

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang diterapkan pada penelitian ini yaitu metode eksperimen laboratorium dengan desain *Posttest Only Control Group Design* (Arib dkk, 2024). Desain ini digunakan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi ekstrak etanol pegagan terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dengan cara mengukur diameter zona hambat setelah perlakuan diberikan tanpa dilakukan pengukuran awal (pretest).

Kelompok perlakuan diberikan ekstrak etanol pegagan dengan variasi konsentrasi 10%, 20%, 30% dan 50%. Kelompok kontrol terdiri dari kontrol positif menggunakan kloramfenikol dan kontrol negatif menggunakan etanol 96% teknis.

Desain *Posttest Only Control Group Design* yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3

Desain Penelitian

Perlakuan	Perlakuan	Posttest
Ekstrak	X	O1
K+/K-	-	O2

Keterangan:

Ekstrak: kelompok eksperimen terdiri dari variasi konsentrasi pada masing-masing ekstrak etanol 96% yaitu 10, 20, 30, dan 50%.

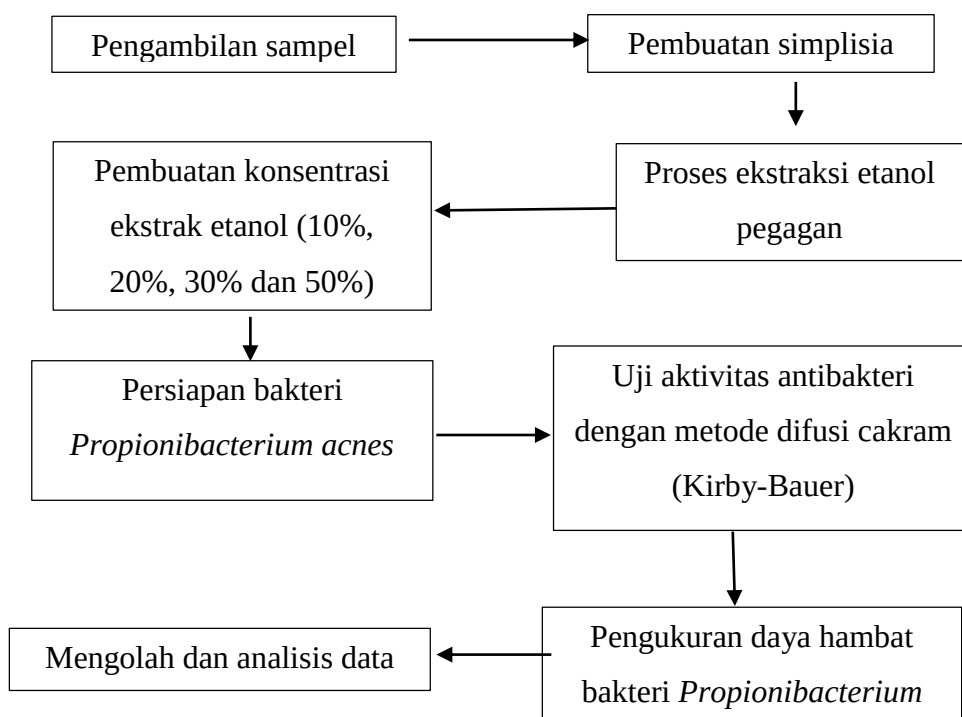
Kontrol K+/K-: kelompok kontrol digunakan etanol 96% teknis sebagai kontrol negatif, dan kloramfenikol sebagai kontrol positif.

X (Exposure): perlakuan pada kelompok eksperimen dengan menggunakan metode difusi cakram.

O1 (Observasi): diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) pada perlakuan kelompok.

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

B. Alur penelitian



Gambar 5 Alur penelitian Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pegagan Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*)

C. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Laboratorium Fakultas Pertanian Teknologi dan Sains Universitas warmadewa.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini akan dibuat dari bulan Maret hingga April 2026.

D. Populasi dan sampel penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang tumbuh di area persawahan Br. Tanggayuda, Desa Kedewatan, Kecamatan Ubud, Kabupaten Gianyar, Provinsi Bali. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah bagian daun dan batang pegagan yang berwarna hijau segar dan memenuhi kriteria inklusi, kemudian diekstraksi menggunakan etanol 96%.

2. Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel menggunakan purposive sampling, yaitu pengambilan sampel secara sengaja berdasarkan kriteria tertentu yang sesuai dengan tujuan penelitian.

3. Unit Analisis

Unit analisis pada penelitian ini merupakan zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) variasi konsentrasi ekstrak etanol pegagan.

4. Jumlah dan besar sampel

Pada penelitian ini sampel ekstrak etanol 96% pegagan (*Centella asiatica*) menggunakan variasi ekstrak masing-masing 10, 20, 30, 50%. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan. Adapun pengulangan ditentukan dengan rumus Federer sebagai berikut :

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

Keterangan:

t : jumlah perlakuan

r : jumlah pengulangan

Dengan 6 perlakuan (4 konsentrasi + kontrol positif+ kontrol negatif), maka diperoleh jumlah ulangan minimal sebanyak 4 kali untuk setiap perlakuan. Sehingga total unit percobaan yaitu $6 \times 4 = 24$ unit percobaan. Yang dimana:

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

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

$$r-1 \geq 3$$

$$r \geq 4$$

Jumlah perlakuan terdiri dari 6 kelompok (kontrol negatif, kontrol positif, dan 4 variasi konsentrasi). Berdasarkan rumus federer diperoleh minimal 4 pengulangan. Sehingga total sampel yaitu 24 sampel.

1. Jenis data yang di kumpulkan

Data yang di dapatkan 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 pengumpulan data pada penelitian ini dilaksanakan dengan cara melakukan pengukuran dengan alat ukur memakai serangkaian percobaan di laboratorium, pada 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 diperoleh dengan mengukur diameter zona hambat menunjukkan adanya aktivitas daya hambat terhadap bakteri.

Erwin (2022), menyatakan bahwa total replikasi perlakuan harus didasarkan pada tingkat presisi yang dicapai peneliti ketika membuat kesimpulan dari data eksperimental. Peningkatan jumlah ulangan berbanding lurus dengan peningkatan ketelitian. Untuk studi di laboratorium, rumus Federer tersedia sebagai alat untuk menentukan jumlah.

3. Instrumen pengumpulan data

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

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

E. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja

1. Alat

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

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: Sampel pegagan 700 g- 1 kg. Jumlah tersebut dipilih untuk memastikan ekstrak yang dihasilkan mencukupi kebutuhan seluruh perlakuan dan pengulangan penelitian, yaitu 4 variasi konsentrasi, kontrol positif, kontrol negatif, serta 4 kali replikasi. Etanol 96%, kertas saring, bakteri *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) ATCC 11827, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media *Nutrient Agar* (NA), *cakram disk kosong*, *cakram klindamisin*, NaCl steril 0,9%, *petri dish disposable* ose, blue tip, *cotton swab steril*, aquadest steril, aluminium foil, *sputum needle* 5cc.

3. Prosedur kerja

a. Persiapan sampel (Putri, 2024)

- 1) Pegagan yang dipakai pada penelitian berasal dari bagian pangkal batang hingga pucuk tanaman, dipilih sesuai di kriteria sampel yang sudah ditetapkan sebelum penelitian. Jumlah pegagan yang di dapatkan agar memperoleh ekstrak yang cukup sekitar 5 kilogram.
- 2) Selanjutnya, pegagan yang sudah dikumpulkan di bersihkan dengan cara merendam di dalam air bersih, kemudian dicuci dan di peras untuk menghilangkan kotorannya yang menempel di tanaman.

- 3) Proses pengeringan tanaman pegagan dilakukan manual dengan dibiarkan terkena angin selama beberapa hari. Proses ini dilakukan dengan meletakan tanaman pada nampan pada area tanpa sinar langsung matahari.
 - 4) Proses pengeringan berlangsung berkisar tujuh hingga sepuluh hari, hingga pegagan benar-benar kering jika bahan sudah semua kering, ditimbang dan dihaluskan sehingga simplisia berbentuk serbuk halus.
- b. Pembuatan ekstrak etanol pegagan pada metode maserasi (Zulkarnaen, 2019).
- 1) 100 gram simplisia dimasukkan pada erlenmeyer berukuran 1000ml.
 - 2) Selanjutnya, 1000ml etanol 96% dituangkan didalam erlenmayer sampai simplisia direndam seluruhnya, dan tutup erlenmayer 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 500ml etanol 96% selama 2 hari 24 jam di lingkungan tertutup rapat dan dilindung dari cahaya matahari. Sesudah 2 hari, filtrat hasil maserasi disaring kembali.
 - 5) Filtrat yang dihasilkan dari proses maserasi kemudian dimasukan kedalam labu penampung di alat evaporator. Labu penampung tersebut dipasang di alat evaporator serta suhu evaporator diatur pada suhu 40 hingga 60°C. Proses ini di buat agar mendapatkan ekstrak kental.
 - 6) Ekstrak pegagan yang dihasilkan lalu ditaruh pada wadah bersih dan ditimbang untuk mendapat berat bersih ekstrak yang dihasilkan.

c. Pembuatan ekstrak etanol pegagan 10%, 20%, 30%, dan 50%

1) Konsentrasi ekstrak 10%, 20%, 30% dan 50% 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 persentase perbandingan konsentrasi % (b/v) yang bisa menentukan pada rumus berikut (Indha, 2023):

$$\% (b/v) = \frac{\text{Massa ekstrak (gram)}}{\text{Volume pelarut (ml)}} \times 100\%$$

Keterangan :

% : variasi konsentrasi (%) ekstrak etanol pegagan

b : massa ekstrak etanol pegagan

v : volume pelarut

adanya massa ekstrak pekat yang bisa membuat tiap konsentrasi ekstrak berada pada tabel berikut:

Tabel 4
Perbandingan Konsentrasi Ekstrak Pekat

Konsentrasi ekstrak (%)	Massa ekstrak pekat (gram)	Volume etanol (ml)
10%	1g	10 ml
20%	2 g	10 ml
30%	3 g	10 ml
50%	5 g	10 ml

3) Selanjutnya ekstrak pekat yang sudah dicampur dengan etanol dihomogenkan dan disimpan.

d. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar (MHA)* (Azlin, Margi, Asiska, 2023).

1) Media MHA sekitar 19 gram ditimbang memakai neraca analitik lalu dipindahkan ke erlenmayer. Ditambahkan 500 ml aquadest (etiket media 38 gram media dilarutkan pada satu liter aquadest).

2) Media dipanaskan diatas hot plate dan diaduk sampai serbuk benar- benar larut dan tercampur secara merata. Selanjutnya, 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) Setelah disterilisasi, media dikeluarkan dari autoklaf dan didiamkan sampai suhu media turun.

5) Media yang sudah disiapkan dituangkan ke cawan petri sekitar 20 ml dengan ketebalan media sekitar 4 mm. Selanjutnya, didiamkan hingga media padat.

e. Pembuatan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* (Hayatus, 2020).

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.

f. Uji aktivitas antibakteri (Metode Difusi Cakram) (Hayatus, 2020).

- 1) Siapkan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) yang telah disertakan dengan standar kekeruhan 0,5 McFarland (setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml).
- 2) Ambil suspensi bakteri menggunakan catton swab (kapas lidi) steril, kemudian lidi ditekan perlahan pada dinding tabung untuk menghilangkan kelebihan cairan.
- 3) Usapkan kapas lidi tersebut pada seluruh permukaan media MHA secara merata (lawing) dengan cara memutar cawan petri agar bakteri tersebar homogen.
- 4) Diamkan media MHA selama 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap sempurna ke dalam agar.
- 5) Siapkan kertas cakram (disk) steril berdiameter 6 mm, kemudian teteskan 40ul masing-masing konsentrasi ekstrak etanol pegagan (10%, 20%, 30%, dan 50%) diamkan selama $\pm 5-15$ menit hingga kertas cakram jenuh.
- 6) Letakan kertas cakram yang telah direndam ekstrak, kontrol positif (Kloramfenikol), dan kontrol negatif (etanol 96%/DMSO) di atas permukaan media MHA menggunakan pinset steril.
- 7) Tekan setiap cakram secara perlahan agar menempel dengan baik pada permukaan media. Pastikan jarak antar cakram minimal 15-20 mm untuk mencegah tumpang tindih zona hambat.
- 8) Inkubasi cawan petri dalam posisi terbalik di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam dalam kondisi anaerob (menggunakan anaerobic jar).
- 9) Amati dan mengukur diameter zona hambat (zona bening) yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm).

- 10) Mencatat hasil pengukuran dan melakukan pengulangan (replikasi) sesuai dengan rancangan penelitian yang telah ditetapkan.

F. Pengolahan dan analisis data

1. Pengolahan data

Pengukuran diameter zona bening yang diperoleh dari studi aktivitas antibakteri ekstrak etanol pegagan terhadap proliferasi *Propionibacterium acnes* (satuan mm) akan dianalisis dengan menerapkan teknik tabulasi data. Data hasil pengujian ini akan dikonversi dan disajikan dalam tampilan tabel yang bersifat neratif.

2. Analisa Data

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

a. Uji normalitas *Shapiro-wilk*

Uji ini digunakan untuk memberitahu normalitas data (Suhendra dkk., 2025).

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui apakah beberapa varian populasi adalah sama atau tidak (Sianturi, 2022).

c. Uji *One Way ANOVA*

Jika hasil uji *Shapiro-wilk* berdistribusi normal, lakukan uji Homogenitas, selanjutnya dilanjutkan ke uji *One Way Anova* agar memberitahu ada tidaknya perbedaan zona hambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. (Nainggolan dkk, 2025).

d. Uji *Post Hoc (Tukey)*

Uji ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar perlakuan (Viando, 2023).

G. Etika Penelitian

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