata zona hambat antar kelompok. Uji *Post Hoc* menggunakan *Bonferoni* dilakukan untuk mengetahui perbedaan yang bermakna mengenai zona hambat antar kelompok.

3.12 Alur Penelitian

