

**BAB IV**  
**METODOLOGI PENELITIAN**

**A. Jenis Penelitian**

Jenis Penelitian yang digunakan adalah penelitian *true experimental* dengan rancangan penelitian *posttest only control group design*. Dalam desain *true experimental* peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen (Sugiyono, 2012). Menurut Notoatmodjo, (2012) gambar dari rancangan ini seperti Gambar 4.

	Perlakuan	<i>Posstest</i>
R1 (Kelompok Eksperimen)	X	02
R2 (Kelompok Kontrol)	-	02

Gambar 4. Desain Penelitian *Posttest Only Control Group Design*

Keterangan:

R1 : Kelompok eksperimen, dalam penelitian ini yaitu berbagai konsentrasi dari ekstrak etanol daun kersen 10%, 20%, 40%, dan 80%

R2 : Kelompok kontrol, dalam penelitian ini adalah etanol 96%.

X : Perlakuan (Intervensi)

02 : diameter zona hambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*

## **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

### **1. Tempat penelitian**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kimia Dasar, Kimia Terapan, Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Denpasar.

### **2. Waktu penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai Mei 2019.

## **C. Sampel Penelitian**

### **1. Sampel penelitian**

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kersen yang diperoleh dari daun kersen. Kriteria inklusi dari daun kersen yang digunakan adalah daun yang tidak terlalu muda dan terlalu tua kira-kira daun ketiga sampai keenam dari pucuk, berwarna hijau, segar, tidak berlubang, lembaran daun berbulu kelabu. Sementara kriteria eksklusi yaitu, daun yang layu, tidak segar, berwarna kuning, berlubang dan berjamur. Sehingga dalam penelitian ini menggunakan sampel yang memenuhi kriteria inklusi.

### **2. Besar sampel penelitian**

Dari proses ekstraksi etanol daun kersen didapatkan konsentrasi 100% yang digunakan sebagai stok sampel. Ekstrak daun kersen tersebut dibuat dengan 4 konsentrasi yang berbeda yaitu 10%, 20%, 40%, dan 80% yang dibuat dengan mengencerkan stok sampel menggunakan pelarut etanol 96% sehingga besar sampel yang dibutuhkan adalah 1,5 gram. Dalam penelitian ini menggunakan kontrol berupa cakram yang direndam dengan etanol 96%. Pada masing-masing perlakuan tersebut dilakukan pengulangan. Pengulangan masing-masing seri

konsentrasi dalam penelitian ini dapat ditentukan dengan persamaan berikut (Hanafiah, 2008) :

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

Keterangan:

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebanyak  $\geq 5$  kali. Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali, sehingga diperoleh 24 data.

### 3. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun kersen 10%, 20%, 40%, dan 80% dalam menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*.

## **D. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

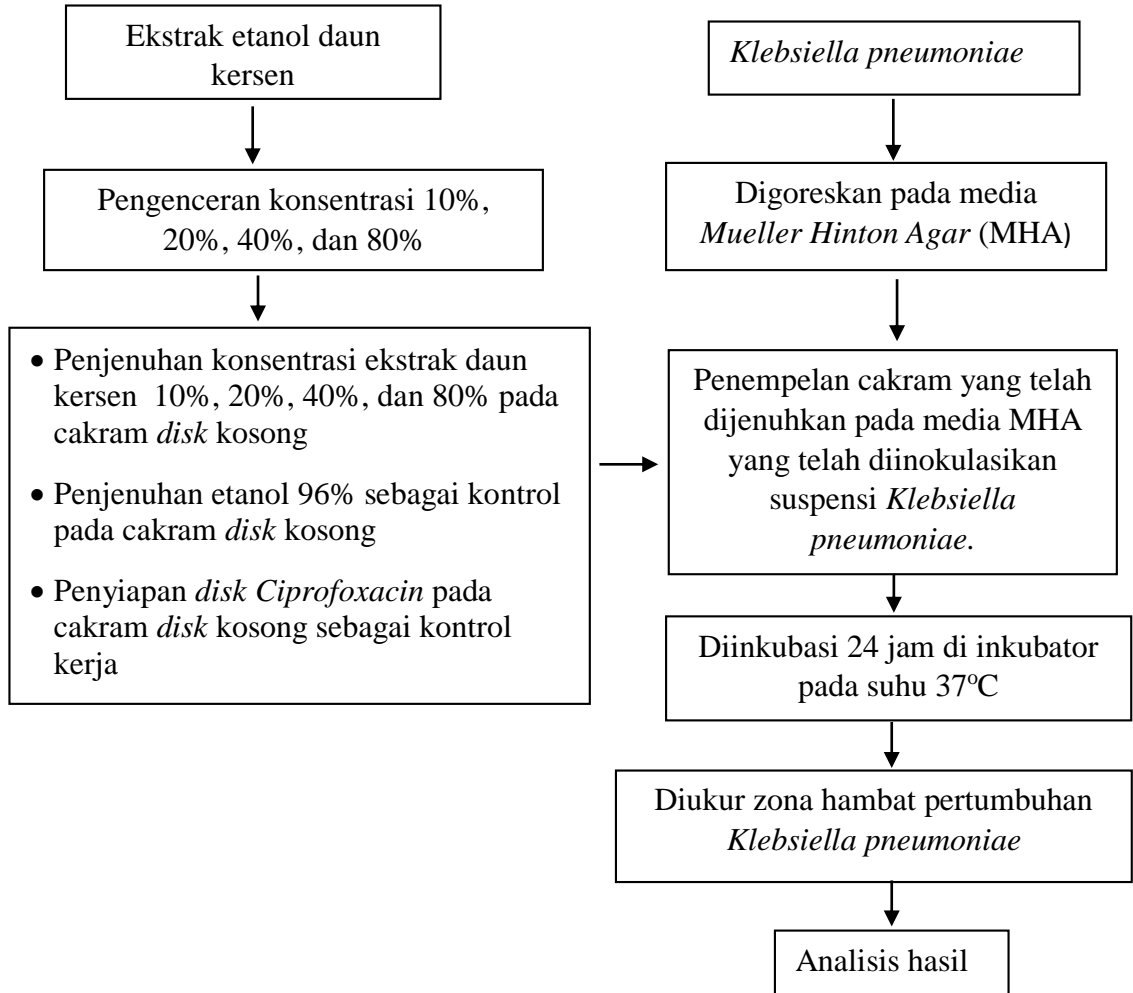
Tabung reaksi (1 buah), pipet ukur (iwaki pyrex ®) 1 ml dan 10 ml (1 buah), ball pipet (d&n ball pipet) (1 buah), cawan porselin (1 buah), gelas ukur (iwaky-pyrex®) 250 ml (1 buah), beaker glass (iwaky-pyrex®) 250 ml (1 buah) dan 800 ml (2 buah), corong (1 buah) bunsen 1 buah, petridisk steril (10 buah), jangka sorong, mikropipet 20µl-1000µl (secorex) dan tip (10 buah), blender (1 buah), neraca analitik (radwag) (1 buah), *Mac Farland* densitometer (Biosan) (1 buah), oven (1 buah) inkubator (Esco) (1 buah), *autoclave* (Tomy Sx-500), rotary evaporator (1 set), dan *biosafety cabinet* (biobase).

### **2. Bahan**

Daun kersen, kertas saring, tabung eppendorf, aluminium foil, aquadest steril 1000 ml, bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC, media Muller Hinton Agar, standar Mac Farland 0,5 %, NaCl fisiologis 0,9 %, cakram *disk* kosong (60 buah), cakram antibiotik *Ciprofloxacin*, lidi kapas steril (1 buah), etanol 96%.

## E. Kerangka dan Prosedur Kerja

### 1. Kerangka kerja



Gambar 5. Kerangka Kerja Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara *In Vitro*

## **2. Prosedur kerja**

### **a. Persiapan sampel**

#### **1) Pembuatan simplisia daun kersen**

- (a) Daun kersen dipetik sesuai kebutuhan dan selanjutnya dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci dengan air mengalir.
- (b) Daun kersen ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.
- (c) Daun kersen dipotong- potong menjadi bagian yang lebih kecil.
- (d) Daun kersen dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dengan menggunakan kipas angin, setelah kering daun kersen diblender dan diayak untuk mendapatkan simplisia berupa serbuk yang halus.

#### **2) Penentuan kadar air simplisia**

- a) Ditimbang berat cawan kosong.
- b) Ditimbang simplisia sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam cawan.
- c) Simplisia kemudian dioven pada suhu 105°C selama 1 jam.
- d) Kemudian cawan berisi simplisia yang sudah dioven didinginkan dan ditimbang.
- e) Simplisia dioven kembali sampai diperoleh berat yang konstan.
- f) Dihitung kadar air yang diperoleh.

#### **3) Pembuatan ekstrak daun kersen dengan metode maserasi**

- (a) Ditimbang serbuk halus simplisia daun kersen sebanyak 100 gram dengan menggunakan neraca analitik.
- (b) Serbuk yang sudah ditimbang kemudian dimasukkan kedalam gelas beaker, kemudian ditambah dengan etanol sebanyak 1200 ml. Ditutup dengan rapat dan

biarkan selama 3 hari terlindungi dari cahaya matahari sambil diulang-ulang diaduk selama 8 jam setiap harinya.

(c) Sesudah 3 hari kemudian disaring, filtrat ditampung ke dalam wadah (botol kaca), selanjutnya residu kembali dimaserasi dengan 1200 ml etanol. Ditungkat dengan rapat dan biarkan selama 3 hari terlindungi dari cahaya matahari sambil diulang-ulang diaduk selama 8 jam setiap harinya.

(d) Sesudah 3 hari kemudian disaring, filtrat ditampung ke dalam wadah (botol kaca yang bersih).

(e) Semua filtrat digabung dan diuapkan menggunakan evaporator (suhu 40 - 60° C) sampai didapatkan ekstrak kental. Timbang bobot ekstrak kental yang diperoleh.

4) Pembuatan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun kersen

(a) Konsentrasi ekstrak etanol daun kersen adalah 10%, 20%, 40%, dan 80%. Konsentrasi ini dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak daun kersen konsentrasi 100% dengan etanol 96%. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak dibuat dalam tabung eppendorf dengan volume total 1 ml.

(b) Pengenceran dilakukan dengan:

Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun kersen menggunakan presentase perbandingan konsentrasi % b/v melalui rumus berikut:

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

Keterangan:

% : variasi konsentrasi dalam satuan persen

b : masa ekstrak etanol daun kersen (100%)

v : volume pengenceran

Adapun jumlah ekstrak daun kersen yang diperlukan dari masing-masing konsentrasi adalah:

- (1) Konsentrasi 80% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,8 gram ekstrak daun kersen konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
  - (2) Konsentrasi 40% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,4 gram ekstrak daun kersen konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
  - (3) Konsentrasi 20% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,2 gram ekstrak daun kersen konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
  - (4) Konsentrasi 10% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,1 gram ekstrak daun kersen konsentrasi 100% kemudian ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas 1 ml.
- (c) Campuran masing-masing konsentrasi ekstrak daun kersen dimasukkan ke tabung eppendorf dan dihomogenkan dihomogenkan.
- 5) Pembuatan media *Mueller Hinton Agar*
- (a) Bubuk media *Mueller Hinton Agar* ditimbang sebanyak 5,7 gram dan dilarutkan dengan 150 ml akuades.
  - (b) Media dipanaskan dengan hotplate dan diaduk hingga homogen.
  - (c) Setelah homogen erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan aluminium foil.
  - (d) Media disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.



- (e) Media dituangkan ke dalam *petridisk* ±4 ml, kemudian didiamkan hingga memadat.
- (f) Apabila tidak langsung digunakan, media dapat disimpan didalam *refrigerator*.
- 6) Penjujukan berbagai konsentrasi ekstrak daun kersen dan kontrol ke dalam cakram
  - (a) Cakram kosong yang berukuran 6 mm disiapkan. Masing-masing cakram direndam ke dalam masing-masing konsentrasi ekstrak daun kersen hingga cairan meresap sempurna.
  - (b) Untuk kontrol digunakan cakram kosong direndam ke dalam etanol 96%.
- 7) Pembuatan suspensi *Klebsiella pneumoniae* 0,5% *Mc Farland*
  - (a) Koloni *Klebsiella pneumoniae* diambil dari biakan murni beberapa ose dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi larutan NaCl fisiologis steril 0,9% dengan volume 10 ml.
  - (b) Kekeruhan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* diukur dengan menggunakan *Mc Farland* densitometer hingga alat menunjukkan kekeruhan suspense bakteri 0,5, dimana 0,5% *Mc Farland* yang setara dengan  $1,5 \times 10^8$  (Colony Forming Unit) CFU/ml.

b. Tahap pemeriksaan

Berdasarkan Virgianti, Rochmanah dan Resty (2017) dengan modifikasi, prosedur pemeriksaan uji daya hambat

- 1) Disiapkan lidi kapas steril, kemudian dicelupkan ke dalam suspensi bakteri 0,5 *Mc Farland* dan didiamkan beberapa saat hingga cairan meresap ke dalam kapas.

- 2) Lidi kapas tersebut kemudian digoreskan pada permukaan media *Muller Hinton Agar* (MHA) hingga merata.
- 3) Median *Muller Hinton Agar* (MHA) didiamkan selama 5-15 menit agar suspensi bakteri dapat meresap ke dalam media.
- 4) Cakram yang telah dijenuhkan dengan masing-masing konsentrasi ekstrak daun kersen diletakkan pada permukaan media yang sudah ditanami bakteri. Kontrol juga diletakkan pada permukaan media tersebut. Jarak antar cakram minimal 15 mm.
- 5) Digunakan juga cakram antibiotik *Ciprofloxacin* sebagai kontrol kerja, yang ditempelkan pada media MHA.
- 6) Media diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37° C selama 24 jam.

c. Pelaporan hasil

Diukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong dan dicatat hasilnya.

## **F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data**

### **1. Jenis data**

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data primer adalah data yang diperoleh secara langsung yang dilakukan oleh peneliti (Sugiyono, 2012). Data dari penelitian ini berupa diameter zona hambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* pada berbagai konsentrasi ekstrak daun kersen yang diperoleh dari pengukuran di laboratorium.

## **2. Teknik Pengumpulan Data**

Teknik pengumpulan data dalam penelitian ini secara observasi dan penelitian laboratorium menggunakan metode difusi cakram *Kirby-Bauer* dengan mengukur diameter zona hambat ekstrak etanol daun kersen terhadap pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Hasil pengukuran diameter zona hambat dari masing-masing unit analisis yang menunjukkan aktivitas penghambatan dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

## **G. Pengolahan dan Analisis Data**

### **1. Teknik pengolahan data**

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa zona hambat ekstrak daun kersen terhadap pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* diolah secara tabulating data (data yang disajikan dalam bentuk tabel) dan narasi.

### **2. Analisis data**

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan uji statistik dengan bantuan perangkat lunak komputer, dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Uji *Kolmogorof Smirnov*, digunakan untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak.
- b. Uji *One Way Anova*, uji ini apabila data berdistribusi normal ( $P > 0,05$ ), untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*, antara konsentrasi 10%, 20%, 40%, dan 80%.
- c. Uji *Least Significant Deference (LSD)*, uji ini digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumonia*