

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang diterapkan adalah metode eksperimen (True experimental). True experimental adalah cara penelitian yang sesungguhnya karena dalam desain ini peneliti memiliki kemampuan untuk mengendalikan semua faktor eksternal yang dapat memengaruhi proses eksperimen (Sugiyono, 2013). Penelitian ini yaitu dirancang untuk memperoleh informasi dengan melihat daya hambat yang dihasilkan dari ekstrak dengan konsentrasi pelarut yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Dalam studi ini digunakan desain *Posttest Only Control Group Design*. Rancangan disajikan pada tabel sebagai berikut:

Tabel 3
Desain Penelitian

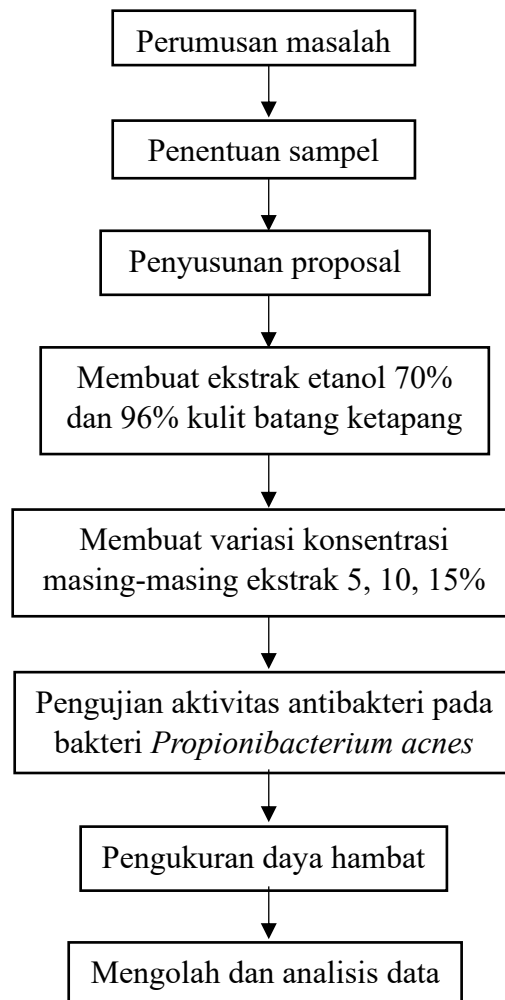
Kelompok	Perlakuan	Posttest
R1	X	O1
R2	Kontrol	O2

Keterangan:

- R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen terdiri dari variasi konsentrasi pada masing-masing ekstrak etanol 70% dan 96% kulit batang ketapang yaitu 5, 10, 15%.
- R2 (Random 2) : Kelompok kontrol digunakan etanol 70% dan 96% sebagai kontrol negatif, dan klindamisin sebagai kontrol positif.
- X (Exposure) : Perlakuan 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



Gambar 4 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Terpadu Poltekkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai April 2025, dihitung dari pengambilan sampel sampai akhir dilakukannya pengujian atau didapatkannya hasil.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Unit analisis pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% dan 96% kulit batang ketapang (*Terminalia catappa*) menggunakan variasi konsentrasi 5, 10, 15% yang dinyatakan dalam nilai zona hambat.

2. Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah tumbuhan Ketapang yang diperoleh di Kelurahan Sanur Kecamatan Denpasar Selatan, Kota Denpasar, Provinsi Bali.

3. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan yaitu ekstrak kulit batang ketapang (*Terminalia catappa*) yang diperoleh dari proses ekstraksi. Kulit batang ketapang yang diekstraksi harus memenuhi kriteria yaitu kulit (epidermis) pada bagian cabang batang dengan ketebalan ± 5 mm, diambil mulai 15 cm dari batang utama, tidak berjamur, tidak busuk, serta tidak terdapat hama menempel di sekeliling kulit batang.



(sumber : Dokumentasi Pribadi)

Gambar 5 Sampel kulit batang ketapang

4. Jumlah dan besar sampel

Pada penelitian ini sampel ekstrak etanol 70% dan 96% kulit batang ketapang (*Terminalia catappa*) menggunakan variasi ekstrak masing-masing 5, 10, 15%. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan, adapun pengulangan ditentukan dengan rumus Federer sebagai berikut (Mushlih & Rosyidah, 2020):

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

Keterangan:

t: jumlah perlakuan

r: jumlah pengulangan

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

$$(9-1)(r-1) \geq 15$$

$$8(r-1) \geq 15$$

$$8r \geq 23$$

$$r \geq 2,875 \text{ dibulatkan menjadi } 3$$

Menurut Hanafiah (2016), syarat minimum untuk sebuah percobaan di laboratorium adalah melakukan tiga kali ulangan. Jika pengulangan semakin banyak dilakukan, semakin akurat hasilnya. Pada penelitian ini setiap konsentrasi dan kontrol diulang sebanyak tiga kali sehingga diperoleh 18 data sampel dari

ekstrak etanol 70% dan 96% masing-masing sebanyak 3 seri konsentrasi dan 9 data kontrol dari kontrol positif serta kontrol negatif.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data Primer

Data primer diperoleh dalam studi ini berasal dari ukuran zona hambat yang disebabkan oleh ekstrak etanol 70% dan 96% dari kulit batang ketapang terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dalam percobaan di laboratorium.

b. Data sekunder

Data sekunder yang diperoleh dalam studi ini didapatkan berasal dari jurnal dan penelitian terdahulu serta data tambahan lainnya.

2. Teknik pengumpulan data

Sampel kulit batang ketapang dalam penelitian ini dipilih menggunakan teknik purposive sampling yang berarti memilih berdasarkan dengan kriteria. Pengumpulan data dilakukan secara observasi atau penelitian laboratorium dengan melakukan pengukuran diameter zona hambat bakteri *Propionibacterium acnes* yang terbentuk dari konsentrasi 5%, 10%, dan 15% pada ekstrak etanol 70% dan 96% kulit batang ketapang.

3. Instrumen pengumpulan data

Pada penelitian ini, instrument yang dipakai untuk mengumpulkan data yakni sebagai berikut:

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

- d. APD (Alat Pelindung Diri)

F. Alat, Bahan dan Prosedur Kerja

1. Alat

Alat-alat yang digunakan terdiri dari blender, toples, gelas ukur, timbangan analitik, pipet tetes, mikropipet, oven, eylemeyer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, hotplate, pengaduk magnetik, lampu spirtus, densitometer Mc Farland, rotary evaporator.

2. Bahan

Bahan yang dipakai adalah kulit dari batang ketapang, etanol 70%, etanol 96%, NaCl steril 0,9%, bakteri *Propionibacterium acnes*, kertas cakram kosong, cakram klindamisin, media Muller Hinton Agar (MHA), ose, petri dish, cotton swab steril, blue tip, aquadest steril, aluminium foil, kertas saring.

3. Prosedur kerja

a. Pengambilan sampel

Sampel kulit batang dari pohon ketapang yang dipilih sesuai dengan kriteria sampel yang ditentukan sebelum penelitian dimulai. Total berat kulit batang yang diperlukan agar mendapatkan ekstrak yang memadai sekitar 2 kilogram.

b. Pembuatan serbuk simplisia

Kulit dari batang ketapang yang diperoleh dilakukan penyortiran, selanjutnya dicuci menggunakan air yang mengalir dan berat batang yang masih segar ditimbang, sebanyak 2 kg digunakan kemudian dikering anginkan atau dioven menggunakan suhu 50°C. Jika proses pengeringan selesai, kulit batang diblender agar menjadi bubuk dan ditimbang beratnya setelah kering.

c. Pembuatan ekstrak

Menurut (Septiyana *et al.*, 2022) ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan dua pelarut yaitu etanol 70% dan 96% yang dituangkan ke masing-masing toples berisi $\pm$ 300 g serbuk simplisia kulit batang dengan perbandingan 1:5, kemudian ditutup dan didiamkan selama 3x24 jam (Nia *et al.*, 2017). Setelah itu, saring simplisia yang mengandung etanol untuk membuat filtrat. Selanjutnya lakukan proses remaserasi dengan menambahkan pelarut etanol 70% dan 96% ke setiap toples sengan jumlah yang sama seperti sebelumnya, tutup wadah campuran tersebut dan selama tiga hari dibiarkan. Setelah tiga hari, pulp yang dihasilkan dari kulit batang ketapang dan etanol disaring kembali untuk memperoleh filtrat. Kemudian menggunakan rotary evaporator filtrat tersebut diuapkan pada suhu 50° C sampai mendapatkan ekstrak kental. Ditentukan bobot ekstrak kental dengan menimbang hasil tersebut.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

d. Skrining fitokimia

1) Flavonoid

Pipet 1 ml sampel, kemudian tambahkan NaOH 2% dan HCl pekat beberapa tetes, homogenkan serta perhatikan reaksinya, jika terbentuk warna kuning atau jingga menandakan hasil yang positif.

2) Alkaloid

Sampel 3 ml kemudian tambahkan 3 tetes HCl 2N, dibagi filtrat menjadi 3 tabung.

- a) Tambahkan 2 tetes reagen Mayer ke dalam filtrat, kemudian perhatikan perubahan yang terjadi. Jika hasil positif, akan terbentuk endapan berwarna putih kekuningan.
- b) Tambahkan 2 tetes reagen Wagner ke dalam filtrat, kemudian perhatikan perubahan yang terjadi. Jika hasil positif, akan terlihat endapan berwarna putih kekuningan.
- c) Tambahkan 2 tetes reagen Dragendorff ke dalam filtrat, kemudian perhatikan reaksi yang terjadi. Jika hasil positif, akan terbentuk endapan berwarna jingga.

3) Terpenoid

Sampel 1 ml dipipet kemudian tambahkan kloroform 2 ml dan anhidrida asetat 10 tetes, tambahkan asam sulfat pekat perlahan 3 tetes melalui samping tabung, perhatikan reaksinya, jika terbentuk warna menjadi hijau atau biru menunjukkan hasil positif.

4) Saponin

Sampel 1 ml dipipet kemudian tambahkan air panas sebanyak 10 ml, dan dikocok campuran sekuat mungkin dalam 10 detik, perhatikan busanya 5 menit, lalu 1 tetes HCl 2N ditambahkan dan lihat perubahannya, apabila busa tetap ada maka hasilnya menunjukkan positif.

5) Tanin

Sampel 1 ml dipipet kemudian tambahkan FeCl_3 5% sebanyak 2 tetes, perhatikan perubahannya, jika hasil positif terlihat warna hijau atau biru kehijauan serta kehitaman.

- e. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak 5, 10, 75%

Menurut (Septiyana *et al.*, 2022) pembuatan konsentrasi ekstrak dilakukan pada ekstrak pekat yang dilarutkan memakai pelarut etanol sebanyak 2 ml. Seri konsentrasi ekstrak disiapkan dengan menimbang stok sampel (ekstrak pekat) menggunakan persentase perbandingan konsentrasi pada rumus di bawah ini (Putri & Trimulyono, 2023):

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

Keterangan :

% : seri konsentrasi (%) ekstrak etanol kulit batang ketapang

b : massa ekstrak etanol kulit batang ketapang (100%)

v : volume pengencer (2 ml)

Sehingga didapatkan masing-masing konsentrasi sebagai berikut:

Tabel 4

Perbandingan Konsentrasi Ekstrak Pekat dengan Pelarut

Konsentrasi ekstrak (%)	Massa ekstrak pekat (gram)	Volume pelarut (ml)
5%	0,1	2
10%	0,2	2
15%	0,3	2

- f. Pembuatan media Mueller Hinton Agar (MHA)

Menurut (Nofita *et al.*, 2020) prosedur pembuatan media MHA yaitu ditimbang 5,7 gram lalu masukkan dalam erlenmeyer dan dilarutkan menggunakan 150 ml aquades, letakkan pada hot plate dan homogenkan sampai larut serta tercampur secara merata dengan batang pengaduk. Berikutnya, pH media diukur memakai stick pH, media lalu disterilkan memakai autoklaf selama 25 menit disuhu 121°C, setelah sterilisasi media selesai lalu dikeluarkan dan didiamkan sampai

media menjadi hangat-hangat kuku. Media yang sudah disiapkan kemudian dituangkan pada cawan petri $\pm$ 15 ml. Kemudian, didiamkan sampai media menjadi padat.

g. Pembuatan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes*

Menurut (Septiyana *et al.*, 2022) pembuatan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* diambil dengan ose kawat steril dari biakan murninya, kemudian disuspensikan pada tabung reaksi berisi 4-5 ml larutan NaCl Fisiologis 0,9% steril sampai konsentrasinya 0,5 McFarland yang diukur menggunakan McFarland densitometer.

h. Uji aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram dilakukan dengan cara *cotton swab* dimasukkan ke dalam suspensi bakteri sampai membasahi seluruh bagian kapas, kemudian kapas steril diputar pada dinding bagian dalam tabung, *Cotton swab* yang sudah dicelupkan ke dalam larutan suspensi bakteri dioleskan ke permukaan media MHA untuk menjangkau seluruh area secara merata, dan media tersebut dibiarkan selama 5-15 m suhu ruang agar suspensi bakteri meresap dengan baik. Setelah itu, cakram yang sudah ditetaskan dengan 10 ul dari konsentrasi 5%, 10,% dan 15% diletakkan pada permukaan media MHA, cakram berisi kontrol negatif dan positif juga diletakkan pada media. Media diinkubasi dengan posisi terbalik menggunakan inkubator suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah proses inkubasi selesai, hasil dilaporkan dengan mengamati zona hambat dan mengukurnya dengan jangka sorong dalam satuan mm.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Hasil diameter hambatan yang didapat dari pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% dan 96% kulit batang ketapang terhadap pertumbuhan *Propionibacterium acnes* diukur dengan satuan milimeter (mm) dan dilakukan pengolahan data, terutama informasi yang disajikan dalam format tabel naratif.

2. Analisis Data

Hasil yang didapat kemudian dianalisis menggunakan uji statistik spss yaitu sebagai berikut:

a. Uji *Shapiro Wilk*

Uji ini digunakan untuk mengetahui normalitas data, data yang berdistribusi normal jika sig. >0,05 dan data tidak berdistribusi normal jika sig. <0,05.

b. Uji *Two Way* Anova

Jika hasil uji *shapiro wilk* berdistribusi normal, lakukan uji *two way* anova untuk menganalisis perbedaan dari aktivitas antibakteri yang dihasilkan kedua pelarut. Apabila sig. > 0,05 maka data berdistribusi sama atau homogen dan sig. <0,05 maka data berdistribusi berbeda.

H. Etika Penelitian

Pada penelitian ini diterapkan etika dengan prinsip yaitu *beneficence*, yaitu prinsip kebajikan berarti memberi manfaat atau keuntungan serta mengurangi kerugian bagi orang lain. Selain itu, prinsip *Non maleficence*, yaitu bertujuan untuk menjamin bahwa subjek dari penelitian tidak dipandang sebagai sesuatu yang merugikan dan memberikan perlindungan dari tindakan penyalahgunaan.