

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan peneliti adalah jenis penelitian adalah penelitian kuantitatif dengan metode penelitian *true experimental design* ekstrak etanol daun lakum (*Cayratia trifolia*). Dimana pada penelitian ini memiliki kemampuan untuk memberikan perlakuan (intervensi) terhadap subjek. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun lakum (*Cayratia trifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*.

B. Subjek dan Objek Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis* yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Samarinda. Sampel yang di gunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun lakum (*Cayratia trifolia*) yang di ambil dari Kelurahan Loa Ipuh, Kecamatan Tenggarong, Kabupaten Kutai Kartenagara, Kalimantan Timur.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini direncanakan akan dilakukan pada bulan Januari 2022-Maret 2022 di Laboratorium Kimia Bahan Alam Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur, Laboratorium Ekologi dan Konservasi Biodiversitas Hutan Tropis Universitas Mulawarman dan Laboratorium Mikrobiologi Sekolah Ilmu Kesehatan Samarinda.

D. Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No.	Variabel Penelitian	Keterangan
1.	Variabel bebas (<i>independent variable</i>)	Pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun lakum (<i>Cayratia trifolia</i>) dengan varian konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, Kontrol negatif dan kontrol positif.
2.	Variabel terikat (<i>dependent variable</i>)	Pada penelitian ini adalah zona hambat pertumbuhan bakteri <i>P. acnes</i> dan <i>S. epidermidis</i> yang dipengaruhi oleh variabel bebas dengan konsentrasi yang telah ditentukan.
3.	Varibel terkendali	Pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri <i>P. acnes</i> dan <i>S. epidermidis</i> .

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa alat-alat gelas (pyrex), cawan porselin, *rotary evaporator*, bunsen, jarum ose, timbangan analitik, kertas saring, toples kaca, spatula, cawan petri, tube, mikropipet, kertas coklat, batang pengaduk, *autoclave*, *waterbath*, inkubator, mikroskop cahaya.

2. Bahan Penelitian

a. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun lakum (*Cayratia trifolia*) yang diambil dari Kelurahan Loa Ipuh, Kecamatan Tenggara, Kabupaten Kutai Kartanegara, Kalimantan Timur.

b. Bahan Ekstraksi

Sampel daun lakum (*Cayratia trifolia*), etanol 96%.

c. Bahan Uji Antibakteri

1) Bahan Media Agar

Media Nutrient Agar (NA) 10 gr, 500 ml aquadest

2) Bahan Suspensi Bakteri

Koloni bakteri *P. acnes* dan *S. epidermidis*

3) Bahan Kontrol Antibiotik Klindamicin

Kontrol positif : klindamisin 30 ppm

Kontrol negatif : acetone

d. Bahan Difusi Sumuran

Media agar (NA), ekstrak etanol daun lakum (*Cayratia trifolia*), kontrol positif dan negatif.

F. Metode Pengumpulan Data

Pada penelitian ini, teknik pengumpulan data yang digunakan adalah observasi, yaitu suatu teknik pengumpulan data dengan mengamati secara langsung objek yang diteliti, yaitu diameter zona hambat dari ekstrak daun lakum terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis* yang terdapat pada media *Nutrient Agar* (NA) yang telah tercampur dengan ekstrak daun lakum dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 25%, 50%, 75%, 100% dan kontrol positif clindamycin 30 ppm, satuan pengamatan dalam sentimeter (cm). Menurut Sugiyono (2014) mengemukakan bahwa, observasi merupakan suatu proses yang kompleks, suatu proses yang tersusun dari berbagai proses biologis dan psikologis. Dua di antara yang terpenting adalah proses-proses pengamatan dan ingatan.

G. Teknik Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menghitung standar deviasi (SD) dan rata-rata dengan menggunakan *Excel* serta dalam analisis data menggunakan SPSS yaitu uji normalitas, uji homogenitas, uji *One Way Anova* dan uji Tukey.

1. Uji Normalitas

Uji normalitas pada penelitian menggunakan uji Shapiro-Wilk. Uji Shapiro-Wilk dipilih karena jumlah sampel yang diteliti sedikit. Uji ini dilakukan dengan membandingkan variansi konsentrasi ekstrak, kontrol negatif dan kontrol positif dengan zona hambat (Madang *et al.*, 2017). Data dikatakan jika:

a) Terdistribusi normal

Data dikatakan memiliki distribusi normal apabila diperoleh nilai signifikansi $p = >0,05$.

b) Terdistribusi tidak normal

Data dikatakan memiliki distribusi normal apabila diperoleh nilai signifikansi $p = <0,05$.

2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas menggunakan uji Levene melalui program *Statistical Program and Service Solution (SPSS)*. Uji ini dilakukan dengan membandingkan variansi konsentrasi ekstrak, kontrol negatif, dan kontrol positif dengan zona hambat (Madang *et al.*, 2017).

Data dikatakan jika:

a) Homogen

Data dikatakan memiliki data homogen apabila diperoleh nilai signifikansi $p = >0,05$.

b) Tidak homogen

Data dikatakan memiliki data tidak homogen apabila diperoleh nilai signifikansi $p = <0,05$.

3. Uji *One Way Anova*

Setelah dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas variansi diperoleh data yang berdistribusi normal dan homogen. Kemudian dilanjutkan dengan uji anova satu jalan (*One Way*) dengan dasar pengambilan keputusan berdasarkan signifikansinya (Wulandari *et al.*, 2017), yaitu:

a) Jika nilai signifikansi $p = <0,05$, maka H_0 ditolak, artinya terdapat pengaruh yang signifikan antara variabel independent terhadap variabel dependen.

b) Jika nilai signifikansi $p = >0,05$, maka H_0 diterima, artinya tidak terdapat pengaruh yang signifikan antara variabel independent terhadap variabel dependen.

4. Uji Tukey

Uji Tukey dilakukan dengan taraf signifikan 95% atau $p = 0,05$ ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan signifikan dari variansi konsentrasi ekstrak, kontrol negatif dan kontrol positif terhadap diameter zona hambat bakteri penyebab jerawat.

H. Alur Jalannya Penelitian

1. Ekstraksi

Ditimbang simplisia kering daun lakum sebanyak 300 gram kemudian dimasukkan ke dalam wadah maserasi, lalu direndam dengan pelarut etanol 96% sebanyak 2,250 mL dan dibiarkan selama 3-5 hari sambil sesekali diaduk. Setelah didiamkan, kemudian ekstrak etanol daun lakum disaring dan diperas lalu ekstrak cair di uapkan dengan menggunakan rotary evaporator, residu dari maserasi dimasukkan kembali ke dalam toples kaca dan dimaserasi kembali selama 3-5 hari. Dipisahkan residu dengan filtrat, lalu diuapkan dengan menggunakan rotari evaporator, kemudian ekstrak kental dimasukkan dalam botol kaca (Ilyas *et al.*, 2019).

2. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti. Metode skrining fitokimia dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna. Hal yang berperan penting dalam skrining fitokimia adalah pemilihan pelarut dan metode ekstraksi. Skrining fitokimia dapat dilakukan baik secara kualitatif, semi kualitatif, maupun kuantitatif sesuai dengan tujuan yang diinginkan. Metode skrining fitokimia secara kualitatif dapat dilakukan melalui reaksi warna dengan menggunakan suatu pereaksi tertentu (Kristianti *et al.*, 2008).

a. Alkaloid

Alkaloid dapat diidentifikasi dengan menggunakan tiga pereaksi yaitu pereaksi mayer, pereaksi bouchardat, dan pereaksi dragendorf. Sampel dinyatakan positif mengandung alkaloid bila terdapat paling sedikit 2 dari 3 percobaan (Marjoni, 2016).

Diambil sampel secukupnya kemudian tambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml aquadest, panaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat dilakukan percobaan dengan pereaksi berikut:

1) Pereaksi Mayer

Tiga tetes filtrat, lalu tambahkan 2 tetes pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih atau kuning.

2) Pereaksi Bouchardat

Tiga tetes filtrat, lalu tambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat menghasilkan endapan coklat-hitam.

3) Pereaksi Dragendorf

Tiga tetes filtrat, lalu tambahkan 2 tetes pereaksi Dragondorf menghasilkan endapan merah bata.

b. Flavonoid

Sejumlah sampel ditambahkan 10 ml air panas, didihkan selama 5 menit dan saring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 ml lalu tambahkan 50 mg serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terbentuk warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Marjoni, 2016).

c. Saponin

Sejumlah sampel ditambahkan 10 ml air panas, didihkan selama 5 menit dan saring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian didinginkan lalu kocok kuat selama 10 detik tambahkan HCl 2N. Amati jika terbentuk buih setinggi 1-10 cm

yang tidak hilang kurang dari 5 menit, maka menunjukkan adanya senyawa saponin (Marjoni, 2016).

d. Tanin

Masing-masing sampel disaring dengan 10 ml aquadest, selama 3 menit lalu dinginkan dan saring. Filtrat diencerkan sampai tidak berwarna, lalu tambahkan 1-2 tetes pereaksi FeCl_3 jika terbentuk warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Marjoni, 2016).

e. Terpenoid/Steroid

Sejumlah sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dengan 0,5 ml kloroform, kemudian tambahkan 0,5 ml anhidrat dan 3 ml H_2SO_4 pekat. Jika terbentuk warna merah atau ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid, sedangkan terbentuknya warna biru atau hijau menunjukkan adanya steroid (Liniawati *et al.*, 2019).

3. Pewarnaan Gram

Kaca preparate dibersihkan dengan menggunakan alkohol kemudian dipanaskan didekat api Bunsen. Isolat bakteri ditetaskan diatas kaca preparate, kemudian dipanaskan didekat api Bunsen hingga isolat bakteri kering. Langkah selanjutnya yaitu penetesan larutan kristal violet pada isolat bakteri, lalu didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan aquadest mengalir dan dikeringkan didekat api bunsen. Hasil pewarnaan kristal violet ditetaskan larutan iodin, didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan aquadest mengalir dan dikeringkan didekat api bunsen. Hasil pewarnaan iodin ditetaskan dengan safranin, didiamkan selama 2 menit, dicuci dengan aquadest mengalir dan dikeringkan didekat api bunsen. Setelah kering, hasil pewarnaan gram diamati dibawah mikroskop (Rachma *et al.*, 2009).

4. Uji Antibakteri

a. Pembuatan Media Agar

Sebanyak 5 gram media *Nutrient Agar* (NA) dimasukkan ke dalam gelas beker dan dilarutkan dalam 250 mL aquadest steril. Kemudian diaduk dengan *stirrer* dan dipanaskan dengan *hot plate* untuk memastikan media tersuspensi sempurna. Setelah media tersuspensi sempurna, kemudian dimasukkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit, lalu ditunggu sampai suhu hangat (40-45°C). NA yang sudah siap, dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL. Media didiamkan sampai memadat (Putrajaya *et al.*, 2019).

b. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% hingga di peroleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland. Perlakuan ini dilakukan pada setiap jenis bakteri uji (Mpila *et al.*, 2012).

c. Pembuatan Kontrol Antibiotik

Kontrol positif : dibuat dengan melarutkan 0,10 g clindamicyn ke dalam 100 ml aceton, aduk hingga larut. Dipipet 300 µl lalu ditambahkan aceton 700 µl.

Kontrol negatif : aceton

d. Uji Antibakteri dengan Metode Sumuran

Siapkan media yang sudah dituang ke cawan petri. Media *Nutrient Agar* (NA) yang sudah dingin dan memadat ditanami bakteri *P. acnes* dan *S. epidermidis* yang diambil dari suspensi bakteri. Kemudian dibuat 4 lubang berukuran 6 mm dengan menggunakan tip *micro pipet*. Masing-masing lubang sumuran dimasukkan kontrol positif, kontrol negatif, dan ekstrak yang diujikan. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji dilakukan dengan 4 kali duplikasi dan 3 kali replikasi (Putrajaya *et al.*, 2019).

e. Pengukuran Zona Hambat

Pengamatan dan pengukuran diameter hambatan dilakukan setelah masa inkubasi 24 jam. Zona hambatan yang terbentuk diukur dengan menggunakan penggaris. Berdasarkan zona hambat yang terbentuk maka aktivitas antibakteri dapat digolongkan menjadi beberapa golongan yaitu antibakteri yang tergolong lemah (zona hambat < 5 mm), sedang (zona hambat antara 5-10 mm), kuat (zona hambat antara 10-20 mm), dan tergolong sangat kuat (zona hambat > 20 mm) (Putrajaya *et al.*, 2019).