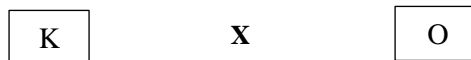


BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian *pre-experimental design* dengan rancangan *one shot case study* (Alisjahbana, Hendratno dan Naldi 2015). Pada penelitian ini menggunakan bakteri *Propionibacterium acne* dalam cawan petri dengan empat perlakuan untuk mengetahui uji aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*. Jenis *one-shot case study* dimaksudkan untuk menunjukkan kekuatan pengukuran dan nilai ilmiah suatu desain penelitian. Adapun bagan dari *one-shot case study* adalah sebagai berikut:



Gambar 5. Desain Penelitian One Shot Case Study
sumber : kuntjojo (2009:46)

Keterangan:

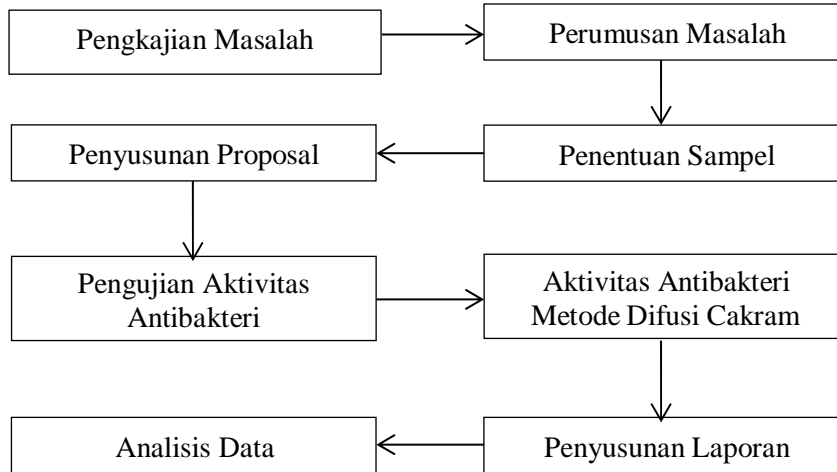
K : Kelompok

X : *Treatment* atau perlakuan

O : Hasil observasi sesudah perlakuan

B. Alur Penelitian

Alur penelitian pada penelitian ini pada gambar dibawah ini :



Gambar 6. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Warmadewa.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai Mei 2023.

B. Sampel Penelitian

1. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kombinasi daun pegagan (*Centella asiatica*) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida L. Kunth*) yang sudah melewati tahapan evaporasi. Daun pegagan dan daun sirih cina

diperoleh dari Desa Sidakarya, Denpasar selatan. Daun pegagan dan daun sirih cina dipilih menurut kriteria inklusi yang telah ditetapkan peneliti yaitu bagian yang berwarna hijau dan tidak berlubang. Ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina menggunakan etanol 96% kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat daun pegagan dan daun sirih cina.

2. Besar dan jumlah sampel

Jumlah daun pegagan dan daun sirih cina yang digunakan untuk sampel basah masing- masing sebanyak 1 kg lalu disortasi kemudian dikeringkan dan diayak sehingga diperoleh 200 gram. Pada penelitian ini sampel yang diuji adalah ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina dengan konsentrasi 20, 40, 60 dan 80% yang dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak pekat kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina menggunakan pelarut etanol 96% sebagai kontrol positif atau kontrol kerja digunakan antibiotik *Chloramphenicol* 30 μg , dan kontrol negatif digunakan pelarut etanol 96%. Sehingga jumlah total perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah enam perlakuan. Pada masing-masing perlakuan tersebut dilakukan pengulangan pada masing-masing variasi konsentrasi dihitung menggunakan rumus (Federer, 1963) sebagai berikut :

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

Keterangan :

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

$$3(r - 1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan diatas, pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini sebanyak enam kali. Pada penelitian ini menggunakan empat perlakuan dengan konsentrasi 20, 40, 60 dan 80% dan masing-masing konsentrasi dilakukan enam kali pengulangan. Menurut Hanafiyah (2016), jumlah minimal pengulangan yang digunakan dalam penelitian laboratorium adalah tiga kali pengulangan.

3. Unit analisis

Unit analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah zona hambat berbagai konsentrasi ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada berbagai konsentrasi yaitu 20, 40, 60 dan 80 %.

C. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Data yang dikumpulkan berupa data kuantitatif yaitu data primer dengan melakukan eksperimen laboratorium. Data primer diperoleh dari hasil pengukuran diameter zona hambat pada pertumbuhan *Propionibacterium acnes* yang dihasilkan oleh ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina.

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data dalam penelitian ini adalah pengukuran dengan alat ukur melalui eksperimen laboratorium. Pengukuran dilakukan terhadap diameter zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* yang dihasilkan oleh ekstrak kombinasi daun pegagan

dan daun sirih cina dalam berbagai konsentrasi. Hasil pengukuran tersebut dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

3. Instrumen pengumpulan data

Dalam penelitian ini instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data yaitu sebagai berikut:

- a. Jangka sorong
- b. Alat tulis
- c. Kamera

D. Alat, Bahan, Kerangka Kerja dan Prosedur Kerja

1. Alat

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah tabung vial (1 buah) erlemeyer 100 ml (Pyrex) (2 buah), tabung reaksi (Pyrex) (1 buah), gelas ukur 250 ml (Pyrex) (1 buah), corong (1 buah), pisau (1 buah), ose bulat (1 buah), mikropipet 20-200 μ l dan 100-1000 μ l (SOCOREX) (masing-masing 1 buah), Pinset (1 buah) gelas kimia 1000 ml (DURAN) (1 buah), Oven (Elos), api bunsen (1 buah) tabung eppendorf (7 buah), rak tabung reaksi (1 buah), spatula (2 buah), batang pengaduk (2 buah), cawan petri (petridish) (15 buah), jangka sorong (1 buah), Mc Farland Densitometer (Biosan) (1 buah), neraca analitik (RADWAG) (1 buah), refrigerator (1 buah), Inkubator (ESCO Isoterm) (1 buah), Autoclave (TOMY SX- 500) (1 buah), Hotplate(JISICO) (2 buah), magnetic stirrer (2 buah), Oven (eLOS) (1 buah), dan BiosafetyCabinet (Biobase), evaporator (IKA@RV 10 Basic).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina , etanol 96%, bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, media Mueller Hinton Agar (Oxoid), standar 0,5 Mc Farland, larutan NaCl fisiologis 0,9%, Alkohol 70%, blank cakram disk (35 buah), cakram disk Cloramphenicol 30 µg (3 buah), cotton swab (1 buah), Yellow tip (6 buah), Bluetip (1 buah), kapas berlemak, aluminium foil, dan kertas saring.

3. Prosedur Kerja

Menurut (Salahudin and Cahyanto, 2020) prosedur pembuatan ekstrak sebagai berikut:

- a. Prosedur kerja
 - 1) Pembuatan ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina
 - a) Memetik daun pegagan dan daun sirih cina secukupnya masing-masing sebanyak 1 kg, kemudian dibersihkan dari kotoran dan dicuci pada air mengalir. Dilakukan proses sortasi basah untuk memilih bahan sampel sesuai kriteria yang digunakan dalam penelitian.
 - b) Menghilangkan sisa air daun pegagan dan daun sirih cina dengan cara ditiriskan.
 - c) Melakukan penimbangan awal untuk mengetahui masa awal bahan sampel.
 - d) Mengeringkan dengan cara di oven pada suhu 50°C selama 3 hari.
 - e) Menimbang masing-masing 100 gr daun pegagan dan daun sirih cina yang sudah kering dikumpulkan dan ditimbang kembali.

- f) Melakukan proses sortasi pada daun pegagan dan daun sirih cina yang sudah kering sebelum daun dihaluskan untuk memperkecil ukuran butiran bahan kering, proses penghalusan menggunakan blender.
 - g) Menghaluskan daun pegagan dan daun sirih cina yang sudah kering kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk simplisia dengan ukuran butiran yang seragam.
 - h) Menimbang sebanyak 200 g bubuk simplisia daun pegagan dan daun sirih cina yang bebas dari kotoran kemudian dibagi kedalam satu botol 1,5 L. dan tambahkan pelarut etanol 96% hingga semua serbuk simplisia terendam pelarut.
 - i) Melakukan proses perendaman selama 2 hari dengan pengadukan sebanyak 4 kali dalam sehari.
 - j) Menyaring sampel dengan kertas saring, kemudian semua filtrat ditampung, kemudian dilakukan proses pemekatan menggunakan evaporator (suhu 70°C) hingga didapatkan ekstrak pekat.
 - k) Menimbang kembali ekstrak pekat yang diperoleh dan disimpan dalam refrigerator.
2. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina (Haryanti, Larasati dan Augusta, 2020)
- a) Menggunakan konsentrasi ekstrak daun pegagan 20, 40, 60 dan 80%. masing-masing konsentrasi tersebut dibuat dengan cara penimbangan ekstrak pekat daun pegagan dan daun sirih cina dan pelarut etanol 96%
 - b) Membuat seri konsentrasi ekstrak daun pegagan dan daun sirih cina dibuat dengan menimbang stok sampel (ekstrak pekat) sesuai perhitungan

menggunakan presentase perbandingan konsentrasi % (b/v) yang dapat ditentukan melalui rumus berikut :

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

Keterangan :

% : variasi konsentrasi (%) ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina

b : massa ekstrak kombinasi daun pegagan dan sirih cina (100%)

v : volume pelarut.

Massa ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina dan massa pelarut yang akan digunakan dalam pembuatan konsentrasi 20,40,60 dan 80% yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2
Variasi Konsentrasi Ekstrak Kombinasi Daun Pegagan dan Daun Sirih Cina

Konsentrasi (%)	Ekstrak Daun Pegagan dan Daun Sirih Cina (gram)	Etanol 96% (ml)
20	0,2	1
40	0,4	1
60	0,6	1
80	0,8	1

- c) Melakukan campuran pada masing-masing konsentrasi dihomogenkan dan disimpan dalam refrigerator.
3. Prosedur pembuatan media uji *Mueller Hinton agar* (MHA) (Syarifah dkk., 2018).
- a) Menimbang bubuk media *Mueller Hinton Agar* sebanyak 5,7 gram menggunakan neraca analitik.

- b) Memindahkan bubuk media ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 1500 ml akuades.
 - c) Melakukan pemanasan media dengan hotplate dan diaduk hingga homogen.
 - d) Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan aluminium foil.
 - e) Mensterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dihitung dari tercapainya suhu 121°C.
 - f) Media yang telah disterilisasi, didiamkan sampai suhu media turun menjadi +40-50°C.
 - g) Menuangkan media secara aseptis ke dalam cawan petri dengan volume 15 ml, kemudian didiamkan hingga memadat.
 - h) Setelah media memadat, cawan petri dibalik, dan apabila tidak langsung digunakan media yang sudah dituangkan pada cawan petri disimpan didalam refrigerator.
4. Proses penjujukan berbagai konsentrasi ekstrak daun mimba dan kontrol ke dalam cakram kosongan (Pratiwi, 2020)
- a) Menyiapkan cakram kosong yang berukuran 6 mm. Masing-masing variasi konsentrasi ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina dipipet sebanyak 20 µl dan dijenuhkan ke dalam cakram hingga cairan meresap sempurna.
 - b) Mengontrol digunakan cakram kosong yang dijenuhkan dengan 20µl etanol 96% yang digunakan sebagai pelarut pengenceran.
 - c) Mengontrol positif yang digunakan sebagai kontrol kerja adalah cakram antibiotik *Cloramphenicol* 30 ug. Kontrol kerja berfungsi sebagai pembanding hasil pemeriksaan apabila nantinya kelompok perlakuan menghasilkan hasil

positif menunjukkan terbentuknya zona hambat dan mengontrol sterilitas prosedur kerja.

5. Pembuatan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* (Zahrah, Arifa dan Mustika, 2018)
 - a) Mengambil koloni bakteri *Propionibacterium acnes* dari hasil peremajaan diambil beberapa ose dan disuspensikan kedalam tabung reaksi berisi 5 ml larutan NaCl Fisiologis 0,9% steril sampai memperoleh konsentrasi 0,5 *McFarland*.
 - b) Membaca kekeruhan suspensi bakteri dibaca dengan menggunakan *McFarland* densitometer. 0,5 *McFarland* setara dengan $1,5 \times 10^8$ (Unit Pembentuk Koloni)CFU/ml.
6. Tahapan pemeriksaan
 - a) Menyiapkan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* yang telah dibuat
 - b) Mencelupkan cotton swab steril dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri tersebut.
 - c) Memeras cotton swab steril dengan cara menekannya pada dinding dalam tabung dan diangkat.
 - d) Melakukan inokulasi pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) (goresan dilakukan secara merata hingga menutupi seluruh permukaan media)
 - e) Melakukan inokulasi media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* didiamkan selama 15 menit agar suspensi bakteri meresap kedalam agar.
 - f) Setelah permukaan media kering, masing-masing cakram yang sudah dijenuhkan dengan variasi konsentrasi ekstrak daun mimba ditempelkan pada

media yang sudah diinokulasikan suspensi bakteri dan sedikit ditekan dengan pinset sampai cakram melekat sempurna pada permukaan media.

- g) Kontrol negatif dan positif ditempelkan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang berbeda
- h) Jarak antar cakram minimal 15 mm dan cakram disk yang telah ditempelkan tidak boleh dipindahkan atau digeser
- i) Media yang sudah ditemplei dengan cakram disk didiamkan 5 sampai 15 menit.
- j) Melakukan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam posisi terbalik.

7. Pelaporan hasil

- a) Melihat lihat zona hambat yang terbentuk yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar cakram disk
- b) Mengukur zona hambat menggunakan jangka sorong dari sisi yang satu ke sisi yang lain melalui tengah-tengah cakram dan dilaporkan dengan satuan millimeter (mm).

4. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen pengujian aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi daun pegagan dan daun sirih cina terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* yang dinyatakan dalam satuan millimeter (mm) diolah menggunakan teknik tabulating data yaitu data yang disajikan dalam bentuk tabel naratif.

2. Analisis data

Data yang telah diperoleh lalu dianalisis dengan uji statistik dengan bantuan *software* komputer. Data diuji dengan menggunakan uji sebagai berikut :

a. Uji *Kolmogorov-Smirnov* (KS)

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui normalitas data.

b. Uji *One Way* Anova

Jika uji KS data berdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan zona hambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. Jika ada perbedaan, dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Deference*).

c. Uji *Least Significant Deference* (LSD)

Uji digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* apabila data berdistribusi normal.

d. *Mann-Whitney*

Perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat apabila data berdistribusi tidak normal.