

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian Eksperimental Semu (*Quasi experimental*). Pada penelitian ini digunakan rancangan *Posttest Only Control Group Design*. Bentuk rancangan yang digunakan dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3
Desain penelitian *Posttest Only Control Group Design*

Kelompok	Perlakuan	Posttest
R1	X	O1
R2	Kontrol	O2

Keterangan:

R1 (*Random 1*) : Kelompok eksperimen, dalam penelitian ini yaitu berbagai konsentrasi dari ekstrak etanol biji sirsak dengan konsentrasi 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%

R2 (*Random 2*) : Kelompok kontrol, dalam penelitian ini digunakan etanol 96% sebagai kontrol reagen, NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif, dan cakram kloramfenikol sebagai kontrol positif.

X (*Exposure*) : Pelakuan (intervensi)

O1 (Observasi) : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2022 sampai dengan bulan Mei 2023

2. Tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Dasar, Laboratorium Kimia Terapan, dan Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Denpasar.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol biji sirsak yang dibuat menjadi 7 konsentrasi berbeda. Ekstrak etanol biji sirsak dibuat variasi konsentrasi yaitu 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80%.

2. Jumlah dan besar sampel

Sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol biji sirsak. Ekstrak etanol sirsak diuji dengan 7 konsentrasi yaitu 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%. Sebagai kelompok kontrol digunakan etanol 96% sebagai kontrol reagen dan NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif.

Menurun Hanafiah dalam Dewi (2022), syarat minimal jumlah pengulangan yang bisa dilakukan untuk percobaan laboratorium adalah cukup tiga kali pengulangan. Semakin banyak pengulangan, semakin tinggi pula derajat ketelitiannya. Dalam penelitian ini setiap konsentrasi dilakukan tiga kali pengulangan, sehingga diperoleh 21 data perlakuan dan 9 data kontrol. Total data yang didapatkan adalah 30 data.

3. Unit analisa

Unit analisa dari penelitian ini adalah zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada variasi konsentrasi ekstrak etanol biji sirsak yang dibuat menjadi tujuh jenis konsentrasi yaitu 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80%.

D. Jenis dan Pengumpulan data

1. Jenis data

Jenis data yang diperoleh adalah data primer. Data primer dari penelitian ini adalah zona hambat yang terbentuk pada pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dengan sampel ekstrak etanol sirsak berbagai konsentrasi 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%.

2. Teknik pengumpulan data

Data dikumpulkan melalui eksperimen laboratorium dengan mengukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada zona hambat bakteri *Propionibacterium acnes* yang terbentuk dari konsentrasi 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%.

3. Instrumen pengumpulan data

Dalam penelitian ini, alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah jangka sorong, alat tulis, kamera, dan instrumen laboratorium.

E. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja

1. Alat

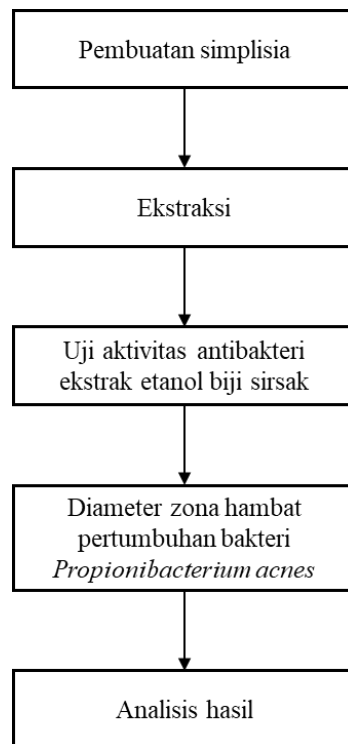
Cawan petri, autoklaf (TOMY SX-500), mikropipet (socorex), gelas ukur (IWAKI), gelas beaker (IWAKI), labu erlenmeyer (IWAKI), tabung reaksi, rak tabung reaksi, bunsen spiritus, ose, pinset, blender (Miyako), neraca analitik

(RADWAG AS220.R2), *hotplate*, *magnetic stirrer*, *Mc farland densitometer* (biosan DEN-1B), inkubator (ESCO Isotherm), *biosafety cabinet* (BSC-1800 II B2-X), *rotary evaporator* (IKA®RV 10 basic).

2. Bahan

Biji sirsak, etanol 96%, bakteri *Propionibacterim acnes* ATCC 11827, cakram disk kosong (OXOID), media MHA (OXOID), media NA (OXOID) aquadest steril, NaCl 0,9%, cakram kloramfenikol (OXOID), lidi kapas steril, kertas saring, aluminium foil, asam sulfat, reagen dragendorff, reagen mayer wagner, air panas, serbuk magnesium, H₂SO₂, HCl dan alkohol 70%.

3. Kerangka kerja



Gambar 5 Kerangka Kerja

4. Prosedur kerja

a. Preparasi sampel

- 1) Biji sirsak sebanyak 1000 gram dibersihkan dari kotoran kemudian ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.
- 2) Kemudian biji sirsak dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama tujuh hari
- 3) Kemudian biji sirsak yang telah kering dihaluskan menggunakan blender, lalu di ayak untuk mendapatkan serbuk halus

b. Pembuatan ekstrak etanol biji sirsak

Adapun prosedur pembuatan ekstrak etanol biji sirsak yang di adaptasi dari penelitian yang dilakukan oleh Arifianti dkk., (2014) yaitu sebagai berikut:

- 1) Serbuk biji sirsak ditimbang sebanyak 250 gram ditambahkan etanol 96% sebanyak 2500 ml
- 2) Kemudian ditutup rapat dan dibiarkan selama 3 hari, hindari terpapar cahaya matahari sambil diaduk setiap harinya
- 3) Sesudah 3 hari, hasil maserasi disaring, filtrat ditampung ke dalam erlenmeyer yang bersih dan ditutup rapat. Kemudian residu dimaserasi kembali dengan 2500 ml etanol 96%. Ditutup rapat kemudian biarkan selama 3 hari terhindar dari cahaya matahari sambil diaduk setiap hatinya
- 4) Sesudah 3 hari, hasil maserasi disaring, filtrat ditampung ke dalam erlenmeyer yang bersih dan ditutup rapat
- 5) Filtrat dari maserasi pertama dan kedua dituang ke labu penampung kemudian diuapkan menggunakan evaporator (suhu 40°C – 60°C) sampai didapatkan ekstrak kental.

c. Skrining fitokimia ekstrak etanol biji sirsak

1) Uji alkaloid

Sebanyak 3 ml ekstrak dicampurkan dengan 3 tetes asam klorida 2 N. Kemudian campuran tersebut dibagi menjadi dua tabung. Tabung pertama ditambahkan 1 ml reagen Dragendroff, tabung kedua ditambahkan 1 ml reagen Mayer Wagner. Terbentuknya endapan jingga merah pada tabung pertama dan endapan putih pada tabung kedua menunjukkan hasil positif.

2) Uji flavonoid

Sebanyak 1 ml ekstrak dicampurkan dengan 0,1 g Mg atau sekitar seujung spatula, lalu ditambahkan reagen HCl pekat sebanyak 10 tetes. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga.

3) Uji tanin

Sebanyak 2 ml ekstrak dicampurkan dengan 1-2 tetes reagen FeCl_3 1%. Adanya perubahan warna menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan hasil positif.

4) Uji saponin

Sebanyak 1 ml ekstrak dicampurkan dengan 10 ml air panas dan 1 tetes asam klorida 2 N, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Apabila terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit, maka menandakan adanya senyawa saponin.

5) Uji steroid

Sebanyak 3 ml ekstrak dicampurkan dengan H_2SO_4 pekat, lalu dikocok. Adanya kandungan steroid dan terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah.

d. Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol biji sirsak

1) Variasi konsentrasi ekstrak etanol biji sirsak yang digunakan adalah 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%. Masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara penimbangan dan pengenceran ekstrak biji sirsak pekat (konsentrasi 100%) dengan 2 ml etanol 96%.

2) Pengenceran dilakukan dengan pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol biji sirsak menggunakan persentase konsentrasi % b/v menggunakan persamaan berikut:

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

Keterangan:

% : variasi konsentrasi (%)

b : massa ekstrak biji sirsak (100%)

v : volume yang akan dibuat (2 ml)

3) Perbandingan masing-masing konsentrasi dari ekstrak pekat dengan pelarut etanol 96% adalah sebagai berikut:

Tabel 4
Perbandingan Konsentrasi Ekstrak Pekat dengan Pelarut Etanol 96%

Konsentrasi	Berat Ekstrak (g)	Volume Etanol (ml)
20%	0,4	2
30%	0,6	2
40%	0,8	2
50%	1,0	2
60%	1,2	2
70%	1,4	2
80%	1,6	2

4) Campuran pada masing-masing konsentrasi dihomogenkan dan disimpan pada tabung reaksi.

e. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

- 1) Media MHA ditimbang sebanyak 7,6 gram menggunakan neraca analitik kemudian dipindahkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan sebanyak 200 ml aquadest (etiket media 38,0 gram media dilarutkan ke dalam satu liter aquadest)
- 2) Media dipanaskan pada *hot plate* sambil diaduk hingga serbuk benar-benar larut sempurna dan homogen, kemudian pH media diukur dengan menggunakan pH *stick* (pH optimum $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C)
- 3) Kemudian media disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dihitung dari tercapainya suhu 121°C
- 4) Setelah selesai, media dikeluarkan dari autoklaf dan ditunggu hingga suhu media turun
- 5) Media dituangkan ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 20 ml, kemudian didiamkan hingga memadat

f. Pembuatan suspensi bakteri

- 1) Koloni *Propionibacterium acnes* dari biakan murni diambil beberapa ose dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl Fisiologis 0,9% steril sampai diperoleh konsentrasi 0,5 *Mc Farland*.
- 2) Kekeruhan suspensi bakteri dibaca dengan menggunakan *Mc Farland* densitometer. 0,5 *Mc Farland* setara dengan $1,5 \times 10^8$ (*Colony Forming Unit*) CFU/ml.

g. Uji aktivitas antibakteri

- 1) Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* dengan kepekatan *Mc Farland* 0,5% disiapkan

- 2) Swab kapas steril disiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah suspensi bakteri meresap, swab kapas steril diangkat dan diperas dengan cara menekan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar
- 3) Swab kapas yang telah dicelupkan tadi digoreskan pada permukaan media MHA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan-goresan. Goresan dilakukan dengan merata hingga seluruh permukaan media tertutup
- 4) Media MHA didiamkan 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam
- 5) Masing-masing variasi konsentrasi ekstrak etanol biji sirsak konsentrasi 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% dan 80% yang sudah dijenuhkan ke dalam cakram, ditempelkan pada permukaan media MHA dan sedikit ditekan dengan pinset hingga cakram melekat sempurna pada permukaan media.
- 6) Kontrol reagen, kontrol positif, dan kontrol negatif ditempelkan pada media MHA.
- 7) Cakram satu dengan yang lainnya diletakkan dengan jarak ± 15 mm. Cakram yang sudah ditempelkan pada permukaan media tidak dapat dipindahkan ataupun digeser.
- 8) Media yang telah ditanami cakram diinkubasi di inkubator selama 16-18 jam dengan posisi terbalik pada suhu 37°C .

h. Pelaporan hasil

- 1) Zona hambat yang terbentuk kemudian diamati dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong (satuan milimeter) setelah inkubasi selama 16-18 jam.

2) Diameter zona hambat yang diukur yaitu daerah jernih sekitar cakram disk (daerah yang tidak ada pertumbuhan bakteri) diukur dari ujung satu ke ujung yang lain melalui tengah-tengah cakram disk.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dinyatakan dalam satuan milimeter (mm) diolah dengan menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating data yaitu data disajikan dalam bentuk tabel dan narasi.

2. Analisis data

Pada penelitian ini analisis data yang digunakan adalah analisis data kuantitatif. Uji *Komolgorov-Smirnov* digunakan untuk menguji normalitas data, jika data berdistribusi normal dilanjutkan dengan uji homogenitas data dan uji statistik inferensial. Jika data tidak berdistribusi normal dilanjutkan dengan uji statistik non parametrik.

G. Etika Penelitian

Pada penelitian ini prinsip etika yang diterapkan adalah *beneficence* yang artinya prinsip kebaikan dan memberikan manfaat dan meminimalkan kerugian kepada orang lain. Serta prinsip *Non-Maleficence* yang artinya prinsip tidak merugikan yang bertujuan agar subjek penelitian tidak diperlakukan sebagai sarana dan memberikan perlindungan terhadap tindakan penyalahgunaan.