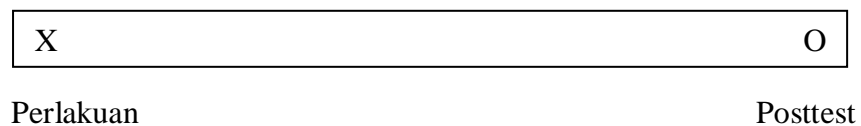


BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan digunakan adalah penelitian *true experimental design* dengan desain penelitian *one shot case study*. Dalam rancangan ini, tidak terdapat kelompok kontrol sebagai pembanding hasil kelompok eksperimen. Kelompok perlakuan diberikan permulaan kemudian untuk mengetahui hasilnya dilakukan pengukuran pada akhir kegiatan eksperimen (Yusuf, 2014). Rancangan ini dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 1. Desain Penelitian *One Shot Case Study*

Keterangan:

X : Variasi konsentrasi ekstrak daun mimba

O : Pengukuran diameter zona hambat

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Februari sampai April 2021.

C. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel adalah sebagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut, ataupun bagian kecil dari anggota populasi yang diambil menurut prosedur tertentu sehingga dapat mewakili populasi (Siyoto & M. A. Sodik, 2015). Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica A. Juss*) yang sudah melewati tahapan evaporasi. Daun mimba diperoleh dari daerah Desa Sading, Kec. Mengwi, Kab. Badung. Daun mimba dipilih menurut kriteria inklusi yang telah ditetapkan peneliti yaitu bagian daun mimba yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau dan tidak berlubang. Daun mimba diambil pada bagian ketiga sampai keenam dari pucuk. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu daun mimba yang tidak segar, layu, berwarna kuning kecoklatan, dan berlubang yang tidak sesuai dengan kriteria yang ditentukan peneliti. Ekstrak daun mimba didapatkan dengan merendam bubuk simplisia daun mimba menggunakan etanol 96%, kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat daun mimba.

2. Besar dan jumlah sampel

Pada penelitian ini sampel yang diuji adalah ekstrak daun mimba dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25 dan 30% yang dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak pekat daun mimba menggunakan pelarut etanol 96%.

Sebagai kontrol positif atau kontrol kerja digunakan antibiotik *Chloramphenicol* 30µg, dan kontrol negatif digunakan pelarut etanol 96%. Sehingga jumlah total perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 perlakuan. Pada masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan. Pengulangan masing-masing seri konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini dapat ditentukan berdasarkan persamaan berikut :

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

Keterangan :

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4.75 \rightarrow 5$$

Berdasarkan perhitungan diatas, pengulangan yang akan dilakukan adalah sebanyak lima kali. Namun dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, dengan demikian diperoleh data sebanyak 15 unit analisis. Menurut Hanafiah (2016), jumlah minimal pengulangan yang digunakan dalam penelitian laboratorium adalah cukup tiga kali pengulangan.

3. Unit analisis

Unit analisis yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah zona hambat berbagai konsentrasi ekstrak daun mimba dalam menghambat

pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada berbagai konsentrasi yaitu 10, 15, 20, 25 dan 30%.

D. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Data yang akan dikumpulkan berupa data kuantitatif yakni data primer dengan melakukan eksperimen laboratorium. Data primer diperoleh dari hasil pengukuran diameter zona hambat pada pertumbuhan *Propionibacterium acnes* yang dihasilkan oleh ekstrak daun mimba.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang akan dilakukan dalam penelitian ini adalah pengukuran dengan alat ukur melalui eksperimen laboratorium. Pengukuran dilakukan terhadap diameter zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* yang dihasilkan oleh ekstrak daun mimba dalam berbagai konsentrasi. Hasil pengukuran tersebut dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

3. Instrumen pengumpulan data

Dalam penelitian ini instrumen yang akan digunakan dalam pengumpulan data yaitu sebagai berikut :

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

E. Alat, Bahan, Kerangka Kerja dan Prosedur Kerja

1. Alat

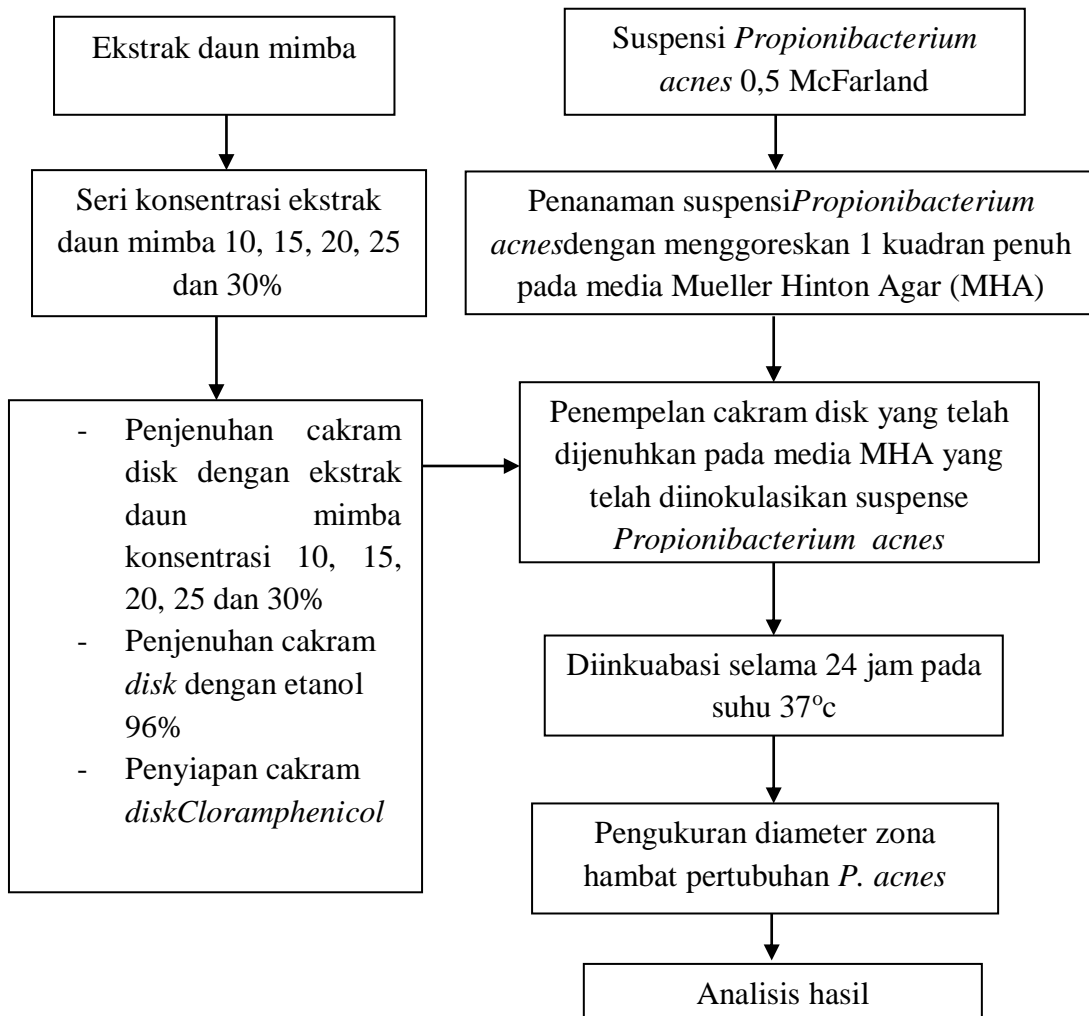
Alat yang akan diperlukan dalam penelitian ini adalah tabung vial (1 buah), erlemeyer 100 ml (Pyrex) (2 buah), tabung reaksi (Pyrex) (1 buah), gelas ukur 250 ml (Pyrex) (1 buah), corong (1 buah), pisau (1 buah), ose bulat (1 buah), mikropipet 20 – 200 μ l dan 100 – 1000 μ l (SOCOREX) (masing – masing 1 buah), Pinset (1 buah), gelas kimia 1000 ml (DURAN) (1 buah), api bunsen (1 buah), , tabung *ependorf* (7 buah), rak tabung reaksi (1 buah), spatula (2 buah), batang pengaduk (2 buah), cawan petri (*petridish*) (15 buah), jangka sorong (1 buah), Mc Farland Densitometer (Biosan) (1 buah), neraca analitik (RADWAG) (1 buah), refrigerator (1 buah), Inkubator (ESCO Isoterm) (1 buah), Autoclave (TOMY SX-500) (1 buah), Hotplate (JISICO) (2 buah), magnetic stirrer (2 buah), Oven (eLOS) (1 buah), dan Biosafety Cabinet (Biobase), evaporator (IKA®RV 10 Basic).

2. Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun mimba, etanol 96%, bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, media *Mueller Hinton Agar* (Oxoid), standar 0,5Mc Farland, larutan NaCl fisiologis 0,9%, Alkohol 70%, *blank* cakram disk (35 buah), cakram *disk Cloramphenicol* 30 μ g (3 buah), *cotton swab* (1 buah), *Yellow tip* (6 buah), *Bluetip* (1 buah), kapas berlemak, aluminium foil, dan kertas saring.

3. Kerangka Kerja dan Prosedur Kerja

a. Kerangka Kerja



Gambar 2. Kerangka Kerja Penelitian

b. Prosedur kerja

1) Pembuatan ekstrak daun mimba

a) Daun mimba dipetik dari tangkai ketiga sampai keenam secukupnya sesuai kebutuhan. Daun kemudian dibersihkan dari kotoran dan dicuci pada air mengalir. Dilakukan proses sortasi basah untuk memilih bahan sampel sesuai kriteria yang digunakan dalam penelitian.

b) Daun mimba ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.

- c) Dilakukan penimbangan awal untuk mengetahui masa awal bahan sampel.
 - d) Daun mimba dikeringkan dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari secara langsung.
 - e) Daun mimba yang sudah kering dikumpulkan dan ditimbang kembali.
 - f) Dilakukan proses sortasi pada daun mimba yang sudah kering sebelum daun dihaluskan untuk memperkecil ukuran butiran bahan kering. Proses penghalusan menggunakan blender.
 - g) Daun mimba yang telah dihaluskan kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk simplisia dengan ukuran butiran yang seragam.
 - h) Ditimbang sebanyak 700 g bubuk simplisia daun mimba yang bebas dari kotoran kemudian dibagi kedalam tujuh botol 1,5 L dan tambahkan pelarut etanol 96% hingga semua serbuk simplisia terendam pelarut (± 700 ml).
 - i) Dilakukan proses perendaman selama 2 hari dengan pengadukan sebanyak 4 kali dalam sehari.
 - j) Ekstrak dipisahkan dengan residu dengan cara menyaring sampel dengan kertas saring.
 - k) Semua filtrat ditampung, kemudian dilakukan proses pemekatan menggunakan evaporator (suhu 70°C) hingga didapatkan ekstrak pekat.
 - l) Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian ditimbang dan disimpan dalam *refrigerator*.
- 2) Pembuatan seri konsentrasi ekstrak daun mimba

- a) Konsentrasi ekstrak daun mimba yang digunakan adalah 10, 15, 20, 25 dan 30%. Masing-masing konsentrasi tersebut dibuat dengan cara penimbangan ekstrak pekat daun mimba dan pelarut etanol 96%
- b) Seri konsentrasi ekstrak daun mimba dibuat dengan menimbang stok sampel (ekstrak pekat) sesuai perhitungan menggunakan presentase perbandingan konsentrasi % (b/b) yang dapat ditentukan melalui rumus berikut :

$$\% = \frac{\text{massa zat terlarut}}{\text{massa larutan}} \times 100$$

Berdasarkan rumus diatas, maka dapat dicari massa ekstrak daun mimba dan massa pelarut yang akan digunakan dalam pembuatan konsentrasi 10, 15, 20, 25 dan 30% yang disajikan pada Table 3.

Tabel 1
Variasi Konsentrasi Ekstrak Daun Mimba

Konsentrasi	Ekstrak Daun Mimba (gram)	Etanol 96% (gram)
1	2	3
10%	0,1	0,9
15%	0,15	0,85
20%	0,2	0,8
25%	0,25	0,75
30%	0,3	0,7

- c) Campuran pada masing-masing konsentrasi dihomogenkan dan disimpan dalam refrigerator.
- 3) Prosedur pembuatan media uji sensitivitas (*Mueller Hinton Agar/ MHA*)

- a) Bubuk media Mueller Hinton Agar ditimbang sebanyak 11,4 gram menggunakan neraca analitik.
 - b) Setelah proses penimbangan, bubuk media dipindahkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan 300 ml akuades.
 - c) Media dipanaskan dengan hotplate dan diaduk hingga homogen.
 - d) Setelah bubuk media larut sempurna dan homogen, Erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan aluminium foil.
 - e) Media disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dihitung dari tercapainya suhu 121°C.
 - f) Media yang telah disterilisasi, didiamkan sampai suhu media turun menjadi $\pm 40 - 50^{\circ}\text{C}$.
 - g) Media dituangkan secara aseptis ke dalam cawan petri dengan volume 13 ml, kemudian didiamkan hingga memadat.
 - h) Setelah media memadat, cawan petri dibalik, dan apabila tidak langsung digunakan media yang sudah dituangkan pada cawan petri disimpan didalam refrigerator.
- 4) Proses penjuhan berbagai konsentrasi ekstrak daun mimba dan kontrol ke dalam cakram kosongan
 - a) Disiapkan cakram kosong yang berukuran 6 mm. Masing-masing variasi konsentrasi ekstrak daun mimba dipipet sebanyak 20 μl dan dijenuhkan ke dalam cakram hingga cairan meresap sempurna.
 - b) Untuk kontrol digunakan cakram kosong yang dijenuhkan dengan 20 μl etanol 96% yang digunakan sebagai pelarut pengenceran.

- c) Untuk kontrol positif yang digunakan sebagai kontrol kerja adalah cakram antibiotik *Cloramphenicol* 30 µg. Kontrol kerja berfungsi sebagai pembanding hasil pemeriksaan apabila nantinya kelompok perlakuan menghasilkan hasil positif/ menunjukkan terbentuknya zona hambat dan mengontrol sterilitas prosedur kerja.
- 5) Pembuatan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes*
 - a) Koloni bakteri *Propionibacterium acnes* dari hasil peremajaan diambil beberapa ose dan disuspensikan kedalam tabung reaksi berisi 5 ml larutan NaCl Fisiologis 0,9% steril sampai memperoleh konsentrasi 0,5 *McFarland*.
 - b) Kekeruhan suspensi bakteri dibaca dengan menggunakan *McFarland* densitometer. 0,5 *McFarland* setara dengan $1,5 \times 10^8$ (*Colony Forming Unit*) CFU/ml.
 - 6) Tahapan pemeriksaan
 - a) Disiapkan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* yang telah dibuat
 - b) Disiapkan *cotton swab* steril dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri tersebut
 - c) *Cotton swab* steril diperas dengan cara menekannya pada dinding dalam tabung dan diangkat
 - d) Dilakukan inokulasi pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) (goresan dilakukan secara merata hingga menutupi seluruh permukaan media)
 - e) Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah diinokulasikan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* didiamkan selama 15 menit agar suspensi bakteri meresap kedalam agar

- f) Setelah permukaan media kering, masing-masing cakram yang sudah dijenuhkan dengan variasi konsentrasi ekstrak daun mimba ditempelkan pada media yang sudah diinokulasikan suspensi bakteri dan sedikit ditekan dengan pinset sampai cakram melekat sempurna pada permukaan media
- g) Kontrol negatif dan positif ditempelkan pada media MHA yang berbeda
- h) Jarak antar cakram minimal 15 mm dan cakram disk yang telah ditempelkan tidak boleh dipindahkan atau digeser
- i) Media yang sudah ditempel dengan cakram disk didiamkan 5 sampai 15 menit.
- j) Media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam posisi terbalik
- 7) Pelaporan hasil
 - a) Dilihat zona hambat yang terbentuk yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar cakram disk
 - b) Zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dari sisi yang satu ke sisi yang lain melalui tengah-tengah cakram dan dilaporkan dengan satuan millimeter (mm).

4. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun mimba terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* yang dinyatakan dalam satuan millimeter (mm)

diolah menggunakan teknik tabulating data yaitu data yang disajikan dalam bentuk tabel naratif.

2. Analisis data

Data yang telah diperoleh lalu dianalisis dengan uji statistik dengan bantuan *software* computer. Data diuji dengan menggunakan uji sebagai berikut :

a. Uji *Kolmogorov-Smirnov* (KS)

Pengujian ini dilakukan untuk melihat normalitas data, apakah data berdistribusi normal atau tidak.

b. Uji *One Way Anova*

Jika uji KS data berdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan zona hambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. Jika ada perbedaan, dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Deference*).

c. Uji *Least Significant Deference* (LSD)

Uji digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* apabila data berdistribusi normal.