BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Bangun Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *true experimental* dengan menggunakan *post-test only control group design.* Metode penelitian yang digunakan adalah metode dilusi tabung untuk menilai KHM dan KBM.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama satu bulan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang pada bulan Oktober 2023.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *P. acnes* yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah bakteri *P. acnes* yang diambil menggunakan teknik *Simple Random Sampling.*

4.3.3 Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 9 kelompok konsentrasi ekstrak bunga telang (90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% dan 10%) dan menggunakan 2

kelompok kontrol dari masing-masing ekstrak (positif 100% dan negatif 0%), sehingga ada 11 kelompok pada masing-masing ekstrak. Berdasarkan rumus Federer, n merupakan banyaknya jumlah pengulangan pada setiap perlakuan, sedangkan t merupakan jumlah perlakuan (Simatupang & Sutysna, 2020), maka:

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

$(11-1)(n-1) \geq 15$

$10(n-1) \geq 15$

$10n - 10 \geq 15$

$10n \geq 15 + 10$

$10n \geq 25$

$n \geq 25 : 10$

$n \geq 2,5 = 3$

Dari hasil perhitungan tersebut diperlukan tiga kali pengulangan sampel. Sehingga, diperlukan 33 kelompok perlakuan pada penelitian.

4.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Metode sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *simple random sampling*, dengan mengambil sediaan bakteri menggunakan ose dari plate peremajaan bakteri sebanyak satu kali secara acak.

4.3.5 Karakteristik Sampel Penelitian

4.3.5.1 Kriteria Inklusi

Biakan bakteri *P.acnes* yang telah diinkubasi selama 24 jam sesuai dengan standar McFarland 0,5.

4.3.5.2 Kriteria Eksklusi

Biakan bakteri *P.acnes* yang mengandung kontaminan.

4.3.6 Variabel Penelitian

4.3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi (100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0%) ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L)*.

4.3.6.2 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah suhu inkubasi bakteri 37°C dengan waktu inkubasi selama 18-24 jam, dan medium biakan.

4.3.6.3 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah KHM dan KBM bakteri *P. acnes* yang digunakan untuk menghitung jumlah koloni bakteri.

4.3.7 Definisi Operasional Penelitian

Tabel 4.1 Definisi Operasional Penelitian

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea L*)	Ekstrak bunga telang yang dilarutkan dengan etanol 70%	Ekstrak bunga telang diukur dengan mikro pipet sesuai konsentrasi.	Konsentrasi: 1. 100% 2. 90% 3. 80% 4. 70% 5. 60% 6. 50% 7. 40% 8. 30% 9. 20% 10. 10% 11. 0%	Ordinal
2	Kadar Hambat Minimal (KHM)	Konsentrasi minimal ekstrak bunga telang (Clitoria *Ternatea L)* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. acnes*	Metode dilusi tabung dengan melihat kekeruhan dengan cara visual	- (-) = Jernih, bila garis hitam pada bagian belakang tabung terlihat jelas - (+) = Keruh, bila garis hitam pada bagian belakang tabung terlihat samar karena pertumbuhan bakteri - (++) = Sangat keruh, bila garis hitam pada bagian belakang tabung tidak bisa terlihat karena ekstrak sangat pekat	Ordinal

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
3	Kadar Bunuh Minimal (KBM)	Konsentrasi minimal ekstrak bunga telang *(Clitoria Ternatea L)* yang ditandai dengan penurunan 99,9% pertumbuhan bakteri	Penilaian menghitung dengan *colony counter*	Kadar bunuh minimal dinilai dengan tidak adanya pertumbuhan *P. acnes* atau kurang dari 0,1% dari original inoculum	Ratio

4.4 Alat, Bahan dan Prosedur Penelitian

4.4.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah tabung reaksi, autoklaf, ose steril, erlenmeyer, gelas ukur, cawan petri, gelas beaker, blender, rotary evaporator, bejana, timbangan, pipet volume, maserasi, corong kaca, aluminium foil, kapas lidi steril.

4.4.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: aquades, MH broth, MHA, etanol 70%, biakan bakteri *P. acnes*, bunga telang.

4.4.3 Prosedur Penelitian

4.4.3.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan cara mencuci alat menggunakan sabun hingga bersih lalu dikeringkan. Kemudian alat-alat yang digunakan disterilisasi menggunakan autoklaf, dibungkus menggunakan aluminium foil, dan

dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121ºC dengan tekanan 15 atm selama 15 menit

4.4.3.2 Pembuatan Ekstrak Bunga Telang

Simplisia bunga telang kering dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Maserasi dilakukan 3x24 jam dengan dilakukan pengadukan setiap 8 jam. Saring hasil maserasi, ekstrak cair yang didapatkan diupakan menggunakan *rotary evaporator* dan dipekatkan dengan menggunakan *waterbath* hingga menjadi ekstrak kental (Riyanto & Suhartati, 2019; Khumairoh, 2020).

4.4.3.3 Pembuatan Medium Muller Hinton Agar (MHA)

Dengan melarutkan 6,8 gram media MHA dalam 200 mL air suling dan dipanaskan hingga mendidih, media Muller Hinton Agar dapat dibuat. Setelah itu, larutan ditambahkan ke dalam tabung. Erlemeyer dan diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C untuk sanitasi. Dalam cawan petri yang telah disterilkan, media MHA ditambahkan dan dibiarkan memadat (Yusliana, 2019).

4.4.3.4 Pembuatan Suspensi Bakteri

Gunakan loop untuk mentransfer biakan *P. acnes* murni ke Mueller Hinton Broth. Kocok larutan dengan menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam sambil diinkubasi pada suhu 37°C hingga menjadi keruh. Kemudian, pindahkan 1 ml suspensi bakteri yang telah diinkubasi bersama dengan 5 ml aquadest steril untuk pengenceran dengan mengocoknya dengan mikropipet ke dalam tabung reaksi. Gabungkan kedua larutan dalam tabung reaksi, kemudian bandingkan secara visual kadar kekeruhannya dengan menggunakan standar Mc

Farland. Menggunakan swab kapas steril, olesi media Mueller Hinton Agar secara merata. Bakteri dikultur selama 24 jam pada suhu 37°C.

4.4.3.5 Penentuan Konsentrasi Kadar Hambat Minimal dan Kadar Bunuh Minimal Bunga Telang Terhadap *Propionibacterium acnes*

Pada penelitian ini menggunakan metode dilusi tabung guna menghambat pertumbuhan bakteri *P. acnes* dari konsentrasi paling kecil dari bunga telang. Tahapan Pengujian:

a. Menyediakan 11 tabung steril yang diberikan label tabung 1 (kontrol positif), tabung 2 (90%), tabung 3 (80%), tabung 4 (70%), tabung 5 (60%), tabung 6 (50%), tabung 7 (40%), tabung 8 (30%), tabung 9 (20%), tabung 10 (10%) dan tabung 11 (kontrol negatif)
b. Masukkan 3 ml kontrol positif ke dalam tabung 1
c. Masukkan 3 ml bakteri *P. acnes* ke dalam tabung 11
d. Masukkan 1 ml MH broth ke dalam tabung 2 sampai 10
e. Pembuatan larutan uji konsentrasi 100% (Tabung 1)

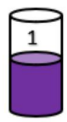
   %1 x V1 = %2 x V2

   100% x 1 ml = 100% x V2

   100ml = 100 x V2

   V2 = 1 ml

   Ambil 1 ml larutan dengan pipet



100% → 1 ml

f. Pembuatan larutan uji konsentrasi 90% (Tabung 2)

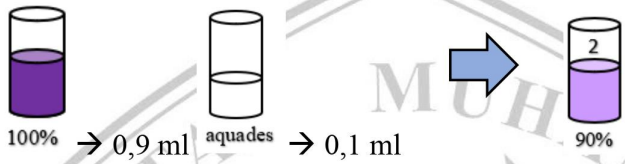
%1 x V1 = %2 x V2

90% x 1 ml = 100% x V2

90 ml = 100 x V2

V2 = 0,9 ml

Ambil 0,9 ml larutan dengan pipet dan tambahkan aquades sebanyak 0,1 ml



g. Pembuatan larutan uji konsentrasi 80% (Tabung 3)

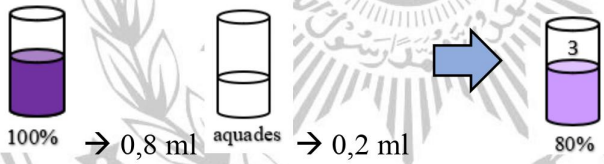
%1 x V1 = %2 x V2

80% x 1 ml = 100% x V2

80 ml = 100 x V2

V2 = 0,8 ml

Ambil 0,8 ml larutan dengan pipet dan tambahkan aquades sebanyak 0,2 ml



h. Pembuatan larutan uji konsentrasi 70% (Tabung 4)

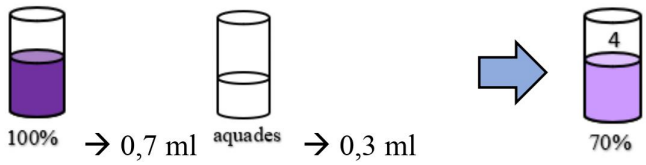
%1 x V1 = %2 x V2

70% x 1 ml = 100% x V2

70 ml = 100 x V2

V2 = 0,7 ml

Ambil 0,7 ml larutan dengan pipet dan tambahkan aquades sebanyak 0,3 ml



i. Pembuatan larutan uji konsentrasi 60% (Tabung 5)

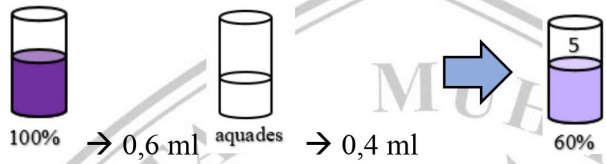
%1 x V1 = %2 x V2

60% x 1 ml = 100% x V2

60 ml = 100 x V2

V2 = 0,6 ml

Ambil 0,6 ml larutan dengan pipet dan tambahkan aquades sebanyak 0,4 ml



j. Pembuatan larutan uji konsentrasi 50% (Tabung 6)

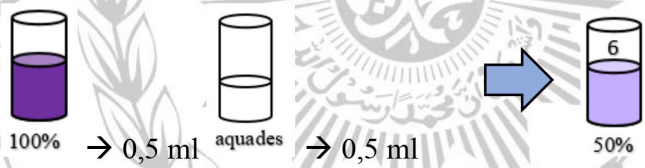
%1 x V1 = %2 x V2

50% x 1 ml = 100% x V2

50 ml = 100 x V2

V2 = 0,5 ml

Ambil 0,5 ml larutan dengan pipet dan tambahkan quades sebanyak 0,5 ml



k. Pembuatan larutan uji konsentrasi 40% (Tabung 7)

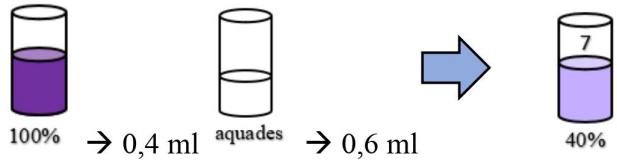
%1 x V1 = %2 x V2

40% x 1 ml = 100% x V2

40 ml = 100 x V2

V2 = 0,4 ml

Ambil 0,4 ml larutan dengan pipet dan tambahkan aquades sebanyak 0,6 ml



l. Pembuatan larutan uji konsentrasi 30% (Tabung 8)

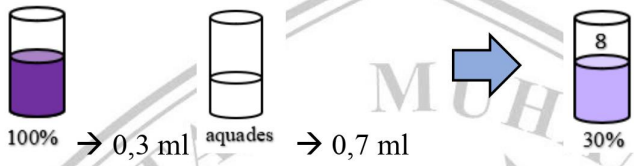
%1 x V1 = %2 x V2

30% x 1 ml = 100% x V2

30 ml = 100 x V2

V2 = 0,3 ml

Ambil 0,3 ml larutan dengan pipet dan tambahkan aquades sebanyak 0,7 ml



m. Pembuatan larutan uji konsentrasi 20% (Tabung 9)

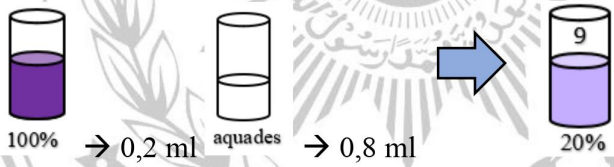
%1 x V1 = %2 x V2

20% x 1 ml = 100% x V2

20 ml = 100 x V2

V2 = 0,2 ml

Ambil 0,2 ml larutan dengan pipet dan tambahkan aquades sebanyak 0,8 ml



n. Pembuatan larutan uji konsentrasi 10% (Tabung 10)

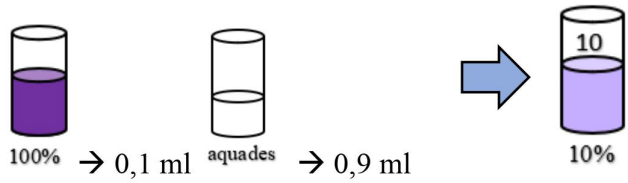
%1 x V1 = %2 x V2

10% x 1 ml = 100% x V2

10 ml = 100 x V2

V2 = 0,1 ml

Ambil 0,1 ml larutan dengan pipet dan tambahkan aquades sebanyak 0,9 ml



o. Kemudian tambahkan perbenihan cair kuman sebanyak 1 ml pada masing masing tabung

p. Semua tabung diinkubasi dalam suhu 37ºC selama 18-24 jam

q. Catat kekeruhan tabung dan bandingkan dengan kontrol untuk menilai KHM

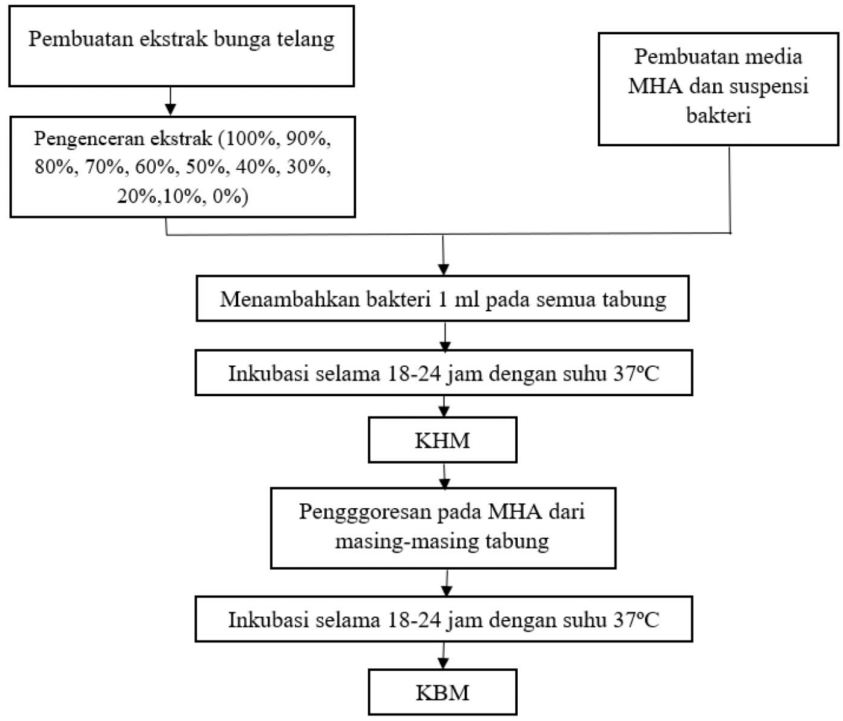
r. Ambil kapas lidi steril, celupkan pada masing-masing tabung untuk di strikingkan ke MHA

s. Inkubasi masing-masing MHA yang telah di stringkan pada inkubator dengan suhu 37ºC selama 18-24 jam

t. Hitunglah jumlah pertumbuhan koloni menggunakan colony counter pada tiap agar untuk menilai KBM

4.5 Alur Penelitian

4.5.1 Penentuan Konsentrasi Kadar Hambat Minimal dan Kadar Bunuh Minimal Bunga Telang Terhadap *Propionibacterium acnes*



4.6 Analisis Data

Data yang dianalisis adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *P. acnes* dengan ekstrak bunga telang. Pertama melakukan uji normalitas data menggunakan uji *Saphiro Wilk* ($n < 50$) atau uji *Kormogorov* ($n > 50$) dengan tujuan apakah data terdistribusi normal atau tidak. Jika hasilnya $p > 0,05$ maka dinyatakan normal; jika $p < 0,05$, maka dinyatakan tidak normal. Data yang sebelumnya tidak normal ditransformasikan, dan apabila data setelah transformasi masih tetap maka dilakukan pengujian dengan menggunakan *Kruskal-Wallis*.

Selanjutnya, uji homogenitas dapat dilanjutkan apabila sebaran datanya normal guna mengetahui varian data penelitian homogen (sig > 0,05) atau tidak. Uji dilakukan apabila data homogen dan normal *one way ANOVA + Post Hoc Bonferroni*. Sedangkan apabila data terdistribusi normal tetapi varian data tidak homogen maka dilakukan uji *one way ANOVA + Post Hoc MannWhitney*.