

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Eksperimental. Penelitian Eksperimental menurut Sugiyono (2012) mengatakan metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh dari perlakuan tertentu terhadap yang lainnya dalam kondisi yang terkendalikan. Pada penelitian ini digunakan rancangan acak lengkap. Bentuk rancangan yang digunakan dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 2.
Rancangan Acak Lengkap

Perlakuan (P)	Pengulangan			
	1	2	3	4
P0	P01	P02	P03	P04
P1	P11	P12	P13	P14
P2	P21	P22	P23	P24
P3	P31	P32	P33	P34
P4	P41	P42	P43	P44
P5	P51	P52	P53	P54
P6	P61	P62	P63	P64

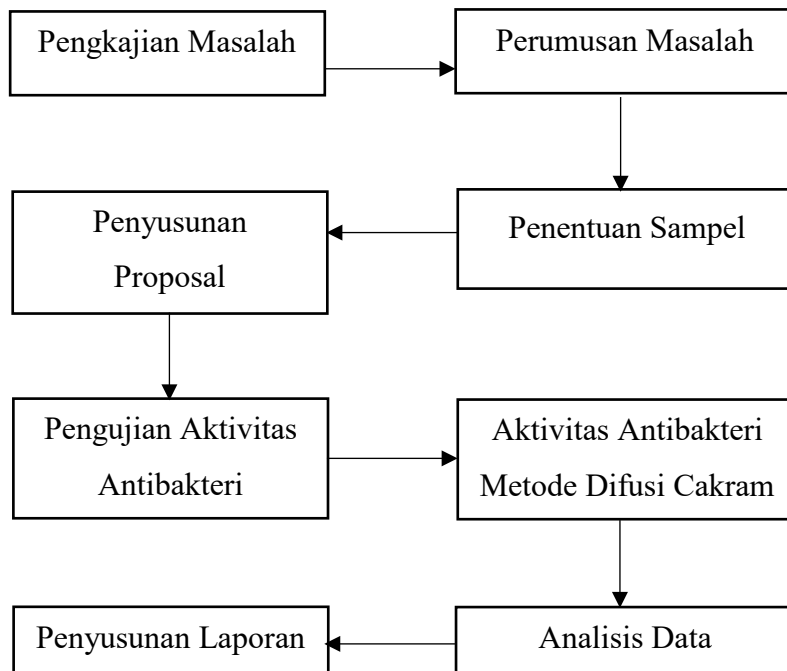
Keterangan:

1. P0 : Pemberian NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif
2. P1 : Pemberian kloramfenikol sebagai kontrol positif

3. P2 : Pemberian kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan virgin coconut oil konsentrasi 10%
4. P3 : Pemberian kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan virgin coconut oil konsentrasi 15%
5. P4 : Pemberian kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan virgin coconut oil konsentrasi 20%
6. P5 : Pemberian kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan virgin coconut oil konsentrasi 25%
7. P6 : Pemberian kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan virgin coconut oil konsentrasi 40%

B. Alur Penelitian

Alur penelitian yang akan dilakukan terdapat pada bagan dibawah ini :



Gambar 6 Skema Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Adapun tempat dilaksanakannya penelitian ini yaitu di Laboratorium Kimia Terapan dan Laboratorium Bakteriologi Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2024 hingga April 2024.

D. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak etanol biji kepuh (*Sterculia Foetida*) dengan *Virgin Coconut Oil* (VCO) yang sudah melewati tahapan evaporasi yang kemudian dibuat dengan konsentrasi yang sama yakni 10%, 15%, 20%, 25% dan 40%. Sampel biji kepuh ini diperoleh dari Desa Sanur, Denpasar Selatan dengan kriteria biji tidak terlalu muda dan tua, serta tidak rusak, sedangkan untuk *virgin coconut oil* menggunakan produk dari KWT Bali Cocos Tabanan. Kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dengan *virgin coconut oil* ini menggunakan etanol 96% yang kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator sehingga didapatkan ekstrak pekat biji kepuh dan *virgin coconut oil*.

2. Replikasi

Biji kepuh yang digunakan sebanyak 3 kg untuk sampel basah lalu disortasi dan dikeringkan kemudian diayak sehingga diperoleh 400gr. Pada penelitian ini sampel yang diuji adalah kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan *virgin coconut oil* dengan beberapa konsentrasi yakni 10%, 15%, 20%, 25% dan 40% dengan pengulangan. Menurut Hanafiah (2014), jumlah pengulangan suatu perlakuan tergantung pada derajat ketelitian yang diinginkan oleh peneliti terhadap hasil percobaan yang telah

dilakukan. Semakin banyak jumlah pengulangan yang dilakukan, maka derajat ketelitian yang didapatkan juga semakin tinggi. Syarat minimal jumlah pengulangan yang dapat dilakukan untuk percobaan laboratorium dapat ditentukan dengan rumus Federer sebagai berikut (Hanafiah, 2014) :

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

Keterangan :

t = Jumlah perlakuan

r = Jumlah ulangan

$$(n - 1)(6 - 1) \geq 15$$

$$5(n - 1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan diatas, maka diketahui penelitian ini memerlukan minimal pengulangan sebanyak empat kali pada setiap variasi sampel.

3. Unit analisis

Unit analisis yang digunakan dalam penelitian ini yakni diameter zona hambat yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi kombinasi ekstrak etanol biji kepuh

(*Sterculia foetida*) dan *virgin coconut oil* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi yakni 10%, 15%, 20, 25%, dan 40%. Seri konsentrasi tersebut dapat digunakan untuk mendapatkan konsentrasi paling kuat dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Data yang dikumpulkan berupa data kuantitatif yaitu data primer dengan melakukan eksperimen di laboratorium. Data primer didapatkan dari hasil pengukuran diameter zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang dihasilkan dari kombinasi ekstrak etanol biji kepuh (*Sterculia foetida*) dan *virgin coconut oil*.

2. Teknik pengumpulan data

Dalam penelitian ini, teknik pengumpulan data adalah pengukuran dengan menggunakan alat ukur melalui eksperimen di laboratorium. Pengukuran dilakukan terhadap diameter zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang dihasilkan oleh ekstrak etanol biji kepuh dalam berbagai konsentrasi. Hasil pengukuran tersebut nantinya dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data pada penelitian ini menggunakan jangka sorong, alat tulis, kamera, dan alat instrument laboratorium.

F. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah tabung vial (4 buah), erlenmeyer iwaku 1000 ml (1 buah), tabung reaksi (4 buah), gelas ukur 250 ml (1

buah), corong kaca (1 buah), pisau (1 buah),blender (1 buah), ose bulat (1 buah), mikropipet 20µl- 1000µl, pinset (1 buah), beaker glass 500 ml (1 buah), api Bunsen (1 buah), rak tabung reaksi (1 buah), spatula (1 buah), batang pendeduk (1 buah), cawan petri (petridisk) (10 buah), jangka sorong (1 buah), mc farland densitometer biosan (1 buah), neraca analitik (1 buah), inkubator escos (1 buah), autoclave (1 buah), oven (1 buah), biosafety cabinet (1 buah), evaporator (1 buah),.

2. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan *virgin coconut oil* (VCO), etanol 96%, aquadest, alumunium foil, kertas saring, cakram disk kosong, bakteri *Staphylococcus aureus*, antibiotik Kloramfenikol 30µg, Media *Nutrient Agar* (NA), Media *Mueller Hinton Agar*, *yellow tip*, dan *blue tip*.

3. Prosedur kerja

a. Pengambilan sampel biji kepuh

- 1) Memilih tempat untuk pengambilan sampel biji kepuh.
- 2) Pengambilan sampel biji kepuh dilakukan dengan mengambil biji kepuh yang sudah terjatuh, dan memilih kriteria biji kepuh yang tidak terlalu muda, tidak terlalu tua, ataupun rusak.
- 3) Ambil hingga diperoleh biji kepuh sebanyak tiga kilogram.

b). Proses pembuatan ekstrak pekat etanol biji kepuh (*Sterculia foetida*)

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

- 1) Mengambil biji kepuh (*Sterculia foetida*) sebanyak 3 kg dan dicuci dan dibersihkan dari kotoran dengan air mengalir.

- 2) Menghilangkan sisa-sisa air dari biji kepuh setelah pencucian dengan proses penirisan.
 - 3) Melakukan penimbangan awal untuk mengetahui massa awal bahan sampel.
 - 4) Mengeringkan bahan sampel dengan cara dioven selama 3 hari.
 - 5) Menimbang 500 gr biji kepuh yang sudah dikeringkan.
 - 6) Melakukan proses sortasi pada biji kepuh yang sudah dikeringkan sebelum biji kepuh dihaluskan untuk memperkecil ukuran butiran bahan kering dengan menggunakan blender.
 - 7) Menghaluskan bahan kering biji kepuh kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk simplisia yang memiliki ukuran seragam.
 - 8) Menimbang sebanyak 300 g serbuk simplisia biji kepuh yang bebas dari kotoran kemudian dimasukan kedalam satu botol 1,5 L dan ditambahkan pelarut etanol 96% hingga semua serbuk simplisia terendam sempurna dengan pelarut.
 - 9) Melakukan proses perendaman selama 2 hari dengan melakukan pengadukan sebanyak 4 kali dalam sehari.
 - 10) Menyaring sampel dengan kertas saring, kemudia filtrat ditampung dan dilakukan proses pemekatan menggunakan evaporator pada suhu 70°C hingga didapatkan ekstrak pekat.
- c. Pembuatan varian kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan virgin coconut oil dengan konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%, dn 40%.

Pembuatan variasi konsentrasi kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan virgin coconut oil dan ditambahkan dengan tween 80 sebanyak 0,6 ml untuk

mencampurkan kedua bahan tersebut. Berikut merupakan rumus yang digunakan dalam pembuatan konsentrasi antara ekstrak dengan VCO :

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

Berdasarkan rumus diatas, maka dapat dicari massa ekstrak etanol biji kepuh dan massa virgin coconut oil yang akan digunakan dalam pembuatan konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%, dan 40% yang dibuat dalam 20 ml massa campuran yang disajikan pada tabel 3 berikut ini.

Tabel 3.
Variasi Konsentrasi

No.	Konsentrasi Ekstrak %	B ₁ (ml) ekstrak	B ₂ (ml) VCO
1.	10%	2 ml	18 ml
2.	15%	3 ml	17 ml
3.	20%	4 ml	16 ml
4.	25%	5 ml	15 ml
5.	40%	8 ml	12 ml

d. Uji kualitatif fitokimia

1) Uji alkaloid

- a) Pipet 3 mL sampel ekstrak bahan alam
- b) Tambahkan beberapa tetes asam sulfat 2 N atau asam klorida 2N
- c) Bagi larutan sampel menjadi 2 bagian
- d) Tambahkan satu bagian dengan 1-2 tetes reagen Mayer dan Wagner
- e) Tambahkan 1-2 tetes reagen Dragendorff ke dalam bagian yang lain
- f) Amati perubahan yang terjadi

- g) Hasil positif bila terbentuk endapan merah-jingga dengan reagen Dragendorff dan terbentuk endapan putih kekuningan dengan reagen Mayer dan Wagner

2) Uji saponin

- a) Pipet 1 mL sampel ekstrak bahan alam
- b) Tambahkan 10 mL air panas
- c) Kocok kuat-kuat campuran selama 10 detik
- d) Amati busa yang muncul selama 5 menit
- e) Tambahkan 1 tetes HCl 2 N
- f) Amati perubahan yang terjadi
- g) Hasil positif jika busa yang terbentuk tidak hilang

3) Uji fenol

- a) Pipet 1 mL sampel ekstrak bahan alam
- b) Tambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 5 %
- c) Amati perubahan yang terjadi
- d) Hasil positif jika terbentuk warna hijau atau hijau biru

4) Uji flavonoid

- a) Pipet 1 mL sampel ekstrak bahan alam
- b) Tambahkan 0,1 mg serbuk Mg
- c) Tambahkan 0,4 mL amil alkohol
- d) Tambahkan 4 mL etanol, kocok campuran
- e) Amati perubahan yang terjadi
- f) Hasil positif jika terbentuk warna merah, kuning atau jingga

5) Uji tanin

- a) Pipet 3 ml sampel ekstrak bahan alam

- b) Tambahkan 3 tetes larutan FeCl_3
- c) Amati perubahan yang terjadi
- d) Hasil positif apabila terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan
- e. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar*
 - 1) Ditimbang sebanyak 9,5 gram media MHA, masukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan sebanyak 250 mL aquades (dari perbandingan pada etiket media yaitu, 38g media MHA disuspensikan ke dalam satu liter aquades).
 - 2) Masukkan *magnetic bar*, panaskan diatas *hotplate stirrer*.
 - 3) Jika media telah homogen, angkat dan tutup menggunakan aluminium foil.
 - 4) Masukkan ke dalam autoclave, sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - 5) Siapkan beaker glass 50 ml yang sudah ditandai dengan menggunakan spidol permanen pada volume 25 ml (masukkan air yang diukur menggunakan gelas ukur sebanyak 25 ml, tandai batas atas air, bungkus beaker glass dengan aluminium foil/plastic autoklaf, sterilisasi bersamaan dengan media).
 - 6) Setelah disterilisasi, tuang media pada beaker glass sampai tanda batas yang telah ditentukan. Kemudian tuang media pada cawan disposable dengan ketebalan 25ml. Penuangan media dilakukan di dalam BSC.
 - 7) Tunggu hingga media padat.
- f. Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)
 - 1) Untuk membuat 2 cawan, media NA ditimbang sebanyak 1,4 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml.
 - 2) Kemudian ditambahkan dengan 50 ml aquadest.
 - 3) Masukkan magnetic stirrer ke dalam erlenmeyer, panaskan diatas hotplate stirrer.

- 4) Jika media telah homogen, angkat dan sumbat erlenmeyer menggunakan kapas lemak dan tutup menggunakan aluminium foil.
- 5) Masukkan ke dalam autoclave, sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 6) Setelah disterilisasi, tuang media ke cawan petri disposable dengan ketebalan 4 mm atau sebanyak 25ml. Penuangan media dilakukan di dalam BSC.
- 7) Tunggu hingga media padat.

g. Peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus*

- 1) Siapkan isolat bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 2) Ambil beberapa koloni bakteri menggunakan ose disposable.
- 3) Kemudian goreskan pada media NA dengan menggunakan goresan 4 kuadran, inokulasi bakteri dilakukan secara aseptis di dalam BSC.
- 4) Lalu inkubasi pada incubator selama 24 jam dengan menggunakan suhu 37°C .

h. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak

- 1) Variasi konsentrasi kombinasi ekstrak etanol biji kepuh yang dikombinasikan dengan virgin coconut oil yang akan digunakan adalah 10%, 15%, 20%, 25%, dan 40%.
- 2) Konsentrasi 10% = 2 ml ekstrak + 18 ml vco.
- 3) Konsentrasi 15% = 3 ml ekstrak + 17 ml vco.
- 4) Konsentrasi 20% = 4 ml ekstrak + 16 ml vco.
- 5) Konsentrasi 25% = 5 ml ekstrak + 15 ml vco.
- 6) Konsentrasi 40% = 8 ml ekstrak = 12 ml vco.
- 7) Kemudian campuran dihomogenkan dan disimpan di dalam kulkas.

i. Pengamatan Bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah di kultur

- 1) Dengan menggunakan kaca objek (slide) bersih, letakkan bakteri di tengah kaca objek dengan menggunakan ose disposable. Jika specimen diambil dari agar plate, beri 1 tetes NaCl 0,9% untuk membuat suspensi terlebih dahulu.
- 2) Buatlah apusan di atas kaca objek sampai didapatkan lapisan tipis, kemudian dikeringkan dengan cara dianginkan.
- 3) Panaskan kaca objek dengan melewati di atas api Bunsen sebanyak 2-3 kali agar terfiksasi.
- 4) Tuangkan cairan pewarna kristal violet pada preparat secara merata, tunggu selama 1 menit. Lalu miringkan preparat dan bilas dengan sedikit air mengalir.
- 5) Tuangkan iodine, kemudian tunggu selama 1 menit. Lalu miringkan preparat dan bilas dengan sedikit air mengalir.
- 6) Lakukan dekolorisasi menggunakan etanol 95% sedikit demi sedikit sampai tidak ada zat warna yang tersisa. Kemudian bilas dengan air mengalir.
- 7) Tuangkan safranin, tunggu 30 detik. Kemudian bilas dengan menggunakan air mengalir dan keringkan.
- 8) Lakukan pengamatan dengan perbesaran 1000 kali dengan menggunakan minyak imersi.

j. Tahap pemeriksaan uji daya hambat

- 1) Disiapkan suspensi bakteri *staphylococcus aureus* dengan konsentrasi McFarland 0,5%.
- 2) Swab kapas steril disiapkan dan direndam ke dalam suspensi bakteri. Setelah meresap, swab kapas diangkat dan diperas dengan menekannya pada dinding tabung dalam sambil diputar.

- 3) Swab kapas yang telah direndam dicelupkan ke permukaan media MHA, dengan goresan merata hingga menutupi seluruh permukaan media.
- 4) Media MHA didiamkan selama 5-15 menit agar suspensi bakteri dapat meresap.
- 5) Cakram yang telah diisi dengan variasi konsentrasi kombinasi ekstrak etanol biji kepuh yang dikombinasikan dengan vco (10%, 15%, 20%, 25% dan 40%) ditempatkan pada permukaan media MHA dan sedikit ditekan dengan pinset agar menempel sempurna.
- 6) Kontrol positif, dan kontrol negatif ditempelkan pada media MHA
- 7) Cakram diletakkan dengan jarak sekitar ± 15 mm, dan setelah ditempel, tidak boleh dipindahkan.
- 8) Media yang telah ditanami cakram diinkubasi di inkubator selama 1x24 jam dengan posisi terbalik pada suhu 37°C

k. Pengukuran diameter zona hambat

- 1) Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong setelah inkubasi selama 1x24 jam
- 2) 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 mm.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini yaitu menggunakan jenis penelitian data primer. Data primer adalah sumber data yang langsung memberikan data kepada pengumpul data atau peneliti (Sugiyono, 2017). Jenis data primer pada penelitian ini yaitu diameter zona hambat yang terbentuk pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan berbagai variasi konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%,

dan 40% kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan *virgin coconut oil*. Data sekunder adalah sumber yang tidak langsung memberikan kepada pengumpul data, misalnya lewat orang atau lewat dokumen (Sugiyono, 2017). Jenis data pada penelitian ini yaitu dengan menggunakan referensi-referensi dari jurnal mengenai tabel katagori diameter zona hambat yang akan dibandingkan dengan diameter zona hambat yang dikumpulkan dari data primer.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini yaitu melalui pemeriksaan laboratorium dengan cara pengukuran diameter zona hambat menggunakan alat berupa jangka sorong dan atau penggaris. Pengukuran ini dilakukan pada diameter zona hambat yang terbentuk pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan berbagai konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25% dan 40% kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan *virgin coconut oil*. Hasil dari pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk dari masing-masing konsentrasi kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan *virgin coconut oil* dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

H. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diambil dari pengukuran perbedaan daya hambat kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan *virgin coconut oil* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yang dinyatakan dalam satuan mm (millimeter) diolah melalui bantuan aplikasi SPSS untuk menguji adanya perbedaan dan dibandingkan dengan aktivitas antibakterinya.

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis kuantitatif, dilakukan dengan uji statistik menggunakan bantuan perangkat lunak

komputer yaitu dengan aplikasi SPSS. Analisis data dilakukan dengan beberapa tahap, antara lain:

- a. Untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak normal digunakan uji kolmogorov smirnov.
- b. Untuk mengetahui perbedaan daya hambat kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan *virgin coconut oil* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25% dan 40% apabila data berdistribusi normal digunakan uji one way anova.
- c. Untuk mengetahui perbedaan rata-rata zona hambat kombinasi ekstrak etanol biji kepuh dan *virgin coconut oil* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25% dan 40% apabila data berdistribusi tidak normal digunakan uji kruskal wallis.
- d. Menggunakan Ui Turkey HSD untuk membandingkan rerata manakah yang berbeda pada data..

I. Etika Penelitian

Penerapan etika penelitian kesehatan dilakukan yakni (Sugiyono dkk, 2020) :

1. Prinsip berbuat baik (beneficence) dan tidak merugikan

Dalam penelitian ini prinsip etika yang diterapkan adalah beneficence, yaitu prinsip kebijakan, 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.

2. Prinsip keadilan (justice)

Prinsip etika ini mengandung arti bahwa hak subjek untuk memperoleh yang adil dan hak sama sebelum, selama dan setelah partisipasi dalam penelitian