

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu penelitian secara eksperimental. Desain yang digunakan adalah post test only control grub design. Penelitian bertempat di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Borneo Lestari, Banjarbaru.

Rumus Federer :

Keterangan :

t = Jumlah Kelompok Perlakuan

n = Banyaknya Pengulangan t

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

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

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

$$n5-5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Tabel. 2 Model eksperimen perlakuan

No	Kontrol (+)	Kontrol (-)	Konsentrasi Ekstrak			
			5%	10%	15%	20%
1	K _{+,1}	K _{-,1}	K5.1	K10.1	K15.1	K20.1
2	K _{+,2}	K _{-,2}	K5.2	K10.2	K15.2	K20.2
3	K _{+,3}	K _{-,3}	K5.3	K10.3	K15.3	K20.3
4	K _{+,4}	K _{-,4}	K5.4	K10.4	K15.4	K20.4

Keterangan :

- K (+) : Doksisisiklin disk sebagai kontrol positif
K (-) : Na CMC 0,5% sebagai kontrol negatif
K 5% : Konsentrasi ekstrak 5%
K 10 % : Konsentrasi ekstrak 10%
K 15% : Konsentrasi ekstrak 15%
K 20% : Konsentrasi ekstrak 20%

3.1 Tempat dan waktu

Waktu penelitian pada bulan Mei sampai dengan Juni 2022 dan tempat yang digunakan untuk melakukan penelitian ini adalah :

- a. Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari Banjarbaru
- b. Laboratorium Steril STIKES Borneo Lestari Banjarbaru
- c. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi STIKES Borneo Lestari Banjarbaru

3.2 Variabel Penelitian**a. Variabel bebas**

Penelitian ini memiliki variabel bebas yaitu variasi konsentrasi uji aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L.)

b. Variabel terikat

Penelitian ini memiliki variabel terikat yaitu diameter zona hambat dari ekstrak metanol kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L.) terhadap bakteri *P.acnes*

3.3 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *oven*, timbangan analitik (*Scout Pro*[®]), *blender* (National[®]), ayakan 40 mesh, bejana kaca, batang pengaduk, gelas ukur, tabung reaksi (Iwaki[®]), *vacum rotary evaporator* (IKRF10[®]), incubator (*Memmert*[®]), kawat ose, api bunsen, jangka sorong (Caliper Lcd Screen[®]), cawan petri, autoklaf, LAF, Erlenmeyer (Pyrex[®]), gelas beker (Pyrex[®]), pipet tetes dan *waterbath* (*Memmert*[®])

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ialah Ekstrak Kental Kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L.), bakteri uji *Propionibacterium acnes*, *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC), Pereaksi Dragendroff, Pereaksi Meyer, dan Pereaksi Wagner, aquadest steril, etanol 70%, metanol, Doksisisiklin disk (Oxoid), *Nutrient Agar* (105450), H₂SO₄, FeCl, BaCl₂, 2H₂O, NaCl 0,9 %, *Mueller-Hinton Agar* (CM0337), HCl, gelatin 1%, kertas saring, kertas label dan aluminium foil.

3.4 Prosedur Penelitian

3.5.1 Derteminasi Bahan

Derteminasi sampel tanaman kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L.) Laboratorium FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

3.5.2 Pengambilan dan Pengolahan Sampel

a. Pengumpulan kulit Pisang Kepok

Bagian kulit Pisang Kepok diambil daerah Banjarbaru, Kalimantan Selatan (Wahyuni dkk, 2014)

b. Sortasi Basah

Dilakukan untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari tumbuhan sebelum pencucian dengan cara membuang bagian-bagian yang tidak perlu sebelum pengeringan, sehingga didapatkan herba yang layak untuk digunakan. Cara ini dapat dilakukan secara manual (Wahyuni dkk, 2014)

c. Pencucian

Dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada tumbuhan. Pencucian dilakukan dengan air bersih, misalnya air dari mata air, air sumur atau air PDAM. Pencucian dilakukan sesingkat mungkin agar tidak menghilangkan zat berkhasiat dari tumbuhan tersebut (Wahyuni dkk, 2014)

d. Perajangan.

Perajangan dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan. Sebelum dirajang tumbuhan dijemur dalam keadaan utuh selama 1 hari. Perajangan dapat dilakukan dengan pisau, dengan alat mesin perajang khusus sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran yang dikehendaki (Wahyuni dkk, 2014)

e. Pengeringan

Keringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung selama ± 2 hari, dilanjutkan dengan oven selama 2 hari pada suhu 40°C sampai sampel tanaman Pisang Kepok benar-benar kering, kemudian timbang berat keringnya (Wahyuni dkk, 2014)

f. Sortasi Kering.

Dilakukan untuk memisahkan bendabenda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotoran-pengotoran lain yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering. Proses ini dilakukan secara manual (Wahyuni dkk, 2014)

g. Pengepakan dan Penyimpanan

Selama penyimpanan ada kemungkinan terjadi kerusakan pada simplisia. Untuk itu dipilih wadah yang bersifat tidak beracun dan tidak bereaksi dengan isinya sehingga tidak menyebabkan terjadinya reaksi serta penyimpangan warna, bau, rasa dan sebagainya pada simplisia. Untuk simplisia yang tidak tahan panas diperlukan wadah yang melindungi simplisia terhadap cahaya, misalnya aluminium foil, plastik atau botol yang berwarna gelap, kaleng dan sebagainya. Penyimpanan simplisia kering biasanya dilakukan pada suhu kamar (150°C - 300°C) (Wahyuni dkk, 2014)

3.5.3 Pembuatan Serbuk simplisia

Kulit Pisang Kepok dicuci bersih dengan air mengalir. Selanjutnya ditiriskan, kemudian tanaman dipotong kecil-kecil dengan

ketebalan \pm 1-2 mm. Ditimbang sebanyak 2 kg sampel, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung selama \pm 2 hari, dilanjutkan dengan oven selama 2 hari pada suhu 40°C sampai sampel tanaman Pisang Kepok benar-benar kering, kemudian timbang berat keringnya. Setelah itu sampel tanaman tersebut dibuat serbuk (Ningsih dkk, 2013)

3.5.4 Pembuatan Ekstrak Kulit Pisang

Sebanyak 200 gram kulit Pisang Kepok yang telah dihaluskan dimaserasi dengan metanol selama 3x24 jam. Ekstrak yang diperoleh disaring dengan corong Buchner menggunakan vakum dan filtrat yang diperoleh diuapkan dengan rotary vacuum evaporator hingga didapat ekstrak kental. Agar diperoleh ekstrak kulit Pisang Kepok dalam jumlah banyak proses ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali (Supriyanti dkk, 2015)

3.5.5 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak

Dibuat larutan uji ekstrak metanol dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%. Pada pembuatan konsentrasi digunakan Na CMC 0,5% sebagai pelarutnya. Pada pembuatan konsentrasi 5% menambahkan 2,5 g ekstrak dalam 10 ml Na CMC 0,5%; pada konsentrasi 10% menambahkan g ekstrak dalam 10 ml Na CMC 0,5%; pada konsentasi 15% menambahkan 1,5 g ekstrak dalam 10 ml Na CMC 0,5%; dan pada konsentrasi 20% menambahkan 2 g ekstrak dalam 10 ml Na CMC 0,5% (Manawan dkk, 2014)

3.5.6 Skrining Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan pada ekstrak kulit pisang terseleksi hasil partisi. Ekstrak tersebut diuji adanya alkaloid, triterpenoid, steroid, flavonoid, fenol, glikosida, saponin, dan tannin

a. Uji Alkaloid

Pemeriksaan senyawa alkaloid dilakukan dengan pereaksi Dragendorff, Meyer, dan Wagner. Reaksi positif jika terbentuk endapan merah dengan pereaksi Dragendorff, endapan coklat dengan pereaksi Wagner, dan endapan putih pada penambahan pereaksi Meyer (Asih dkk, 2018)

b. Uji Triterpenoid dan steroid

Uji triterpenoid juga bisa dilakukan dengan penambahan H_2SO_4 50%. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna ungu
Pemeriksaan senyawa triterpenoid dan steroid dilakukan dengan penambahan pereaksi Liebermann-Burchard. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau-biru (Asih dkk, 2018)

c. Uji Flavanoid

Uji flavonoid dilakukan dengan test wilstatter dan Bate Smith-Metcalf. Test Wilstatter dilakukan dengan cara sebagai berikut: Sampel dalam alkohol ditambah HCl pekat dan 2-3 potong kecil logam Mg, reaksi positif jika memberikan warna orange-merah. Test Bate Smith-Maetcalfe dilakukan dengan cara sebagai berikut: sampel dalam alkohol ditambah HCl pekat kemudian dipanaskan

selama 15 menit di atas penangas air, reaksi positif jika memberikan warna merah (Asih dkk, 2018)

d. Uji Saponin

Uji Saponin (tes buih) dilakukan dengan cara: 2 mL ekstrak dalam tabung reaksi dikocok selama dua menit. terbentuknya buih yang stabil menunjukkan adanya saponin (Asih dkk, 2018)

e. Uji Tanin

Uji senyawa tanin dapat dilakukan dengan uji warna dengan larutan gelatin. Jika ekstrak mengandung tanin akan terbentuk endapan putih (Asih dkk, 2018)

f. Uji Fenol

Uji senyawa golongan fenol dilakukan dengan penambahan larutan FeCl_3 1%, adanya fenol akan memberikan endapan biru hingga hitam kehijauan (Asih dkk, 2018)

3.5.7 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang terbuat dari kaca yang digunakan dicuci terlebih dahulu, dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas koran dan mulut wadah ditutup dengan kapas. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoclave pada suhu $121\text{ }^\circ\text{C}$, tekanan 1 jam selama 15 menit. Jarum ose dan pinset disterilisasikan dengan mencelupkan ke dalam alkohol 70% dan melakukan pemijaran menggunakan api Bunsen (Armaleni dkk, 2019)

3.5.8 Pembuatan Media *Nutrient Agar Miring*

Sebanyak 23 gram NA dilarutkan dalam 1 L aquadest kemudian dipanaskan dan diaduk dengan menggunakan magnetik stirer sampai homogen. Setelah itu, larutan tersebut dimasukkan dalam tabung reaksi besar sebanyak 10 ml. Media disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121^o C, tekanan 1,5 atm dan selama 15 menit. Medium ini akan digunakan dalam pengujian antibakteri (Hudaya dkk, 2014)

3.5.9 Pembuatan Mueller Hinton Agar

Pembuatan media MHA (*Mueller Hinton Agar*). Pembuatan media MHA adalah dengan menimbang 38 gram MHA dilarutkan ke dalam 1 liter aquades, kemudian panaskan sampai mendidih. Larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 25 menit. Setelah steril, tunggu sampai suhu MHA turun menjadi 40°C, lalu tuangkan MHA ke cawan petri yang telah disterilkan (Zahro & Agustini, 2013)

3.5.10 Pembuatan Larutan Standar McFarland 0,5

Larutan asam sulfat 0,36 N sebanyak 99,5 mL dicampurkan dengan larutan BaCl₂.2H₂O 1,175 % sebanyak 0,5 mL dalam Erlenmeyer kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji (Ngojow dkk., 2013)

3.5.11 Pembuatan Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan Na CMC 0,5% dengan cara membuat larutan Na CMC 0,5% dengan mengambil sebanyak 0,5 gram Na CMC dilarutkan dalam 100 ml aquadest pada labu ukur, tutup dengan aluminium foil. Disterilisasikan dengan autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit (Manawan dkk, 2014)

3.5.12 Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif menggunakan antibiotik *Doksisiklin* disk, pengujian dilakukan dengan mengambil disk *doksisiklin* 0,5 µg/ml dan diletakan pada lubang sumuran (Mambo dkk, 2016).

3.5.13 Peremajaan Bakteri

Bakteri uji dibiakkan pada agar miring NA steril kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Hudaya dkk, 2014)

3.5.14 Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri uji *P. acnes* dibuat dengan cara mengambil satu ose koloni dari media NA miring padat ke tabung reaksi berisi 1 mL NaCl 0,9 %. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Lihatlah Kekeruhan pada suspensi koloni uji distandarisasi dengan standar 0,5 McFarland (sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Suspensi harus digunakan sebagai inokulum dalam waktu 15 menit (Nurhayati dkk, 2020)

3.5.15 Uji Daya Hambat Ekstrak Metanol Kulit Pisang Kepok

Pipet 0,05 ml bakteri *P.acnes* yang telah diencerkan masukan ke dalam media MHA yang sebelumnya sudah di sterilkan dalam Autoklaf dalam waktu 15 menit dengan suhu 121°C yang telah dinginkan dengan suhu kurang lebih 50-60°C. Kemudian kocok perlahan sampai bakteri tercampur sempurna dalam media masukan 15 mL media ke dalam 3 cawan petri sampai membeku. Setelah media padat, kemudian meletakkan pencabangan logam ke dalam 2 buah cawan petri yang sudah berisi media MHA dan bakteri yang sudah dipadatkan, lalu masukan ekstrak kulit Pisang Kepok dengan konsentrasi yang sudah ditentukan serta control positif dan control negatif masing masing pencabang logam sesuai dengan kode cawan petri sebanyak 20 µL. Diamkan selama 18-24 jam supaya terdifusi sempurna. Inkubasi selama 1x24 jam didalam inkubator dengan suhu 37°C (Pertiwi dkk, 2016). Setelah itu dilihat ada tidaknya zona hambat yang terbentuk, jika ada diukur diameter daerah hambatan di sekitar pencabangan menggunakan jangka sorong dengan cara mengukur secara di horizontal dan vertikal kemudian hasil yang didapatkan dikurangi diameter sumuran 7 mm. (Ngajow dkk, 2013)

Tabel 3. Interpretasi Zona Hambat Bakteri (Surjowardojo dkk, 2017)

Diameter	Kekuatan hambat
<5 mm	Lemah
6-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
>21 mm	Sangat Kuat

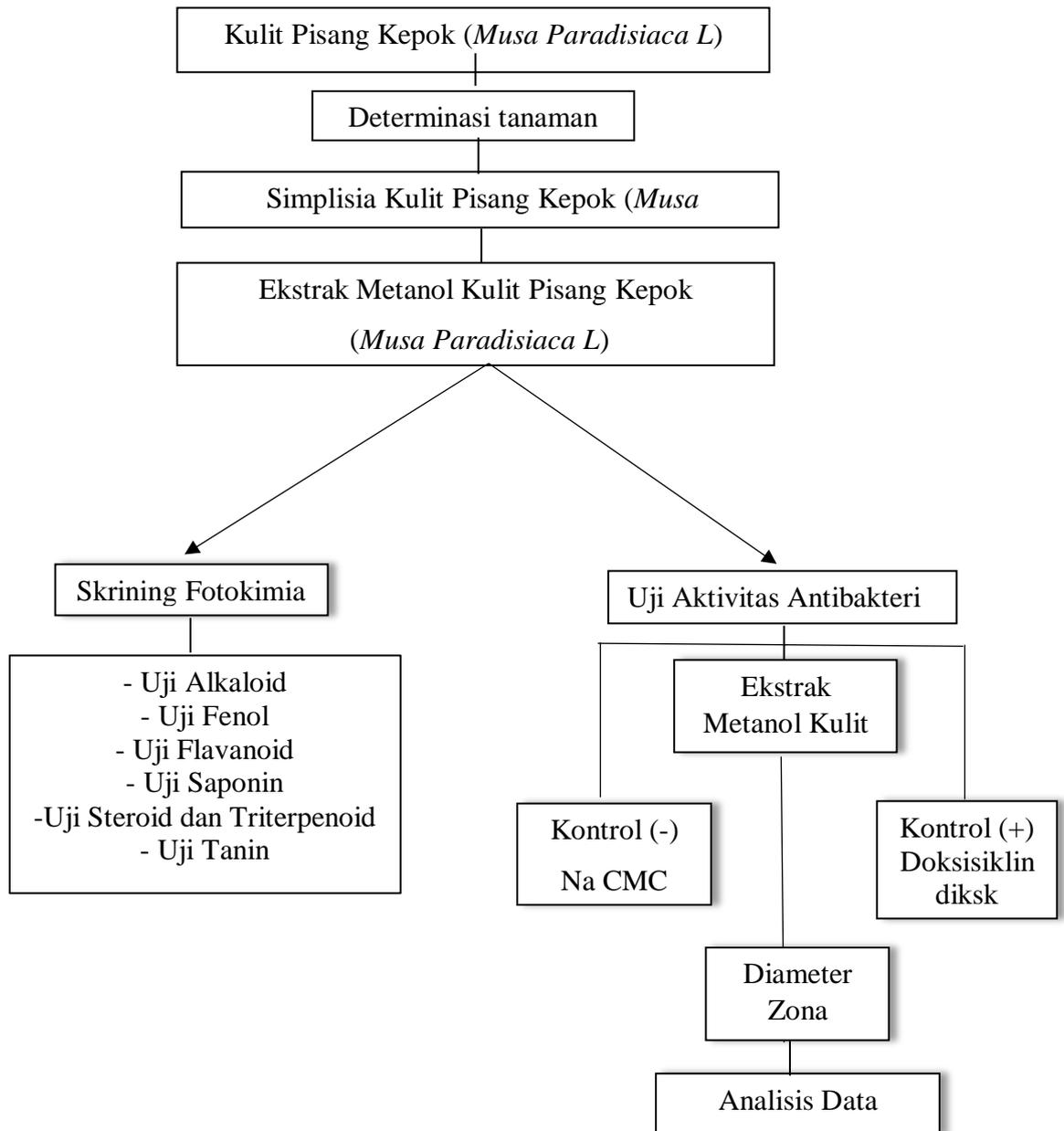
Tabel 4. CLSI doksisisiklin terhadap *P. acnes* (Suheri dkk, 2015)

Diameter	Kekuatan hambat
≥ 19 mm	sensitif
15-18 mm	intermediet
≤ 14	resisten

3.5.16 Analisis Data SPSS

Data yang diperoleh akan dianalisis dan diolah menggunakan program SPSS. Sebelum dilakukan analisis, dilakukan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu. Tujuan dilakukannya uji normalitas yaitu untuk melihat data yang dilakukan memiliki distribusi normal atau tidak. Normalitas dipenuhi jika hasil uji signifikan dengan taraf ($\alpha = 0,05$). Jika nilai signifikan lebih besar dari α , maka data tersebut terdistribusi normal. Sebaliknya jika nilai data lebih kecil dari α , maka data tersebut tidak terdistribusi normal. Selanjutnya akan dilakukan uji homogenitas yang bertujuan untuk mengetahui sama atau tidak varian dari beberapa populasi. Apabila nilai signifikan pada uji homogenitas lebih kecil dari α , maka varian dua atau lebih kelompok populasi data tidak sama. Dan sebaliknya, jika nilai signifikan lebih besar dari α . Maka varian dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah sama. Selanjutnya melakukan analisis data homogenitas didapatkan data tidak homogen maka pengujian yang akan dilakukan yaitu uji non-parametrik *K-independent* sampel yaitu *Kruskal-wallis*.

3.5 Kerangka Konsep



Gambar 3. Kerangka Penelitian (Dokumentasi Pribadi, 2021)