# BAB IV

# METODOLOGI PENELITIAN

## Jenis Penelitian

Pada penelitian ini digunakan jenis penelitian dengan rancangan *One-Shot Case Sutdy* (Sugiyono, 2017). Dimana pada rancangan ini sekelompok subjek akan diberi *treatment* atau perlakuan dan selanjutnya di observasi hasilnya. Bentuk rancangan yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 4.

X O

Gambar 5 rancangan penelitian *One-Shot Case Sutdy*, Sumber : Sugiyono, 2017

Keterangan gambar:

X = *Treatment* atau perlakuan yang diberikan berupa kombinasi VCO dengan ekstrak daun sirih pada berbagai variasi konsentrasi (Variabel Indenden).

O = Observasi dengan melakukan pengukuran diameter zona hambat (Variabel Dependen).

*Treatment* atau perlakuan yang diberikan yaitu berupa variasi konsentrasi VCO yang dicampurkan dengan ekstrak daun sirih yang dibuat menjadi 5 konsentrasi berbeda. Dimana *treatment* tersebut diberikan pada bakteri *Propionibacterium acnes* dengan metode difusi cakram *Kirby-Bauer.* Kemudian dilakukan observasi dengan melakukan pengukuran diameter zona hambat yang dihasilkan.

## Tempat Dan Waktu Penelitian

1. **Tempat penelitian**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium bakteriologi dan laboratorium kimia terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Denpasar.

1. **Waktu penelitian**

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari sampai April 2020, terhitung dari penyusunan proposal sampai ujian akhir penelitian.

## Populasi Dan Sampel Penelitian

1. **Sampel penelitian**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu kombinasi VCO dengan ekstrak daun sirih dan dibuat menjadi 6 konsentrasi yang berbeda. Ekstrak dibuat variasi konsentrasi yaitu 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, dan 55%.

1. **Jumlah dan besar sampel**

Pada penelitian ini terdapat 6 jenis perlakuan variasi konsentrasi VCO yang dikombinasikan dengan ekstrak daun sirih yaitu konsentrasi 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, dan 55%. Menurut Hanafiah (2014), jumlah ulangan suatu perlakuan tergantung pada derajat ketelitian yang diinginkan oleh peneliti terhadap kesimpulan hasil percobaan. Semakin banyak jumlah pengulangan yang dilakukan, maka derajat ketelitian juga semakin tinggi. Syarat minimal jumlah pengulangan yang bisa dilakukan untuk percobaan laboratorium dapat ditentukan dengan rumus *Federer* berikut (Hanafiah,2014):

(n-1).(t-1) ≥ 15

t = jumlah kelompok perlakuan (6 perlakuan variasi konsentrasi)

n= jumlah ulangan

(n-1) (6-1) ≥ 15 → 5 (n-1) ≥ 15 → n-1 ≥ 3 → n = 4

Berdasarkan perhitungan tersebut agar jumlah sampel memenuhi syarat maka jumlah ulangan minimal yang diperlukan adalah 4 kali pengulangan. Maka pada penelitian ini digunakan 6 konsentrasi dan 4 kali pengulangan sehingga didapatkan jumlah sampel sebanyak 24 sampel.

1. **Unit analisa**

Unit analisa dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada variasi konsentrasi kombinasi VCO dengan ekstrak daun sirih yang dibuat menjadi 6 jenis konsentrasi yaitu 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, dan 55%. Konsentrasi ini dipilih untuk mengetahui konsentrasi yang paling kuat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes.*

## Jenis Dan Teknik Pengumpulan Data

1. **Jenis data yang dikumpulkan**

Jenis data yang didapat dari penelitian ini adalah data primer dan data sekunder. Sumber data primer merupakan sumber data yang langsung memberikan data kepada pengumpul data (sugiyono, 2017). Data diperoleh dari hasil pengukuran zona daya hambat yang dihasilkan oleh kombinasi VCO dan ekstrak daun sirih dengan berbagai variasi konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* melalui eksperimen laboratorium. Sedangkan data sekunder didapatkan dari sumber data yang tidak langsung memberikan data kepada pengumpul data (sugiyono, 2017). Data sekunder dieroleh dari dokumen serta jurnal-jurnal ilmiah.

1. **Cara pengumpulan data**

Cara pengumpulan data yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan melakukan pengukuran dengan alat ukur melalui eksperimen laboratorium. Pengukuran dilakukan pada diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* yang dihasilkan pada berbagai konsentrasi dari kombinasi VCO dan ekstrak daun sirih. Diameter diukur menggunakan jangka sorong atau penggaris kemudian dinyatakan dalam satuan millimeter (mm). Hasil pengukuran diameter zona hambat menunjukkan adanya aktivitas daya hambat bakteri.

1. **Instrument pengumpulan data**

Dalam penelitian ini yang digunakan sebagai instrumen pengumpul data adalah jangka sorong, kamera, alat tulis, dan instrumen laboratorium.

## Alat Dan Bahan

1. **Alat**

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini yaitu :

Pipet ukur *Iwaki* 1 ml (1 buah), pipet ukur *Iwaki* 10 ml (1 buah) ball pipet (1 buah), gelas ukur *Iwaki* 1000 ml (1 buah), gelas ukur *Iwaki* 50 ml (1 buah), bunsen spritus (1 buah), ose (1 buah), pinset (1 buah), spatula (1 buah), petridish steril (10 buah), tabung reaksi *Iwaki* (25 buah), beaker glass 5 ml *pyrex* (5 buah), beaker glass *pyrex* 500 ml (1 buah), Erlenmeyer *pyrex* 1000 ml (1 buah), blender *philips* (1 buah), neraca analitik *radwag* (1 buah), *Mc Farland* densitometer *biosan* (1 buah), inkubator *esco* (1 buah), autoclave *Tomy 5x-500* (1 buah), evaporator *buchi* (1 unit), *biosafety cabinet biobase* (1 unit).

1. **Bahan**

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini yaitu:

Daun sirih sebanyak 2,5 kg, VCO KWT Bali Cocos 100 ml, etanol 96% (teknis) 2000 ml, bakteri *Propionibacterium acnes,* cakram disk kosong (*oxoid*) 24 buah, media *Muller Hinton Agar* (MHA), Aquadest steril 1000 ml, tween 80, standar *Mc Farland* 0,5, NaCl 0,9%, cakram antibiotik *Amoksisilin oxoid* (1 buah), lidi kapas steril (1 buah), alkohol 70%, kertas saring, aluminium foil.

## Kerangka Kerja Dan Prosedur Kerja

1. **Kerangka Kerja Uji Aktivitas Antibakteri**

*Propionibacterium aacnes*

Digoreskan sampai penuh pada media MHA

Dibuat konsentrasi 0,5*McFarlland*

Cakram disk kosong yang direndam pada ekstrak daun sirih dengan VCO konsentrasi 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, dan 55%.

1. Cakram disk yang direndam dengan VCO
2. Cakram disk antibiotik amoksisilin

Inkubasi pada inkubator dengan suhu 37oC selama ±24 jam

Diukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*  yang dinyatakan dengan satuan millimeter (mm), kemudian dikategorikan menjadi daya hambat lemah, sedang, kuat, sangat kuat

Analisa data

Gambar 4 Kerangka kerja

**Keterangan gambar :**

Bakteri *Propionibacterium acnes* dibuat suspensi dengan tingkat kekeruhan 0,5 *McFarlland* (setara dengan 1,5 x 108 sel bakteri) yang diukur dengan alat densitometer, kemudian digoreskan pada media MHA secara merata. Cakram disk dari masing-masing konsentrasi ekstrak daun sirih dengan VCO serta kontrol ditempelkan pada media MHA dengan jarak minimal tiap disk yaitu 15 mm, kemudian diinkubasi pada pada inkubator dengan suhu 37oC selama ±24 jam. Selanjutnya diukur diameter zona hambat yang terbentuk pada setiap disk dengan menggunakan jangka sorong. Hasil kemudian dianalisis dengan analisis statistik.

1. **Prosedur Kerja**
2. **Teknik pengambilan sampel dan pembuatan simplisia**

Sampel segar daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dikumpulkan dari Desa Sibetan, Kecamatan Bebanden, Kabupaten Karangasem di Provinsi Bali. Daun sirih yang digunakan yaitu daun sirih muda yaitu pada umur fisiologis muda pada daun ke 3 sampai ke 5 dari pucuk. Daun sirih muda mengandung diastase, gula dan minyak atsiri lebih banyak dibandingkan dengan daun sirih tua (Hamzah, Santosa dan Iswara, 2018). Daun yang telah dikumpulkan dicuci dengan air mengalir, dipilih hanya daun yang berwarna hijau, tidak berlubang atau robek, dan tidak layu. Sampel ditiriskan kemudian ditimbang dan didapatkan jumlah daun sirih sebanyak 2,5 kg, kemudian dikeringkan pada suhu kamar dan dihindarkan dari paparan sinar matahari langsung karena dapat menyababkan senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri dapat rusak oleh paparan sinar matahari secara langsung (Wijaya, Paramita dan Susanti, 2018). Sampel yang telah kering diserbukkan dengan menggunakan blender. Kemudian sampel diayak dan ditimbang, didapatkan jumlah simplisia sebanyak 400 gram. simplisia disimpan dalam wadah tertutup kedap.

1. **Uji kadar air**

Simplisia kemudian diuji kadar airnya, dengan metode oven, untuk memastikan kadar air simplisia telah memenuhi syarat yaitu ≤ 10 % (BPOM RI, 2014). prosedur uji kadar air yang dilakukan yaitu:

1. Cawan porselen disterilkan dalam Oven selama 1 jam dengan suhu 105ºC. kemudian didinginkan selama 15 menit dan ditimbang beratnya (A gram).
2. Sampel ditimbang sebanyak 1 gram dan ditaruh dalam cawan porselen yang telah diketahui beratnya (B gram). Sampel dalam porselen ini kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105ºC sampel konstan selama 3 jam, selanjutnya didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang (C gram).
3. Penimbangan ini diulang sampai diperoleh berat yang konstan. Rumus perhitungan kadar air yaitu:

Kadar Air = $\left(\frac{B-C}{B-A}\right)$ x 100

Dimana :

A = Berat kering cawan (gr)

B = Berat kering cawan dan sampel awal (gr)

C = Berat kering cawan dan sampel setelah dikeringkan (gr) (Kumesan, Pandey dan Lohoo, 2017).

1. **Prosedur pembuatan ekstrak daun sirih**

Menggunakan metode Wijaya, Paramita and Susanti, (2018), pembuatan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L*.) dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk daun sirih hijau (*Piper betle L.)* ditimbang sebanyak 150 gram kemudian ditempatkan dalam Erlenmeyer ukuran 1 liter, kemudian direndam dengan 1000 mL etanol 96% selama 7x24 jam pada suhu ruang 32°C terlindung dari cahaya dengan pengadukan selama 6 jam sehari dengan bantuan *magnetic stirer*. Hasil maserasi disaring, diukur filtrat yang diperoleh. Residu dimaserasi kembali dengan etanol 96% sebanyak 750 mL selama 7x24 jam dan dengan pengadukan selama 6 jam sehari dengan bantuan *magnetic stirer*. Kemudian disaring, seluruh filtrat yang diperoleh ditampung menjadi satu dan diuapkan dengan menggunakan alat rotary evaporator pada suhu 60°C. Suhu evaporasi digunakan 60°C, hal ini karena pada penelitian (Hamidah, Kumalaningsih dan Dewi, 2010), dari hasil penelitian tersebut ekstrak kental daun sirih terbanyak dihasilkan pada proses evaporasi dengan suhu 60°C.

1. **Prosedur pembuatan variasi konsentrasi ekstrak daun sirih dan VCO**

Variasi konsentrasi dibuat dengan mencampurkan VCO dengan ekstrak daun sirih dengan 5 konsentrasi yang berbeda yaitu 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, dan 55%. Dimana rumus pembuatan variasi konsentrasi ekstrak yaitu (Widhy, 2019):

% massa ekstrak = $\frac{massa ekstrak}{massa total (massa ekstrak+massa VCO)}$ x 100 %

Pembuatan variasi konsentrasi dibuat dengan persentase b/b dengan massa total 5 gram. Berdasarkan rumus diatas maka pembuatan variasi konsentrasi ekstrak dilakukan seperti pada Tabel 5.

Tabel 5

Tabel pembuatan variasi konsentrasi ekstrak

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **No** | **Konsentrasi ekstrak (%)** | **B1 (gram ekstrak)** | **B2 (gram VCO)** |
| 1 | 5% | 0,25 gam | 4,75 gram |
| 2 | 15 % | 0,75 gram | 4,25 gram |
| 3 | 25 % | 1,25 gram | 3,75 gram |
| 4 | 35 % | 1,75 gram | 3,35 gram |
| 5 | 45 % | 2,25 gram | 2,75 gram |
| 6 | 55 % | 2,75 gram | 2,25 Gram |

Setelah dibuat variasi konsentrasi ekstrak, kemudian ditambahkan larutan tween 80 sebanyak 1,5 mL untuk membantu melarutkan ekstrak dengan VCO serta membantu ekstrak berdifusi pada media agar MHA.

1. **Prosedur uji daya hambat bakteri**

Aktivitas antimikroba dari ekstrak etanol sirih dilakukan menggunakan teknik difusi cakram, mengikuti metode yang telah dilakukan oleh Candrasari, Romas dan Astuti, (2011). Pelat agar dibuat dengan menuangkan 15 ml media MHA cair ke dalam cawan petri steril. Media yag telah siap pada bagian bawah plat dibuat garis-garis pembagian dengan menggunakan spidol dan dilabeli masing-masing konsentrasi ekstrak. Selanjutnya plate pertama diolesi secara merata dengan bakteri *Propionibacterium acnes* yang telah dibandingkan dengan standar 0,5 *Mc.Farland.* Kemudian pada masing-masing pembagian media ditanami cakram disk yang telah direndam VCO yang dikombinasikan ekstrak daun sirih pada konsentrasi 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, dan 55%, kontrol kerja dan kontrol penelitian. Selanjutnya inkubasi plate pada suhu 37oC selama 18-24 jam. Zona hambatyang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan millimeter (mm).

## Pengolahan Dan Analisis Data

1. **Teknik pengolahan data**

Data diambil dari diameter zona hambat ekstrak etanol daun sirih yang dikombinasikan dengan VCO, melalui analisis dengan statistik untuk menguji adanya perbedaan zona hambat dan dibandingkan dengan data Tabel aktivitas antibakteri pada Tabel 2.

1. **Analisa data**

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis kuantitatif, dilakukan dengan uji statistik menggunakan bantuan aplikasi computer yaitu SPSS. Analisis data dilakukan dilakukan dalam beberapa tahap:

1. Uji *Kolmogorov smirnov* merupakan uji untuk mengetahui data distribusi normal atau tidak.
2. Uji *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan zona hambat kombinasi VCO dan ekstrak daun sirih terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada berbagai variasi konsentrasi, uji ini digunakan apabila data berdistribusi normal.
3. Uji *Kruskal Wallis,* untuk mengetahui perbedaan zona hambat kombinasi VCO dan ekstrak daun sirih terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada berbagai variasi konsentrasi, uji ini digunakan apabila data berdistribusi tidak normal.
4. Uji Statistik LSD (*Least Significant Deference*), Uji ini digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.