

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian Eksperimental Sungguhan (*True experimental*). Penelitian Eksperimental Sungguhan merupakan eksperimen yang betul-betul, karena dalam desain ini, peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen (Sugiyono, 2017). 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, pada penelitian ini yaitu variasi konsentrasi dari ekstrak etanol daun anggur dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 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.

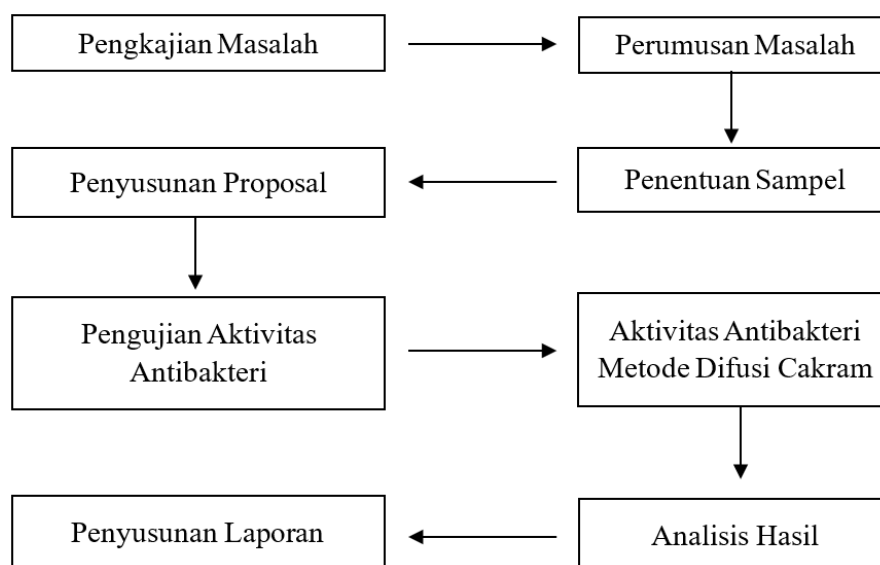
X (*Exposure*) : Pelakuan pada kelompok eksperimen dengan menggunakan metode difusi cakram

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

O2 (Observasi) : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada kelompok kontrol

B. Alur Penelitian

Adapun alur penelitian ini pada gambar berikut:



Gambar 5 Alur Penelitian

C. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2023-April 2024

2. Tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Dasar, Laboratorium Kimia Terapan, dan Laboratorium Bakteriologi di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Denpasar.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun anggur yang dibuat menjadi 4 konsentrasi berbeda. Ekstrak etanol daun anggur dibuat menggunakan daun anggur. Kemudian ekstrak di buat dengan variasi konsentrasi 20, 40, 60, dan 80%. Adapun kriteria daun anggur yang digunakan pada penelitian ini yaitu:

a. Kriteria Inklusi

- 1) Daun anggur segar berwarna hijau
- 2) Berumur muda sampai sedang yang tumbuh pada tangkai ketiga sampai kelima dari pucuk

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Daun anggur yang layu dan berwarna kuning
- 2) Daun anggur yang berlubang

2. Jumlah dan besar sampel

Sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol daun anggur. Ekstrak etanol daun anggur diuji dengan 4 konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80%. Konsentrasi ini dipilih untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki zona hambat yang kuat serta memungkinkan peneliti untuk mengevaluasi efek antibakteri dengan baik. Sebagai kelompok kontrol digunakan etanol 96% sebagai kontrol reagen, NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif, dan kloramfenikol 30 μ g sebagai kontrol positif. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan, adapun pengulangan masing-masing konsentrasi dapat ditentukan dengan rumus federer sebagai berikut:

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

Keterangan:

t: jumlah perlakuan

r: jumlah pengulangan

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

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

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

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Menurut Hanafiah dalam Dewi (2022), syarat minimal suatu percobaan di laboratorium adalah tiga kali ulangan. Semakin banyak pengulangan yang dilakukan, semakin tinggi akurasi. Pada penelitian ini masing-masing konsentrasi dan kontrol diulang sebanyak enam kali sehingga diperoleh 24 data perlakuan dan 18 data kontrol. Total data yang diperoleh adalah 42 data.

3. Unit analisa

Unit analisis dalam penelitian ini adalah zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada berbagai variasi konsentrasi ekstrak etanol dari daun anggur. Konsentrasi yang diuji meliputi empat jenis konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80%.

E. Jenis dan Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang diperoleh adalah data primer. Data primer merupakan data primer adalah sumber data yang langsung memberikan data kepada pengumpul data (Sugiyono, 2017). Teknik pengumpulan data primer yang diperoleh secara langsung melalui eksperimen laboratorium. Data primer dari penelitian ini adalah zona

hambat yang terbentuk pada pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dengan sampel ekstrak etanol daun anggur berbagai konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%.

2. Teknik pengumpulan data

Data diperoleh melalui eksperimen laboratorium dengan mengukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada zona hambat bakteri *Propionibacterium acnes* yang terbentuk dari ekstrak etanol daun anggur dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%.

F. 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 B2X), *rotary evaporator* (IKA®RV 10 basic), jangka sorong, kamera.

2. Bahan

Daun anggur, 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. Prosedur kerja

a. Preparasi sampel

- 1) Sebanyak 2000 gram daun anggur dibersihkan dari kotoran dan ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.
- 2) Daun anggur kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama tujuh hari.
- 3) Setelah kering, daun anggur dihaluskan menggunakan blender, kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk halus.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun anggur

Adapun prosedur pembuatan ekstrak etanol daun anggur yang di adaptasi dari penelitian yang dilakukan oleh Mukhriani dkk., (2019) yaitu sebagai berikut:

- a. Serbuk daun anggur seberat 400 gram dicampur dengan 4000 ml etanol 96%.
- b. Campuran tersebut ditutup rapat dan didiamkan selama 3 hari, dihindarkan dari sinar matahari, serta diaduk setiap hari.
- c. Setelah 3 hari, hasil maserasi disaring dan filtratnya dikumpulkan dalam erlenmeyer yang bersih dan ditutup rapat. Residu kemudian dimaserasi kembali dengan 4000 ml etanol 96%, ditutup rapat, dan dibiarkan selama 3 hari, terhindar dari sinar matahari, sambil diaduk setiap hari.
- d. Setelah 3 hari, hasil maserasi disaring lagi dan filtratnya dikumpulkan dalam erlenmeyer yang bersih dan ditutup rapat.
- e. Filtrat dari maserasi pertama dan kedua dikombinasikan ke dalam labu penampung dan diuapkan menggunakan evaporator pada suhu 40°C – 60°C hingga diperoleh ekstrak kental.

5. Skrining fitokimia ekstrak etanol daun anggur (Nofianti dkk., 2022)

a. Uji kuinon

Sampel ditimbang sebanyak 10 gram, disari dengan 100 ml air suling. Larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan dengan beberapa tetes NaOH 1N. Hasil positif jika terbentuk warna kuning.

b. 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.

c. Uji fenol

Larutan ekstrak uji sebanyak 1 ml direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%, jika terjadi warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol

d. Uji terpenoid

Sebanyak 5 ml ekstrak dicampur dengan 2 ml kloroform dan 3 ml asam sulfat pekat. Terbentuk warna merah kecoklatan pada antar permukaan menunjukkan adanya triterpenoid.

e. Uji steroid

Sebanyak 3 ml ekstrak dicampurkan dengan H₂SO₄ pekat, lalu dikocok. Adanya kandungan steroid dan terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah.

6. Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol daun anggur

a. Variasi konsentrasi ekstrak etanol dari daun anggur yang akan digunakan adalah 20%, 40%, 60%, dan 80%. Setiap konsentrasi ini disiapkan dengan cara

menimbang dan melarutkan ekstrak daun anggur yang pekat (konsentrasi 100%) dengan 2 ml etanol 96%.

- b. Pengenceran dilakukan dengan pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun anggur menggunakan persentase konsentrasi % b/v menggunakan persamaan berikut:

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

Keterangan:

% : variasi konsentrasi (%)

b : massa ekstrak daun anggur (100%)

v : volume yang akan dibuat (2 ml).

- c. 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
40%	0,8	2
60%	1,2	2
80%	1,6	2

- d. Campuran pada masing-masing konsentrasi dihomogenkan dan disimpan pada tabung reaksi.

7. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (CLSI, 2012)

- a. Untuk membuat 14 cawan media MHA dengan ketebalan 4 mm dengan diameter cawan petri sebesar 90 mm, sebanyak 13,56 gram media MHA ditimbang menggunakan neraca analitik. Kemudian media tersebut dipindahkan ke dalam

- erlenmeyer dan ditambahkan sebanyak 357 ml aquadest (etiket media 38 gram media dilarutkan ke dalam satu liter aquadest)
- b. Media dipanaskan di atas hot plate sambil diaduk sampai serbuk benar-benar larut dan tercampur sempurna. Setelah itu, pH media diukur menggunakan pH stick (pH optimal $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C).
 - c. Media kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C , dimulai setelah suhu mencapai 121°C .
 - d. Setelah sterilisasi selesai, media dikeluarkan dari autoklaf dan dibiarkan hingga suhunya turun.
 - e. Media kemudian dituangkan ke dalam setiap cawan petri dengan volume masing-masing 25,4 ml dan ketebalan sekitar 4 mm. Setelah itu, media dibiarkan hingga mengeras.

8. Pembuatan suspensi bakteri

- a. Koloni *Propionibacterium acnes* yang berasal dari biakan murni diambil beberapa ose dan suspensikan dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl Fisiologis 0,9% yang steril hingga mencapai konsentrasi 0,5 McFarland.
- b. Kekeruhan suspensi bakteri diukur menggunakan McFarland densitometer. Konsentrasi 0,5 McFarland setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (*Colony Forming Unit per mililiter*).

9. Uji aktivitas antibakteri

- a. Disiapkan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* dengan konsentrasi McFarland 0,5%.

- b. Disiapkan swab kapas steril dan rendam dalam suspensi bakteri. Setelah swab menyerap, angkat dan peras dengan menekannya pada dinding tabung sambil diputar.
- c. Gunakan swab kapas yang telah direndam untuk mengoleskan suspensi bakteri secara merata di permukaan media MHA, memastikan seluruh permukaan tertutup.
- d. Biarkan media MHA selama 5-15 menit agar suspensi bakteri dapat terserap.
- e. Cakram yang telah diisi dengan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun anggur (20%, 40%, 60%, dan 80%) ditempatkan pada permukaan media MHA dan sedikit ditekan dengan pinset agar menempel sempurna.
- f. Kontrol reagen, kontrol positif, dan kontrol negatif ditempelkan pada media MHA.
- g. Cakram diletakkan dengan jarak sekitar ± 15 mm, dan setelah ditempel, tidak boleh dipindahkan.
- h. Media yang telah diberi cakram diinkubasi secara terbalik di dalam inkubator selama 16-18 jam pada suhu 37°C.

10. Pelaporan hasil

- a. Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong setelah inkubasi selama 16-18 jam.
- b. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan pada area jernih di sekitar cakram disk (area tanpa pertumbuhan bakteri) dari ujung satu ke ujung lainnya melalui tengah cakram disk. Hasil pengukuran ini diukur dalam satuan milimeter.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Diameter zona hambat yang dihasilkan dari eksperimen pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun anggur terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*, dinyatakan dalam milimeter (mm). Data ini diolah menggunakan teknik tabulasi, kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan narasi.

2. Analisis data

Pada penelitian ini analisis data yang digunakan adalah analisis data kuantitatif. Adapun uji statistik yang digunakan pada penelitian ini yaitu

a. Uji normalitas

Pada penelitian ini menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Uji ini dipilih karena jumlah data yang diperoleh sebanyak 42 data. Syarat uji ini adalah jumlah data yang diperoleh lebih dari sama dengan 30 data.

b. Uji Beda

Apabila data berdistribusi normal, dilakukan uji beda menggunakan uji *One Way ANOVA*. Sedangkan apabila data tidak berdistribusi normal, dilakukan uji beda menggunakan uji *Kruskall Wallis*. Uji tersebut dipilih untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dengan menggunakan ekstrak etanol daun anggur pada konsentrasi 20, 40, 60, dan 80%.

c. Uji beda zona hambat pada masing-masing konsentrasi ekstrak

Apabila data berdistribusi normal, dilakukan uji menggunakan uji *LSD (Least Significant Difference)*. Sedangkan apabila data tidak berdistribusi normal, dilakukan uji menggunakan uji *Mann Whitney*. Uji tersebut dipilih untuk mengetahui perbedaan zona hambat pada ekstrak etanol daun anggur pada masing-

masing konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

H. Etika Penelitian

Setiap penelitian, terutama yang menggunakan manusia sebagai objek tidak boleh bertentangan dengan etika. Terdapat 6 etika yang menjadi dasar penelitian yang terdiri dari:

1. *Informed consent* (persetujuan menjadi responden)

Informed consent adalah kesepakatan antara penulis dan subjek penelitian yang dituangkan dalam lembar persetujuan yang diberikan sebelum penelitian dimulai. Tujuan dari informed consent adalah untuk memastikan subjek memahami maksud, tujuan, dan manfaat dari penelitian tersebut.

2. *Confidentially* (kerahasiaan)

Kerahasiaan hasil penelitian merupakan prinsip di mana informasi yang telah dikumpulkan dijamin kerahasiaannya oleh penulis. Hanya data tertentu dari kelompok subjek yang akan dilaporkan dalam hasil penelitian. Untuk menjaga kerahasiaan, identitas subjek seperti nama dan alamat disamarkan dan diganti dengan kode khusus. Hal ini bertujuan agar informasi yang berhubungan dengan identitas subjek tidak terungkap secara umum.

3. *Anonymity* (tanpa nama)

Jaminan terhadap subjek penelitian diberikan dengan tidak menyertakan atau mencantumkan nama responden pada lembar pengumpulan data atau hasil penelitian yang akan dipresentasikan.

4. *Justice* (Keadilan)

Justice adalah memberikan tindakan keperawatan seadil-adilnya terhadap subjek penelitian. Subjek harus diberlakukan secara adil baik sebelum, selama dan sesudah keikutsertaannya dalam penelitian tanpa adanya diskriminasi apabila ternyata mereka tidak bersedia atau dikeluarkan dari penelitian.

5. *Beneficence* dan *Non Maleficence* (berbuat baik)

Dengan menerapkan tindakan yang menguntungkan subjek penelitian dan menghindari tindakan yang dapat merugikan subjek penelitian. Kesepakatan mengenai prinsip *beneficence* adalah bahwa kepentingan subjek penelitian tetap lebih penting daripada kepentingan diri sendiri. Prinsip *Non-Maleficence* adalah prinsip yang menekankan untuk tidak menyebabkan kerugian, dengan tujuan melindungi subjek penelitian dari perlakuan yang memanfaatkannya dan memberikan perlindungan terhadap penyalahgunaan.

6. *Veracity* (kejujuran)

Veracity adalah kejujuran, peneliti harus menerapkan prinsip kejujuran dan jelas terhadap responden maupun subjek penelitian mengenai penelitian yang akan dilakukan.

Dalam penelitian ini prinsip etika yang diterapkan adalah *beneficence* dan prinsip *Non maleficence*.