

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris murni secara *in vitro*.

Lokasi dan waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

- a. Pembuatan ekstrak kulit nanas dilakukan di Laboratorium penelitian Farmasi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
- b. Pembuatan obat kumur ekstrak etanol kulit nanas di Laboratorium Teknologi Farmasi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
- c. Pengujian pengaruh ekstrak kulit nanas terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* di lakukan di Laboratorium Mikrobiologi , FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini di lakukan pada bulan Februari-Agustus 2017.

Populasi dan Sampel Penelitian

1. Bahan uji

Kulit buah Nanas (*Ananas comosus (L.)Merr.*)

2. Bakteri uji

Bakteri *Streptococcus mutans* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari laboratorium mikrobiologi, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada

Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh

Konsentrasi ekstrak kulit nanas dalam bentuk obat kumur dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%

2. Variabel terpengaruh

Hambatan pertumbuhan *Streptococcus mutans* yang dinyatakan dalam diameter zona hambat.

3. Variabel terkendali

- a. Suhu inkubator
- b. Lama inkubasi 24 jam
- c. Volume obat kumur (10 ml)
- d. Spesies Kulit buah nanas yang di gunakan.
- e. Jenis media kultur *Streptococcus mutans* adalah triton soya agar (TSA)

4. Variabel tak terkendali

- a. Zat aktif yang terkandung dalam ekstrak kulit buah nanas

Definisi Operasional variabel

1. *Streptococcus mutans* adalah bakteri gram positif yang berbentuk bulat, tidak bergerak, tidak berspora, dan bersifat fakultatif anaerob.
2. Kulit nanas adalah bagian terluar dari buah nanas yang memiliki struktur tidak rata dan berduri kecil pada permukannya.
3. Ekstrak etanol kulit buah nanas adalah sari pekat kulit buah nanas yang mengandung zat aktif yang terkandung dalam kulit nanas tersebut,

sehingga menjadi bentuk sediaan ekstrak kental dengan menggunakan metode maserasi.

4. Obat kumur ekstrak etanol kulit buah nanas adalah sediaan obat kumur yang dibuat dari campuran ekstrak etanol kulit buah nanas, bahan perasa, pemanis, pengawet, dan aquadest, yang kemudian dilakukan uji antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.
5. Efektifitas antibakteri ekstrak etanol kulit nanas adalah kemampuan ekstrak kulit nanas menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* yang ditentukan dengan diameter zona hambatan pertumbuhan *Streptococcus mutans*.
6. Diameter zona hambat adalah diameter tempat dimana tidak terdapat pertumbuhan bakteri akibat antibakteri atau antimikroba pada media agar.

Alat dan bahan penelitian

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian ditampilkan pada tabel 1.

Tabel 1. Bahan-bahan penelitian

NO	BAHAN	NO	BAHAN
1.	Kulit nanas (<i>Ananas comosus (L.) Meer</i>)	12.	Masker
2.	Bakteri <i>Streptococcus mutans</i>	13.	Kapas
3.	Larutan NaCl	14.	Bubuk Zn
4.	etanol 70%	15.	HCl 2N
5.	Aquadest	16.	HCl pekat
6.	Sorbitol (pemanis)	17.	Reagen FeCl ₃
7.	Peppermint oil (perasa)	18.	Pereaksi sitroborat
8.	Media brain heart infusion (BHI)	19.	N-heksan
9.	Media trypticase soy agar (TSA)	20.	Etil asetat
10.	Kapas lidi steril	21.	Silica gel GF254
11.	Handscone	22.	Betadine obat kumur

Atal-alat yang digunakan dalam penelitian ini ditampilkan pada tabel 2.

Tabel 2. Alat penelitian

NO	ALAT	NO	ALAT
1.	Ose steril	12.	Labu takar
2.	Lampu spirtus	13.	Erlenmeyer
3.	Corong bunchner	14.	Botol steril
4.	Kertas saring	15.	Mikro pipet
5.	Waterbath	16.	Pisau steril
6.	Inkubator	17.	Kertas label
7.	Cawan petri	18.	Lebari aseptis
8.	Laminar air flow	19.	Kertas cakram
9.	Timbangan digital	20.	Kapas steril
10.	Rotary vaccum evaporator	21.	Lemari pendingin
11.	Gelas ukur	22.	Oven memmert

Jalannya Penelitian

1. Penyiapan alat dan bahan

Penyiapan alat dan bahan serta sterilisasi alat yang digunakan. Alat-alat yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan. Botol steril dan gelas ukur ditutup mulutnya dengan kapas yang dibalut dengan kain kasa steril, kemudian dibungkus dengan aluminium foil. Cawan petri dibungkus dengan aluminium foil. Kemudian seluruh alat ini disterilkan dalam autoklaf pada suhu

121°C tekanan 2 atm selama 20 menit. Pinset dan jarum ose disterilkan dengan cara flambier pada nyala lampu spiritus. Lemari aseptis dibersihkan dari debu, lalu disemprotkan etanol 70% dibiarkan selama 15 menit sebelum digunakan.

2. Pembuatan ekstrak kulit buah nanas

Sebanyak 1000 gram kulit nanas (*Ananas comosus (L.) Meer*) yang masih segar dicuci dengan air mengalir sampai bersih lalu dipotong menjadi beberapa bagian. Kulit buah nanas tersebut selanjutnya dikeringkan dalam suhu 50°C . Setelah mendapat kulit nanas yang sudah kering kemudian timbang menggunakan timbangan dan didapatkan 200 gram simplisia. simplisia kering kemudian dihaluskan dengan blender. Simplisia yang telah halus diayak menggunakan ayakan berukuran 20 mesh dan di peroleh simplisia halus sebesar 182 gram. Selanjutnya kulit buah nanas kering dimaserasi dengan pelarut etanol 70% selama 3×24 jam (tiap 24 jam dikocok) lalu dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring. Dilakukan pengulangan yang sama hingga hari ke 9 dengan penggantian pelarut setiap 3 hari sekali. Hasil yang diperoleh disaring menggunakan corong. simplisia direndam dalam bejana atau toples tertutup dengan perbandingan 1: 10 b/v selama 3 x 24 jam (tiap 24 jam di lakukan penggojogan secara berkala) lakukan pengulangan yang sama hingga hari ke 9 dengan pergantian pelarut setiap 3 hari sekali. Hasil rendaman yang di dapat kemudian di saring menggunakan kain flanel dilanjutkan dengan menggunakan kertas saring .dari proses maserasi diperoleh ekstrak cair sebanyak 1,8 liter yang kemudian diuapkan sampai bebas dari pelarut etanol menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C dan dilakukan pengentalan menggunakan *waterbath*. Sehingga didapatkan ekstrak kental dengan

konsentrasi 100% sebesar 69,75 gram. Estrak kental kulit nanas berwarna coklat pekat dengan bau khas buah nanas manis .

3. Uji identifikasi ekstrak

Pada penelitian ini dilakukan uji pendahuluan yang berupa uji kualitatif profil kimia. Tujuannya yaitu untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang ada dalam ekstrak kulit buah nanas (*Ananas comosus (L.) Meer*)

a. Uji kandungan flavonoid

Analisis kualitatif flavonoid dilakukan dengan menimbang 0,5 gram ekstrak kental dilakukan dalam 25 ml air hangat. Pisahkan 5 ml filtrat, tambahkan 250 mg serbuk zn, beberapa tetes HCl 2N dan HCl pekat. Jika terjadi perubahan warna menjadi merah maka positif mengandung flavonoid (Mangunwardoyo, 2009).

b. Uji kandungan tanin

0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 ml air hangat. Bagi dalam 2 tabung. 1 tabung sebagai pembanding dan 1 lainnya sebagai uji. Tabung uji di teteskan FeCl_3 0,1 N. Jika terjadi perubahan warna menjadi biru hitam atau biru coklat menunjukkan adanya senyawa tanin dalam ekstrak (Mangunwardoyo, 2009)

4. Uji kromatografi lapis tipis (KLT)

Uji dengan metode KLT dilakukan dengan menggunakan fase gerak *n*-heksan:etil asetat (4:1) dan fase diam silica gel GF 254 dengan ukuran 3x10 cm. Cara kerja uji dengan metode ini yaitu pertama timbang 0,5 gram ekstrak kental kulit buah nanas, larutkan dalam etanol 70%.

Saring filtrat dengan kertas saring . Totolkan filtrat yang sudah disaring dengan pipa kapiler dengan beberapa kali toloan pada kedua plat silika. Masing-masing plat di beri 2 lokasi toloan yang berjarak 1 cm. Angin-anginkan sampai kering. Buat larutan eluen dalam bejana elusi yang berupa campuran *n*-heksan:etil asetat (4:1). Berkan kertas saring untuk mengetahui bahwa larutan sudah jenuh. Jika larutan eluent sudah jenuh maka masukkan plat dalam bejana. Tunggu sampai larutan eluent mencapai batas atas plat silika, yaitu 1 cm sebelum ujung plat. Angkat dan keringkan plat.

Hasil dapat diamati dengan melihat warna bercak yang timbul di bawah sinar tampak,sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Bercak dapat diamati lebih jelas dengan dilakukan reaksi penyemprotan. Kemudian hitung nilai Rf nya dengan rumus berikut :

Rf = jarak yang ditempuh oleh sampel / jarak yang ditempuh oleh pelarut

Analisis senyawa dengan KLT terhadap ekstrak etanol 70% kulit buah nanas (*Ananas comosus (L.) Meer*) dilakukan dengan ketentuan sebagai berikut :

- a. Tanin : fase diam : silica gel GF 254 , fase gerak : n-heksan:etil asetat (4:1)
, Deteksi : sinar tampak ,sinar UV 254nm ,UV 366nm, FeCl₃
- b. Flavonoid : fase diam : silica gel GF254 , fase gerak : n-heksan:etil asetat (4:1) , Deteksi : sinar tampak,sinar UV 254 nm , UV 366 nm, sitroborat

5. Pembuatan Obat Kumur

Kulit buah nanas (*Ananas comosus (L.) Meer*) yang telah diekstrak di laboratorium dibuat dalam bentuk obat kumur. Obat kumur dibuat dalam berbagai konsentrasi seperti pada tabel 3.

Tabel 3. Komposisi obat kumur ekstrak etanol kulit *Ananas comosus (L.) Meer*.

Bahan	Formula					Kontrol Negarif Aquades	Kontrol VI Positif Betadine
	I 10%	II 20%	III 30%	IV 40%	V 50%		
Ekstrak etanol (gr)	1	2	3	4	5	0	Obat Kumur Betadine
Peppermint oil (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
Sorbitol (g)	2	2	2	2	2	2	
Aquades ad (ml)	10	10	10	10	10	10	
Volume akhir (ml)	10	10	10	10	10	10	

a. Formula 1

Ekstrak etanol kulit nanas 1 gram dilarutkan dalam sorbitol sebanyak 2 ml menggunakan cawan porselin dan sendok stainless. Kemudian dimasukan 0,1 ml *peppermint oil*, dan ditambahkan 5 ml aquadest ke dalam campuran. larutan tersebut dipindahkan ke dalam gelas ukur, setelah itu dimasukan aquadest hingga volume 10 ml.

b. Formula 2

Ekstrak etanol kulit nanas 2 gram dilarutkan dalam sorbitol sebanyak 2 ml menggunakan cawan porselin dan sendok stainless. Kemudian dimasukan 0,1 ml *peppermint oil*, dan ditambahkan 5 ml aquadest ke dalam campuran. larutan

tersebut dipindahkan ke dalam gelas ukur, setelah itu dimasukan aquadest hingga volume 10 ml.

c. Formula 3

Ekstrak etanol kulit nanas 3 gram dilarutkan dalam sorbitol sebanyak 2 ml menggunakan cawan porselin dan sendok stainless. Kemudian dimasukan 0,1 ml *peppermint oil*, dan ditambahkan 5 ml aquadest ke dalam campuran. larutan tersebut dipindahkan ke dalam gelas ukur, setelah itu dimasukan aquadest hingga volume 10 ml.

d. Formula 4

Ekstrak etanol kulit nanas 4 gram dilarutkan dalam sorbitol sebanyak 2 ml menggunakan cawan porselin dan sendok stainless. Kemudian dimasukan 0,1 ml *peppermint oil*, dan ditambahkan 5 ml aquadest ke dalam campuran. larutan tersebut dipindahkan ke dalam gelas ukur, setelah itu dimasukan aquadest hingga volume 10 ml.

e. Formula 5

Ekstrak etanol kulit nanas 5 gram dilarutkan dalam sorbitol sebanyak 2 ml menggunakan cawan porselin dan sendok stainless. Kemudian dimasukan 0,1 ml *peppermint oil*, dan ditambahkan 5 ml aquadest ke dalam campuran. larutan tersebut dipindahkan ke dalam gelas ukur, setelah itu dimasukan aquadest hingga volume 10 ml.

6. Pembuatan Media Agar

Media agar dibuatkan terlebih dahulu sebelum dilakukan pembiakan bakteri. Media ini berfungsi sebagai tempat untuk membiakkan bakteri yang akan

diuji. Pada penelitian ini media bakteri yang dibuatkan adalah media *Agar*. Media yang telah dibuat kemudian disterilkan didalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah disterilkan media disimpan didalam kulkas. Jika akan digunakan, media dipanaskan kembali hingga mendidih lalu dituangkan ke dalam cawan petri dan ditunggu sampai dingin.

7. Pemiakan Bakteri *Streptococcus mutans*

Bakteri *Streptococcus mutans* yang akan digunakan dalam penelitian ini berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Pemiakan bakteri dilakukan pada suasana aerob. Pemiakan bakteri *Streptococcus mutans* dilakukan pada cawan petri berisi media padat *Agar* yang telah disiapkan pada prosedur sebelumnya. Biakan bakteri ini akan diinkubasi dalam suasana aerob pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati apakah bakteri *Streptococcus mutans* murni telah tumbuh.

8. Uji Daya Hambat dengan Metode Difusi Sumuran *Agar (Well diffusion method)*

Urutan prosedur kerja untuk uji daya hambat kulit nanas adalah sebagai berikut:

a. Media agar sebanyak 15 ml dituang ke dalam masing-masing cawan petri steril dan didiamkan sampai media menjadi padat selama 15 menit. Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah disuspensi sebelumnya sebanyak 1 - 2 ose dari biakan murni bakteri dengan menggunakan NaCl 0,9% disebar diatas medium *Agar* dengan menggunakan *cotton bud* steril lalu dilakukan usapan atau goresan secara rapat ke seluruh permukaan cawan petri yang berisi *Agar*.

- b. Kemudian kertas cakram berukuran 5 mm diletakan pada masing-masing cawan petri dan ditetesi dengan obat kumur.
- c. Media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,01 mm dan daerah zona hambat diukur sesuai metode pengukuran.

9. Uji Karakteristik Fisik obat kumur

Evaluasi karakteristik fisik formula akan dilakukan setelah sediaan dibuat yaitu melalui uji organoleptis, pengukuran pH dan homogenitas. Dari 5 formulasi yang dibuat, nanti akan diperoleh formula yang mempunyai konsentrasi fisik yang baik, namun masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Evaluasi karakteristik fisik yang akan dilakukan adalah sebagai berikut:

- a. Pengamatan organoleptis: Pengamatan organoleptis merupakan uji yang dilakukan secara mikroskopis dengan memeriksa warna, bau, dan bentuk sediaan.
- b. Pengukuran pH : Pengukuran pH gel dilakukan menggunakan pH indikator. Pemilihan alat ini untuk memastikan bahwa pH sediaan sesuai dengan syarat pembuatan sediaan obat kumur yaitu pada tentang pH 5-6 (Sakinah et al.,2016)
- c. Homogenitas : uji ini dilakukan pengamatan secara mikroskopis.

10. Uji Antibakteri

Penelitian in vitro tentang efektivitas obat kumur ekstrak etanol kulit nanas (*Ananas comosus* (L.) Meer) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus*

mutans. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas sediaan obat kumur ekstrak etanol kulit nanas terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

Metode uji antibakteri yang digunakan adalah metode kirby-bauer *discdiffusion suspencitibility test* atau yang dikenal sebagai metode difusi cakram. Daya antibakteri ditandai dengan adanya zona hambat . Zona hambat adalah area bening yang ada disekitar kertas cakram. Semakin besar zona bening yang timbul maka semakin besar daya antibakterinya (Fuad, 2015). Kertas cakram yang digunakan dalam penelitian ini berdiameter 5 mm. Media yang digunakan adalah TSA (*Trypticare soy agar*) dan BHI (*Brain haert infusion*) sebagai nutrient. Media ini merupakan media yang umum di gunakan dalam uji mikrobiologi. Karena hampir semua bakter dapat tumbuh dalam media ini.

Proses persiapan uji antibakteri diawali dengan dilakukan sterilisasi alat yang akan digunakan dalam uji ini. Sterilisasi merupakan suatu proses penghilangan segala sesuatu yang hidup. Steriliasasi alat dilakukan dengan metode panas kering yaitu dengan oven. Alat-alat yang digunakan untuk kerja aseptis disiapkan dengan cara sebagai berikut. Tabung reaksi dan erlenmeyer ditutup dengan kapas pada bagian mulutnya. Kertas cakram yang akan di gunakan dimasukkan ke dalam cawan petri. Kemudian, semua alat di atas beserta cawan petri, ose, dan lidi kapas masing-masing dibalust dengan kertas koran. Alat-alat tersebut disterilkan dalam oven pada suhu 160°C selama 30 menit.

Persiapan lainnya yaitu dilakukan peremajaan bakteri pada media nutrient agar (NA). Media NA padat yang digunakan dalam penelitian ini sudah tersedia di laboratorium dan siap dipakai oleh peneliti. dipemindahan biakan murni bakteri

Streptococcus mutans dilakukan dari media padat ke media padat. Kemudian mulut cawan petri yang berisi media dipanasi. Buka tabung berisi kultur bakteri yang akan dipindahkan, panasi mulut tabung dengan lampu spirtus. Panasi ose steril dengan lampu spirtus sampai merah. Ambil 1 ose biakan dari agar miring, goreskan miring pada permukaan media agar secara merata. Dipanasi kembali mulut tabung, tutup dengan kapas dan plastic wrap. Inkubasi dengan oven pada suhu 37°C selama 24 jam.

Proses selanjutnya adalah pembuatan suspensi bakteri. Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diremajakan dibuat suspensi dengan NaCl steril 0,9% . Ose steril dipanasi dengan lampu spirtus sampai merah. Kemudian ambil 1 ose bakteri yang telah diremajakan dan dilarutkan dalam 2 ml NaCl 0,9 % . Suspensi bakteri diinkubasi dengan oven pada suhu 37°C selama 3 jam. Nutrient BHI yang sudah disiapkan sebanyak 9 ml dalam tabung reaksi. Kemudian diambil 1 ml suspensi bakteri dan dimasukkan ke dalam nutrient BHI yang sudah disiapkan.

Uji antibakteri sediaan obat kumur ekstrak kulit nanas terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dilakukan dengan metode difusi cakram. Sebelum uji dilakukan pemindahan bakteri dari media cair ke media padat. Panaskan mulut cawan petri berisi media agar. Celupkan lidi kapas ke dalam suspensi bakteri, goreskan secara merata pada media agar. Tiap media yang digunakan dibagi menjadi 7 bagian. yaitu uji formula 1, formula 2, formula 3, formula 4, formula 5 pembanding dan kontrol negatif. Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest. Pembanding yang digunakan adalah produk obat kumur

dengan brand betadine obat kumur. Yang ada di pasaran dengan kandungan zat aktif povidone-iodine 1%. Pemilihan sediaan ini didasarkan pada penelitian yang menunjukkan bahwa obat kumur yang mengandung povidone-iodine ampuh menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

dituangkan sedikit sediaan uji ke dalam cawan petri. Kertas cakram yang berdiameter 5 mm di rendam dalam masing-masing sediaan uji selama 2 menit. Pinset steril dipanaskan dengan lampu spirtus sampai merah. Ambil dan tempelkan kertas cakram pada media agar yang telah digosokan suspensi bakteri. Tutup dan panasi mulut cawan petri untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi. Uji ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Selanjutnya, diinkubasi dalam oven pada suhu 37°C selama 24 jam.

Diameter zona radikal atau zona hambat yang terbentuk diukur dengan penggaris milimeter. Pengukuran zona hambat pada penelitian dilakuka setelah diinkubasi selama 24 jam dengan mengukur diameter zona bening di sekitar kertas cakram yang tidak ditumbuhi koloni bakteri.

Diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* adalah diameter dimana bakteri *Streptococcus mutans* tidak tumbuh disekitar cakram yang ditandai dengan adanya daerah bening yang diukur dengan satuan milimeter.

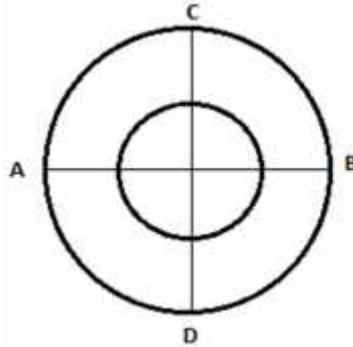
Cara ukur : mengukur diameter terluar zona bening disekitar cakram

Alat ukur : jangka sorong

Hasil ukur : diameter terpanjang (mm) zona bening

Skala ukur : rasio

Cara pengukuran zona hambat dapat dilihat pada gambar berikut :



Pengukuran I = AB

Pengukuran II = CD, Zona hamba = $\frac{\text{Pengukuran I} + \text{II}}{2}$

klasifikasi respon hambatan pertumbuhan

bakteri yang dilihat berdasarkan diameter zona bening Klasifikasi Diameter Zona

Bening dan Respon Hambat Pertumbuhan Bakteri

Diameter Zona Bening Respon Hambatan Pertumbuhan

1. ≥ 20 mm : Sangat kuat
2. 10-20 mm : Kuat
3. 5-10 mm : Sedang
4. ≤ 5 mm : Lema

Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif. Analisis data yang diteliti yaitu hasil dari uji antibakteri dengan melihat diameter zona hambat obat kumur ekstrak kulit buah nanas (*Ananas comosus*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

Data hasil uji antibakteri yang diperoleh kemudian diolah menggunakan SPSS , ada 3 tahapan yang akan dilakukan yaitu :

1. Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui apakah data pada masing-masing kelompok terdistribusi normal ($p > 0,05$)
2. Uji *One Way ANOVA* dengan tingkat kemaknaan ($p < 0,05$) untuk melihat efek antibakteri pada semua kelompok perlakuan mempunyai varians yang sama atau berbeda. Uji *One Way ANOVA* ini digunakan pada distribusi data populasi atau sampel yang akan diuji normal dengan nilai signifikansi yang diperoleh lebih kecil dari 0,05.
3. Uji selanjutnya dengan uji *LSD (Least Significant Different)* , uji ini digunakan untuk menjabarkan lebih detail mengenai perbedaan efek antibakteri pada masing-masing kelompok dan membandingkan masing-masing kelompok dengan kontrol positif dan kontrol negatif.

Skema langkah kerja