

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian Eksperimental Semu (*Quasi experimental*). Penelitian Eksperimental Semu merupakan penelitian yang mendekati Eksperimental Sungguhan (*True experimental*) (Sugiyono, 2017). Pada penelitian ini rancangan yang digunakan adalah *Posttest Only Control Group Design*. Bentuk rancangan penelitian 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 buah mahkota dewa dengan konsentrasi 10, 30, 50, dan 70%

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

X (*Exposure*) : Perlakuan (intervensi)

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

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar, Laboratorium Kimia Terapan, dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2023 - April 2024.

C. Unit Analisa dan Bahan Sampel

1. Unit Analisa

Unit analisis dari penelitian ini adalah zona hambat yang muncul sebagai respons terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol buah mahkota dewa yang dibuat empat konsentrasi yaitu 10, 30, 50, dan 70%.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol buah mahkota dewa yang di buat dengan empat konsentrasi berbeda. Ekstrak etanol buah mahkota dewa dibuat dengan menggunakan buah mahkota dewa yang tua, berwarna merah, berbentuk bulat, dan berukuran 3-5 cm. Kemudian ekstrak tersebut dibuat dengan variasi konsentrasi 10, 30, 50, dan 70%

3. Jumlah dan besar sampel

Sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol buah mahkota dewa yang dibuat dengan 4 variasi konsentrasi yaitu 10, 30, 50, dan 70%. Sebagai kelompok kontrol digunakan etanol 96% sebagai kontrol reagen, NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif, dan kloramfenikol 30 µg sebagai kontrol positif.

Menurut Hanafiah (2023), minimal ada tiga kali pengulangan pengukuran yang harus dilakukan dalam percobaan laboratorium. Semakin banyak pengulangan pengukuran, semakin besar tingkat ketelitiannya. Dalam penelitian ini, tiga kali pengulangan pengukuran dilakukan, menghasilkan 12 data untuk perlakuan dan 9 data untuk kontrol. Dengan demikian, total data yang terkumpul adalah 21.

D. Jenis dan Pengumpulan Data

1. Jenis data

Data yang diperoleh merupakan data primer. Data primer dari penelitian ini adalah zona hambat yang dihasilkan oleh bakteri *Propionibacterium acnes* setelah dipapar dengan sampel ekstrak etanol buah mahkota dewa pada konsentrasi 10, 30, 50, dan 70%.

2. Teknik pengumpulan data

Data dikumpulkan melalui percobaan laboratorium dengan mengukur diameter zona hambat dengan jangka sorong. Zona hambat bakteri *Propionibacterium acnes* yang terbentuk diukur pada konsentrasi 10, 30, 50, dan 70%.

3. Alat dan Bahan

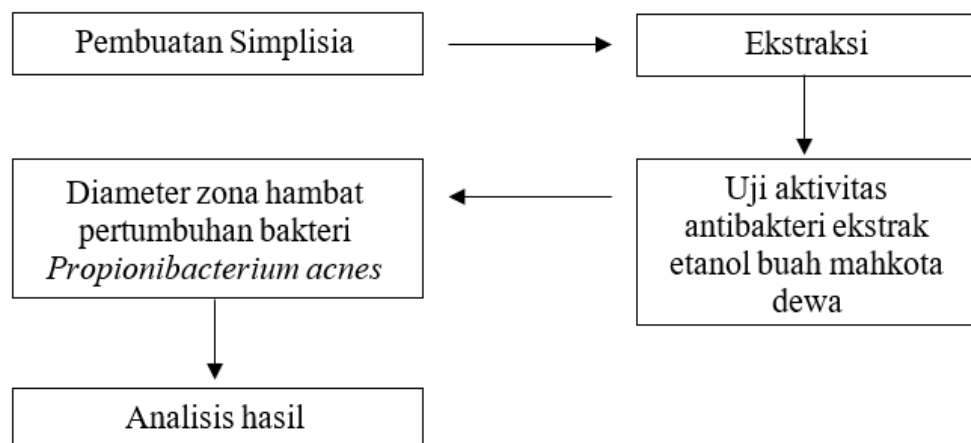
a. Alat

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).

b. Bahan

Buah mahkota dewa, 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%.

4. Kerangka kerja



Gambar 5 Kerangka kerja

5. Prosedur kerja

a. Pembuatan simplisia

Adapun pembuatan simplisia buah mahkota dewa yang diadaptasi dari penelitian yang dilakukan oleh Nurhaini, dkk (2018) yaitu sebagai berikut:

- 1) Buah mahkota dewa dibersihkan dan dipisahkan dari bagian cangkang dan bijinya.
- 2) Bagian daging buah dipotong kecil-kecil kemudian dikeringkan pada oven dengan suhu 45°C hingga kering.
- 3) Setelah kering, kemudian simplisia di blender dan diayak untuk mendapatkan serbuk halus.

b. Pembuatan ekstrak etanol buah mahkota dewa

Pembuatan ekstrak etanol buah mahkota dewa yang diadaptasi dari penelitian yang dilakukan oleh Farhamzah dan Khofifah (2022) dengan sedikit modifikasi oleh peneliti yaitu sebagai berikut:

- 1) Serbuk halus buah mahkota dewa ditimbang sebanyak 236 gram dimaserasi menggunakan etanol 96% sebanyak 2500 ml pada suhu kamar, tertutup rapat, dan terhindar dari cahaya selama 3 hari sambil diaduk setiap harinya.
- 2) Setelah tiga hari, hasil maserasi di saring dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang bersih dan ditutup rapat, dan filtrat dimasukkan ke dalamnya.
- 3) Setelah itu, sisa dimaserasi kembali dengan etanol 96% sebanyak 2500 mililiter pada suhu kamar, tertutup rapat, dan terlindung dari cahaya selama tiga hari, sambil diaduk setiap hari.
- 4) Setelah tiga hari, hasil maserasi di saring dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang bersih dan ditutup rapat, dan filtrat dimasukkan ke dalamnya.
- 5) Ditampung filtrat dari maserasi pertama dan kedua di labu alas bundar, lalu uapkan menggunakan evaporator pada suhu 40–60 derajat Celcius sampai menghasilkan ekstrak kental.

c. Skrining fitokimia ekstrak etanol buah mahkota dewa (Rubianti dkk, 2021)

1) Uji Alkaloid

Dibagi menjadi dua tabung, 3 ml ekstrak dicampurkan dengan tiga tetes HCl 2N. Satu mililiter reagen Dragendorff ditambahkan ke tabung pertama, dan satu mililiter reagen Mayer Wagner ditambahkan ke tabung kedua. Tabung pertama menunjukkan perubahan warna merah dan tabung kedua menunjukkan endapan putih, yang 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 tannin

Dalam 2 ml ekstrak, 1-2 tetes FeCl₃ 1% ditambahkan. Perubahan warna menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan bahwa ada hasil positif.

4) Uji saponin

1 ml ekstrak dicampur dengan 15 ml air panas; kemudian dinginkan dan dikocok dengan kuat. Setelah ditambahkan dengan satu tetes HCl 2N, busa tidak hilang menunjukkan hasil positif.

5) Uji steroid

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

d. Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol buah mahkota dewa

1) Ekstrak etanol buah mahkota dewa yang digunakan memiliki konsentrasi 10, 30, 50, dan 70%. Setiap konsentrasi dibuat dengan menimbang dan mengencerkan ekstrak buah mahkota dewa pekat (dengan konsentrasi 100%) dengan dua mililiter etanol 96%.

2) Untuk mengencerkan, variasi konsentrasi ekstrak etanol buah mahkota dewa dihitung dengan persentase konsentrasi % b/v, seperti yang ditunjukkan dalam persamaan berikut:

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

Keterangan:

% : variasi konsentrasi (%)

b : massa ekstrak buah mahkota dewa (100%)

v : volume yang akan dibuat (2 ml).

3) Perbandingan antara masing-masing konsentrasi ekstrak pekat dan pelarut etanol

96% ditunjukkan di bawah ini:

Tabel 4
Perbandingan Konsentrasi Ekstrak Pekat

Konsentrasi	Berat Ekstrak (g)	Volume Etanol (ml)
10%	0,2	2
30%	0,6	2
50%	1,0	2
70%	1,4	2

4) Campuran dengan masing-masing konsentrasi dicampur bersama dan disimpan dalam tabung reaksi..

e. Pembuatan media MHA (CLSI, 2012)

1) Dengan menggunakan neraca analitik, 6,8 gram media MHA ditimbang. Kemudian dipindahkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 178 mililiter aquadest (etiket media 38 gram media untuk satu liter aquadest).

2) Media dipanaskan pada plat panas sambil diaduk hingga serbuk benar-benar larut sepenuhnya. Setelah itu, pH media diukur dengan stick pH (pH optimum $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C)

3) Selanjutnya, media disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C , yang dihitung dari tercapainya suhu tersebut.

4) Setelah selesai, keluarkan media dari autoklaf dan tunggu hingga suhu turun. Sebanyak 25,4 ml media dimasukkan ke dalam cawan petri masing-masing dengan ketebalan media 4 mm. Kemudian, media dibiarkan hingga padat.

f. Pembuatan suspensi bakteri

- 1) Koloni *Propionibacterium acnes* diambil dari biakan murni dan dimasukkan ke dalam tabung berisi 5 mililiter larutan NaCl fisiologis 0,9% steril sampai konsentrasi 0,5 Mc Farland.
- 2) Dengan menggunakan densitometer Mc Farland, kekeruhan suspensi bakteri dapat diukur. 0,5 Mc Farland setara dengan $1,5 \times 10^8$ (Colony Forming Unit) CFU/ml.

g. Uji aktivitas antibakteri

- 1) Disiapkan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* dengan kepekatan 0,5% Mc Farland.
- 2) Swab kapas steril dipersiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah suspensi bakteri terserap, swab kapas steril diangkat dan diperas dengan menekannya pada dinding bagian dalam tabung sambil memutarnya.
- 3) Swab kapas yang telah dicelupkan tersebut digoreskan ke permukaan media MHA sampai seluruh permukaannya tertutup rapat oleh goresan-goresan. Goresan dilakukan secara merata sehingga seluruh permukaan media tertutup sepenuhnya.
- 4) Media MHA dibiarkan selama 5-15 menit agar suspensi bakteri dapat meresap ke dalamnya.
- 5) Setiap variasi konsentrasi ekstrak etanol buah mahkota dewa, yaitu 10%, 30%, 50%, dan 70%, yang sudah dijenuhkan ke dalam cakram, ditempatkan pada permukaan media MHA. Cakram kemudian ditekan sedikit dengan pinset agar menempel dengan sempurna pada permukaan media.

- 6) Kontrol reagen, kontrol positif, dan kontrol negatif ditempatkan pada permukaan media MHA.
- 7) Cakram diletakkan dengan jarak sekitar ± 15 mm satu sama lain. Setelah ditempelkan pada permukaan media, cakram tidak boleh dipindahkan atau digeser.
- 8) Media yang telah ditemeli cakram diinkubasi di dalam inkubator selama 16-18 jam dalam posisi terbalik pada suhu 37°C .

h. Pelaporan hasil

- 1) Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong (satuan mm) setelah diinkubasi selama 16-18 jam.
- 2) Diameter zona hambat yang diukur adalah daerah jernih di sekitar cakram disk (daerah tanpa pertumbuhan bakteri), diukur dari ujung satu ke ujung lainnya melalui tengah-tengah cakram disk.

E. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Hasil diameter zona hambat dari pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah mahkota dewa terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* diekspresikan dalam satuan milimeter (mm) dan disusun dalam bentuk tabel serta narasi menggunakan teknik tabulasi data.

2. Analisis data

Data yang diperoleh dilakukan analisis menggunakan analisis deskriptif kuantitatif. Diameter zona hambat dihitung rata-ratanya dan diklasifikasikan sesuai dengan tabel yang telah ditetapkan.

F. Etika Penelitian

Dalam penelitian ini, prinsip etika yang diterapkan adalah beneficence, yang mengutamakan kebaikan dan memberikan manfaat kepada orang lain sambil meminimalkan kerugian. Selain itu, prinsip Non-Maleficence juga diterapkan, yang bertujuan untuk mencegah penelitian memanfaatkan subjeknya dan memberikan perlindungan terhadap tindakan penyalahgunaan.