

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan merupakan penelitian kuantitatif dengan metode eksperimen. Desain penelitian yang dipakai pada penelitian ini merupakan *Pre – Experimental Design* pada bentuk “*One-Shot Case Study*” yakni penelitian dimana terdapat suatu kelompok diberi *treatment*/perlakuan, dan berikutnya diobservasi hasilnya. (*Treatment* sebagai variabel independen, dan hasil merupakan sebagai variabel dependen) (Sugiyono, 2017). Bentuk rancangan yang dipakai dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3
Tabel Desain Penelitian *One-Shot Case Study*

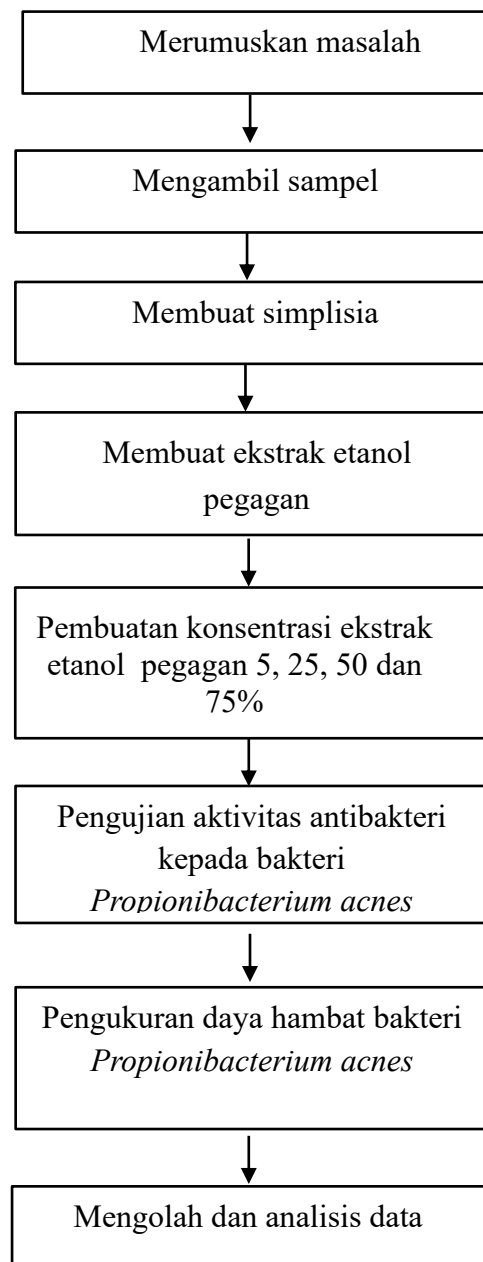
X	O
----------	----------

Keterangan:

X (*Exposure*) : Perlakuan/treatment yang diberikan (variabel independen)

O2 (*Observasi*): Observasi (variabel dependen)

B. Alur Penelitian



Gambar 6 Alur penelitian Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Pegagan kepada Bakteri *Propionibacterium acnes*

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Laboratorium Mikrobiologi serta Laboratorium Kimia Dasar Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini akan dibuat dari bulan Oktober 2023 hingga Maret 2024, dihitung dari penyusunan proposal hingga ujian akhir penelitian.

D. Unit Analisis

Unit analisis pada penelitian ini merupakan zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* yang diamati di empat variasi konsentrasi ekstrak etanol pegagan, yakni 5%, 25%, 50%, dan 75%.

E. Jenis Dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Data yang didapatkan pada penelitian ini merupakan data primer yang dihasilkan dari ukuran zona hambat yang disebabkan pada ekstrak pegagan pada bermacam variasi konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada eksperimen di laboratorium.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik mengumpulkan data pada penelitian ini dilaksanakan dengan cara melakukan pengukuran dengan alat ukur memakai serangkaian percobaan di laboratorium, diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* diukur dengan metode difusi cakram *Kirby Bauer* di dosis ekstrak pegagan yang

berbeda, diameter mengukur dengan jangka sorong maupun penggaris dan menyatakan pada satuan milimeter (mm). Data yang didapatkan dengan mengukur diameter zona hambat menunjukkan adanya aktivitas daya hambat terhadap bakteri.

Menurut pendapat (Hanafiah, 2016), total ulangan dari sebuah perlakuan ditentukan oleh tingkat meneliti yang diinginkan peneliti ketika menarik kesimpulan dari data hasil percobaan, tingkat ketelitian akan baik seiring dengan bertambahnya jumlah ulangan, rumus *federer* berikut ini dapat dipakai untuk menghitung syarat minimal jumlah ulangan yang dibutuhkan untuk penelitian di laboratorium.:

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

Keterangan:

t : jumlah perlakuan

r : jumlah pengulangan

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

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

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

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

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 15 + 3$$

$$r \geq 18 \div 3$$

$$r \geq 6$$

Didasarkan perkiraan ini, jumlah pengulangan minimal yang diperlukan untuk memenuhi persyaratan merupakan enam kali. Jadi, dalam penelitian ini, setiap konsentrasi diulang sebanyak enam kali, menghasilkan dua puluh empat data.

3. Instrumen Pengumpulan Data

Pada penelitian ini instrumen yang dipakai pada mengumpulkan data yakni pada berikut:

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

F. Alat, Bahan dan Prosedur Kerja

1. Alat

Penelitian ini membutuhkan alat-alat sebagai berikut: Blender, toples kaca, timbangan analitik, pipet tetes, mikropipet 1000µl, gelas ukur 500ml, *rotary evaporator*, erlenmeyer 50 ml dan 500 ml, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *hotplate*, pengaduk magnetik, lampu spiritus, toples anaerobik, *densitometer Mc Farland*.

2. Bahan

Bahan yang ada pada penelitian ini yakni: Sampel pegagan 1,5 kg, etanol 96%, kertas saring, bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, media *Muller Hinton Agar* (MHA), media *Nutrient Agar* (NA), cakram disk kosong, cakram kloramfenikol, NaCl steril 0,9%, *petri dish disposable*, *disposable ose*, *blue tip*, *cotton swab* steril, aquadest steril, aluminium foil, *sputum needle* 5 cc.

3. Prosedur Kerja

a. Persiapan sampel

- 1) Pegagan yang dipakai pada penelitian berasal dari bagian pangkal batang hingga pucuk tanaman, dipilih sesuai di kriteria sampel yang sudah ditetapkan sebelum peneliti. Jumlah pegagan yang didapatkan agar memperoleh ekstrak yang cukup merupakan sekitar 1,5 kilogram.

- 2) Berikutnya, pegagan yang sudah dikumpulkan dibersihkan pada cara merendam di dalam air bersih, kemudian dicuci dan diperas untuk menghilangkan kotoran yang menempel di tanaman.
- 3) Proses pengeringan tanaman pegagan dilakukan manual dengan dibiarkan terkena angin selama beberapa hari. Proses ini dilakukan dengan diletakkannya tanaman pada nampan pada area tanpa sinar langsung matahari.
- 4) Proses mengeringkan berlangsung sekitar tujuh hari, hingga pegagan benar-benar kering. jika bahan sudah semuanya kering, ditimbang dan dihaluskan sehingga simplisia yang berbentuk serbuk halus.

b. membuat ekstrak etanol pegagan pada metode maserasi

- 1) 400 gram simplisia dimasukkan pada erlenmeyer berukuran 1000 ml.
- 2) Lalu, 1000 ml etanol 96% dituangkan disalam erlenmeyer sampai simplisia direndam seluruhnya, dan tutup erlenmeyer disegel dengan aluminium foil.
- 3) Proses perendaman berlangsung selama 2 hari masing-masing 24 jam di ruangan yang dilindungi dari cahaya matahari. Pengadukan dilakukan setiap 24 jam.
- 4) Sesudah dua hari, maserasi disaring memakai kertas saring dan filtrat yang didapatkan dikumpulkan dalam wadah kaca bersih. Sisa residu dari penyaringan kemudian dimaserasi kembali dengan 1000 ml etanol 96% selama 2 hari 24 jam di lingkungan tertutup rapat dan dilindungi dari cahaya matahari. Sesudah 2 hari, filtrat hasil maserasi disaring kembali.
- 5) Filtrat yang dihasilkan dari proses maserasi kemudian dimasukkan ke dalam labu penampung di alat evaporator. Labu penampung tersebut dipasang di alat

evaporator serta suhu evaporasi diatur pada 40 hingga 60° C. Proses ini dibuat agar mendapatkan ekstrak kental.

- 6) Ekstrak pegagan yang dihasilkan lalu ditaruh pada wadah bersih dan ditimbang untuk mendapatkan berat bersih dari ekstrak yang dihasilkan.

c. Pembuatan ekstrak etanol pegagan 5, 25, 50 dan 75%

- 1) Konsentrasi ekstrak 5, 25, 50, dan 75% dihasilkan dengan melarutkan ekstrak pekat memakai pelarut etanol 96%
- 2) Membuat seri konsentrasi ekstrak etanol pegagan dibuat pada cara ditimbang stok sampel (ekstrak pekat) pada perhitungan pada presentase perbandingan konsentrasi % (b/v) yang bisa menentukan pada rumus berikut:

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

Keterangan :

% : variasi konsentrasi (%) ekstrak etanol pegagan

b : massa ekstrak etanol pegagan (100%)

v : volume pelarut.

Adanya massa ekstrak pekat yang bisa membuat Tiap konsentrasi ekstrak dibuat pada tabel berikut:

Tabel 4
Perbandingan Konsentrasi Ekstrak Pekat
dengan Pelarut Etanol 96%

Konsentrasi ekstrak (%)	Massa ekstrak pekat (gram)	Volume Etanol (ml)
5%	0,1	2
25%	0,5	2
50%	1	2
75%	1,5	2

- 3) Kemudian, ekstrak pekat yang sudah dicampur dengan etanol dihomogenkan dan disimpan.

d. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

- 1) Media MHA sekitar 6,8 gram ditimbang memakai neraca analitik dan lalu dipindahkan ke erlenmeyer. Lalu, ditambahkan 178 ml aquadest (etiket media 38 gram media dilarutkan pada satu liter aquadest).
- 2) Media dipanaskan di atas hot plate serta diaduk sampai serbuk benar-benar larut dan tercampur secara merata. Berikutnya, Ph media diukur memakai pH stick (dengan pH optimum $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C).
- 3) Media lalu disterilkan memakai autoklaf selama 15 menit di suhu 121°C , dihitung sejak mencapai suhu 121°C .
- 4) Sesudah sterilisasi, media dikeluarkan dari autoklaf dan didiamkan sampai suhu media turun.
- 5) Media yang sudah disiapkan dituangkan pada cawan petri sekitar 25,4 ml dengan ketebalan media sekitar 4 mm. Berikutnya, didiamkan hingga media padat.

e. Pembuatan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes*

- 1) Koloni *Propionibacterium acnes* dari biakan murni diambil dengan ose dan disuspensikan pada tabung yang memiliki 5 ml larutan NaCl Fisiologis 0,9% steril hingga tercapai konsentrasi 0,5 McFarland.
- 2) Kekeruhan suspensi bakteri diukur memakai McFarland densitometer. Konsentrasi 0,5 McFarland bersamaan pada $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Colony Forming Unit per mililiter).

f. Uji aktivitas antibakteri

- 1) Disiapkan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* pada kepekatan 0,5 McFarland

- 2) Siapkan kapas steril dan celupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah suspensi bakteri terendam, putar kapas steril ke dinding tabung dalam.
- 3) Swab kapas yang sudah direndam pada suspensi bakteri digoreskan di permukaan media MHA untuk meliputi seluruh area secara merata
- 4) Inkubasi media MHA memakai 5-15 menit untuk memastikan suspensi bakteri meresap pada media.
- 5) Cakram yang sudah direndam dengan ekstrak pegagan pada konsentrasi 5, 25, 50, dan 75% ditempatkan di atas permukaan media MHA dan ditekan memakai pinset untuk memastikan cakram menempel dengan baik.
- 6) Kontrol positif dan kontrol negatif ditempatkan di media MHA.
- 7) Setiap cakram ditempatkan pada jarak ± 15 mm satu sama lain, tanpa memindahkan atau menggeser cakram yang sudah ditempatkan di media.
- 8) Media yang sudah ditanami cakram kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 18-24 jam di suhu 37°C dengan posisi terbalik.
- 9) Dilakukan pelaporan hasil dengan Melihat zona hambat yang dibentuk dan menandakan ketika dibentuknya zona bening di sekitar cakram disk.
- 10) Gunakan jangka sorong untuk mengukur zona penghambatan dari satu sisi ke sisi lainnya di tengah-tengah cakram dan laporkan dalam milimeter (mm).

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Diameter zona hambat yang diperoleh dari pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol pegagan terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dalam satuan milimeter (mm) diolah dengan menggunakan teknik tabulasi data, khususnya data yang ditampilkan dalam bentuk tabel naratif.

2. Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik dengan menggunakan *software* komputer. Data dianalisis dengan uji sebagai berikut:

a. Uji Kolmogorov-Smirnov (KS)

Uji ini digunakan untuk memberitahu normalitas data

b. Uji One Way ANOVA.

Jika hasil uji KS berdistribusi normal, lakukan uji One Way Anova agar memberitahu ada tidaknya perbedaan zona hambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*, jika terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*).

c. Uji Least Significant Difference (LSD)

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

d. Uji Mann-Whitney

Jika data tidak berdistribusi normal, maka dilakukan uji Mann-Whitney agar memberitahu zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*.

H. Etika Penelitian

Pada penelitian ini prinsip etika yang diterapkan adalah *beneficence*, yaitu prinsip kebajikan, mendatangkan manfaat dan meminimalkan kerugian bagi orang lain. Serta prinsip *Non maleficence*, yaitu dimaksudkan untuk memastikan bahwa subjek penelitian tidak dianggap merugikan dan memberikan perlindungan terhadap penyalahgunaan.