

## **BAB IV METODELOGI PENELITIAN**

### **A. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan desain penelitian experimental dengan metode dilusi cair dan padat untuk mengetahui adakah perbedaan antara pemberian ekstrak rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum rhizoma*) dan antibiotik ceftriaxone terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.

### **B. Populasi, Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel**

#### **1. Populasi**

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus pyogenes* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.

#### **2. Sampel**

Sampel adalah bakteri *Streptococcus pyogenes* yang disetarakan dengan larutan *Mc Farland* 0,5 (Djoko dkk, 2009).

#### **3. Jumlah Sampel**

Jumlah pengulangan sampel dalam penelitian ini dapat dihitung menggunakan rumus Federer (Haditomo, 2010) yaitu (n

- 1)  $(t - 1) \geq 15$ . Dimana  $n$  adalah besar sampel dan  $t$  adalah jumlah perlakuan. Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah 5 perlakuan, yaitu kontrol perlakuan yang terdiri dari ekstrak rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum rhizoma*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% dan antibiotik *ceftriaxon*. Sehingga perhitungannya:

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 20$$

$$n \geq 5$$

Dengan demikian besar sampel yang digunakan adalah 5 sampel pada masing-masing perlakuan. Jadi, total sampel keseluruhan dalam penelitian ini sebanyak 30 sampel.

#### 4. Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *simple random sampling* (Firdiana, 2010).

### C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*Independent*) dalam penelitian ini adalah ekstrak rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum rhizoma*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% dan antibiotik *ceftriaxone*.

2. Variabel terikat (*dependent*) dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.
3. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah penyimpanan kultur biakan, inokulasi bakteri, suhu inkubasi, sterilisasi alat, dan pemberian bahan uji.

#### **D. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2016. Tempat pengambilan rimpang jahe merah di Kebonsari baru selatan 4 No 11, Surabaya. Adapun penelitian dan pengambilan bakteri *Streptococcus pyogenes* akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Sedangkan ekstraksi rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum rhizoma*) ini akan diadakan di Laboratorium Fitokimia UPT Materia Medica Batu, Malang.

#### **E. Bahan dan Alat Penelitian**

##### **1. Bahan**

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus pyogenes*, ekstrak rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum rhizoma*), larutan standar *Mc Farland* 0,5, etanol 96%, aquadest, PZ, antibiotik *ceftriaxon*, media BAP.

## 2. Alat

Alat – alat yang yang digunakan pada penelitian ini adalah blender, *autoclave*, ayakan 60 mesh, *petridish*, water bath, *laminar flow*, *rotatory vacuum evaporator*, *inkubator*, mata ose, pipet tetes, pengaduk (spatula), bunsen, bulp, erlenmeyer, timbangan, penyaring kain, tissue , spidol permanen, toples, *shaker* digital.

## F. Definisi Operasional

**Tabel 4.1 Definisi Operasional**

No	Definisi Operasional	Pengertian	Alat ukur	Skala
1.	Ekstrak rimpang jahe merah ( <i>Zingiber officinale var rubrum rhizoma</i> )	Jahe merah siap panen yang didapat dari tempat budidaya jahe merah di daerah kebonsari baru selatan Surabaya. Jahe merah ini kemudian diekstrak dan dibuat lima konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan	Neraca, gelas ukur, dan pipet ukur	Ratio

		100%.		
2.	Pertumbuhan bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i>	Bakteri dinyatakan tumbuh apabila terdapat pertumbuhan pada medium penelitian yang dapat dilihat secara kasat mata dan kemudian dinyatakan dengan angka 1. Sedangkan bakteri dinyatakan tidak tumbuh apabila pada medium penelitian sama sekali tidak didapatkan pertumbuhan bakteri yang dilihat secara kasat mata dan kemudian dinyatakan dengan angka 0.	0 = Tidak ada pertumbuhan 1 = Ada pertumbuhan	Nominal
3.	Antibiotik ceftriaxon	Antibiotik diperoleh dari apotek Tambaksari Jl	Pipet ukur	Ratio

		Tambaksari 103, surabaya		
--	--	-----------------------------	--	--

### G. Prosedur Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode dilusi, dengan tahapan sebagai berikut:

1. Sterilisasi semua alat yang digunakan dalam penelitian dalam autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.
2. Sterilisasi sampel ekstrak rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum rhizoma*) dengan dilakukan kultur pada media BAP dengan inkubasi 37°C selama 24 jam.
3. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* dilakukan dengan mengambil biakan bakteri tersebut menggunakan ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi NaCl 0,85%, lalu dihomogenkan. Suspensi bakteri ini kemudian disamakan kekeruhannya dengan *Mc Farland* 0,5 setelah itu diencerkan 8x untuk menetapkan dan mengetahui bakteri per ml yang diinginkan dalam suspensi.
4. Pembuatan ekstrak rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum rhizoma*) dengan mengambil jahe siap panen dan masih segar.
  - a. Dibersihkan dan diiris tipis, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 55 °C.

- b. Irisan jahe merah yang telah kering dihaluskan atau diblender untuk mendapatkan serbuk jahe.
  - c. Serbuk jahe diayak menggunakan ayakan 60 mesh, kemudian ditimbang sebanyak 300 gram.
  - d. Masukkan serbuk yang telah ditimbang ke dalam toples, diratakan dan sambil ditambahkan pelarut etanol 96% sampai bahan terendam, total yang ditambahkan sebanyak 1,5 L. tutup toples dengan rapat selama 72 jam kemudian shaker diatas shaker digital 50 rpm.
  - e. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam *Erlenmeyer*.
  - f. Hasil ekstrak cair diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* selama 1 jam.
  - g. Ekstrak cair yang dihasilkan kemudian dievaporasi atau diuapkan kembali diatas *water bath* selama 2 jam.
  - h. Dari 300 gram serbuk rimpang jahe merah diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L dihasilkan ekstrak cair sebanyak 15 ml.
5. Pembuatan suspensi antibiotik dengan cara mencampur 1 gram antibiotik dalam bentuk serbuk dengan 10 ml aquadest. Kemudian kocok hingga melarut.
  6. Melakukan uji daya hambat dengan menyiapkan 6 tabung reaksi steril.

7. Satu tabung steril letakkan di rak tabung dengan urutan ke 1 berisi 0,2 ml ekstrak rimpang jahe merah + 0,8 ml aquadest steril + 1 ml bakteri *Streptococcus pyogenes* dan beri etiket dengan nama 20%.
8. Satu tabung steril letakkan di rak tabung dengan urutan ke 2 berisi 0,4 ml ekstrak rimpang jahe merah + 0,6 ml aquadest steril + 1 ml bakteri *Streptococcus pyogenes* dan beri etiket dengan nama 40%.
9. Satu tabung steril letakkan di rak tabung dengan urutan ke 3 berisi 0,6 ml ekstrak rimpang jahe merah + 0,4 ml aquadest steril + 1 ml bakteri *Streptococcus pyogenes* dan beri etiket dengan nama 60%.
10. Satu tabung steril lalu letakkan di rak tabung dengan urutan ke 4 berisi 0,8 ml ekstrak rimpang jahe merah + 0,2 ml aquadest steril + 1 ml bakteri *Streptococcus pyogenes* dan beri etiket dengan nama 80%.
11. Satu tabung steril letakkan di rak tabung dengan urutan ke 5 berisi 1 ml ekstrak rimpang jahe merah + 1 ml bakteri *Streptococcus pyogenes* dan beri etiket dengan nama 100%.
12. Satu tabung steril letakkan pada rak tabung urutan ke 6 dan beri etiket dengan penulisan antibiotik yaitu dengan menambahkan 1 ml antibiotik *ceftriaxon* + 1 ml bakteri *Streptococcus pyogenes*.
13. Menginkubasi semua tabung reaksi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator.
14. Pengamatan hasil biakan bakteri dilihat dari tabung pengenceran yang mengalami kekeruhan atau jernih. Keruh menunjukkan bahwa terdapat pertumbuhan bakteri. Jernih menunjukkan bahwa tidak terdapat



pertumbuhan bakteri. Namun, biasanya akan sulit untuk mengamati ada tidaknya pertumbuhan melalui kekeruhan karena dapat menimbulkan bias pada hasil penelitian. Oleh karena itu dilakukan tes penegasan yaitu uji dilusi padat, dengan menanam seluruh pengenceran pada media BAP kemudian diinkubasi pada inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

15. Mengamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

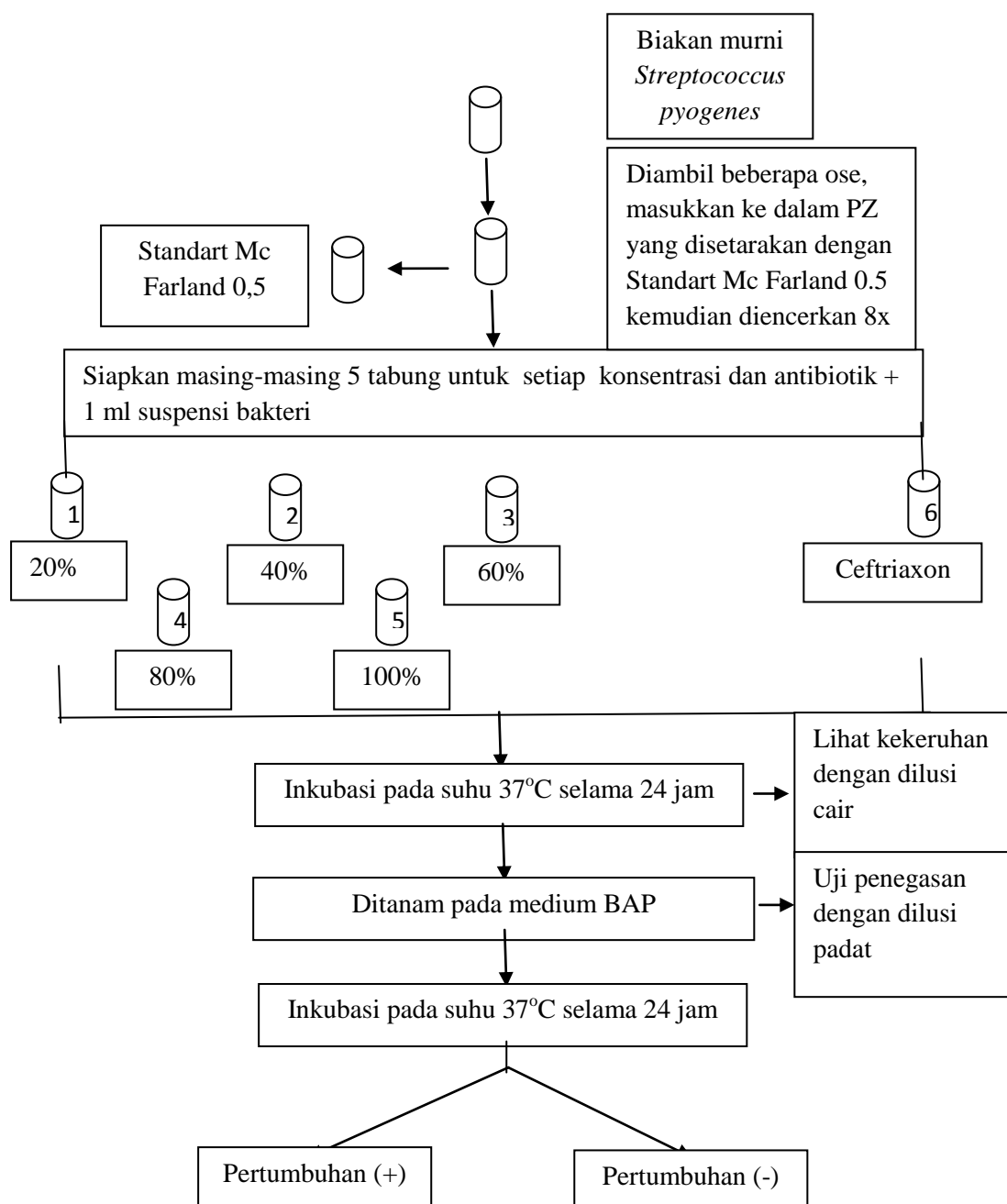
Jika pada keesokan harinya terdapat pertumbuhan bakteri maka akan terbentuk koloni kuman pada medium BAP secara kasat mata. Sedangkan dinyatakan tidak ada pertumbuhan apabila pada medium BAP bersih atau tidak terbentuk koloni secara kasat mata.

16. Setelah penelitian selesai pembuangan limbah bakteri hasil penelitian dilakukan sesuai dengan SOP laboratorium:

- a. Limbah medis harus dipisahkan antara benda tajam dan yang lainnya seperti masker dan sarung tangan. Benda tajam dimasukkan pada tempat sampah medis berwarna kuning, sedangkan untuk masker ditempatkan pada sampah medis warna biru.
- b. Limbah medis berupa bakteri pathogen dilakukan sterilisasi lagi menggunakan *autoclave* untuk mematikan bakterinya. Kemudian dimasukkan ke dalam keranjang sampah tersendiri.

17. Tahap pembuatan ekstrak sampai dengan perlakuan pada bakteri dilakukan oleh peneliti dengan bantuan tenaga laboratorium bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya dan tenaga laboratorium Fitokimia UPT Materia Medica Batu, Malang.

### H. Alur Penelitian



Keterangan:

1. Tabung 1 (20%) : 0,2 ml ekstrak rimpang jahe merah + 0,8 ml aquadest steril + 1 ml bakteri *Streptococcus pyogenes*
2. Tabung 2 (40%) : 0,4 ml ekstrak rimpang jahe merah + 0,6 ml aquadest steril + 1 ml bakteri *Streptococcus pyogenes*
3. Tabung 3 (60%) : 0,6 ml ekstrak rimpang jahe merah + 0,4 ml aquadest steril + 1 ml kuman *Streptococcus pyogenes*
4. Tabung 4 (80%) : 0,8 ml ekstrak rimpang jahe merah + 0,2 ml aquadest steril + 1 ml kuman *Streptococcus pyogenes*
5. Tabung 5 (100%) : 1 ml ekstrak rimpang jahe merah + 1 ml kuman *Streptococcus pyogenes*
6. Tabung 6 (Ceftriaxon) : 1 ml antibiotik *ceftriaxon* + 1 ml kuman *Streptococcus pyogenes*

## I. Analisis Data

Teknik analisis data yang dipakai untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan antara pemberian ekstrak rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum rhizoma*) dan antibiotik *ceftriaxon* terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* adalah uji *Mann Whitney* karena berdasarkan tujuannya, penelitian ini termasuk jenis penelitian komparatif dengan variabel numerik dua kelompok tidak berpasangan. Akan tetapi, sebelumnya harus dilakukan uji homogenitas dan uji normalitas terlebih dahulu. Uji *Mann Whitney* dilakukan apabila sebaran data tidak normal. Hasil  $p\text{-value} < 0,05$  berarti terdapat perbedaan bermakna sedangkan bila  $p\text{-value} > 0,05$  berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Untuk menentukan konsentrasi paling efektif dari ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri cukup dilihat berdasarkan nilai *Modus* dari data yang disajikan karena termasuk skala data nominal.