

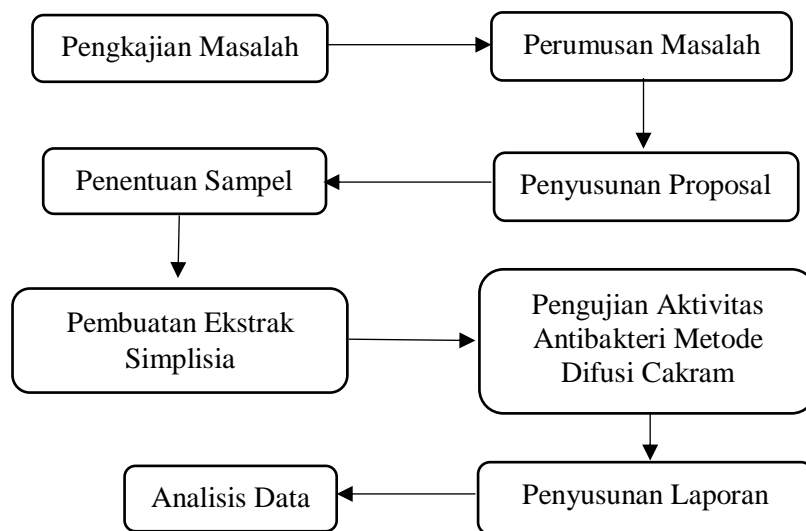
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan penelitian kuantitatif dengan metode eksperimen. Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *pre-experiment design* dengan bentuk “*One-Shot Case Study*”, yaitu desain penelitian yang hanya melibatkan satu kelas eksperimen yang dilaksanakan tanpa kelas kontrol dan tanpa tes awal (Ismail, 2018).

B. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – Mei 2023.

2. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan Universitas Warmadewa.

D. Populasi dan Sampel

1. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi.

2. Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah daun mimba dan daun legundi yang diperoleh dari Br. Abianseka, Mas, Ubud.

3. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi. Masing-masing sebanyak 1 kg daun mimba dan daun legundi dipilih menurut kriteria yang telah ditentukan peneliti, yakni daun yang berwarna hijau dan segar, daun yang digunakan yaitu dari tangkai ketiga sampai ketujuh dari pucuk, serta tidak berlubang. Daun mimba dan daun legundi yang telah melewati tahap sortasi kemudian dikeringkan, dihaluskan dengan blender sehingga masing-masing diperoleh 160 g serbuk daun mimba dan daun legundi. Masing-masing serbuk ditimbang sebanyak 150 g lalu di kombinasi sehingga didapatkan 300 g kombinasi serbuk daun mimba dan daun legundi dengan perbandingan 1:1. Ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi didapatkan dengan merendam 300 g serbuk

kombinasi daun mimba dan daun legundi dalam 1500 ml pelarut etanol 96% selama 3 hari, filtrat yang didapat kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 60°C sehingga diperoleh konsentrasi sampel 100% yang digunakan sebagai stok sampel.

4. Jumlah dan besar sampel

Pada penelitian ini sampel ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi yang diuji adalah sampel dengan konsentrasi 20, 40, 60, dan 80% yang dibuat dengan mengencerkan stok sampel konsentrasi 100% dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Sehingga jumlah total perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah empat perlakuan. Pada masing-masing perlakuan tersebut dilakukan pengulangan. Pengulangan masing-masing variasi konsentrasi dapat ditentukan dengan rumus *Federer* berikut (Prihanti, 2016) :

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

Keterangan :

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

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

$$3 (r - 1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan diatas, pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah minimal sebanyak enam kali. Pada penelitian ini menggunakan

empat pelakuan dengan enam kali pengulangan, sehingga besar sampel yang dibutuhkan adalah 24 sampel.

5. Alat, bahan, dan prosedur kerja

Adapun alat, bahan, dan prosedur penelitian yang akan dilakukan pada uji aktifitas antibakteri ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut :

a. Alat

Alat yang digunakan 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 (IWAKI) (1 buah), api bunsen (1 buah), tabung eppendorf (3 buah), rak tabung reaksi (1 buah), spatula (2 buah), batang pengaduk (2 buah), cawan petri (7 buah), jangka sorong (1 buah), *Mc Farland* Densitometer (Biosan) (1 buah), neraca analitik (RADWAG) (1 buah), refrigerator (1 buah), Inkubator (MEMMERT UN 55) (1 buah), *Autoclave* (HIRAYAMA) (1 buah), Hotplate (*Thermo Scientific*) (1 buah), magnetic stirrer (1 buah), Oven (MEMMERT UN 55) (1 buah), Biosafety Cabinet (*Airstream*), evaporator (BUCHI R-300).

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi, etanol 96%, bakteri *Staphylococcus aureus*, media *Mueller Hinton Agar* (Oxoid), standar 0,5 *Mc Farland*, larutan NaCl fisiologis 0,9%, alkohol 70%, *blank cakram disk* (30 buah), kloramfenikol 30 μ g (6 buah),

cotton swab (1 buah), *Yellow tip* (6 buah), *Blue tip* (1 buah), kapas berlemak, aluminium foil, dan kertas saring.

a. Prosedur penelitian

1) Persiapan sampel dan ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi dengan metode maserasi (Rudiana, Indriatmoko dan Komariah, 2020) :

a) Memetik daun mimba dan daun legundi masing-masing sebanyak 1 kg yang sesuai dengan kriteria penelitian

b) Melakukan sortasi basah, yaitu pemilihan daun berdasarkan kriteria ditentukan dalam penelitian

c) Membersihkan daun mimba dan daun legundi untuk menghilangkan pengotor dengan cara dicuci pada air mengalir

d) Meniriskan daun mimba dan daun legundi untuk menghilangkan sisa air

e) Mengiris tipis-tipis daun mimba dan daun legundi agar proses pengeringan dapat dilakukan dengan cepat

f) Menimbang daun mimba dan daun legundi yang akan dikeringkan

g) Mengeringkan daun mimba dan daun legundi pada suhu oven 50°C selama 10 jam

h) Melakukan proses sortasi pada bahan yang sudah kering

i) Menyerbukkan masing-masing simplisia, yaitu dengan menggunakan blender

j) Mengayak serbuk daun mimba dan legundi untuk memperoleh simplisia yang lebih halus

k) Menimbang masing-masing 150 g serbuk simplisia daun mimba dan daun legundi sama besar (1:1) menggunakan neraca analitik lalu mengkombinasi dan memasukkannya kedalam erlenmeyer

- l) Menuang 1500 ml larutan etanol 96% kedalam serbuk kombinasi daun mimba dan daun legundi hingga semua serbuk terendam
 - m) Menutup rapat dan melakukan perendaman selama 3 hari, dengan mengaduk menggunakan magnetic stirrer selama 8 jam setiap harinya
 - n) Memisahkan ekstrak dengan residu dengan cara menyaring sampel dengan kertas saring
 - o) Memasukkan filtrat kedalam wadah (botol kaca). Residu hasil saringan direndam kembali dengan menambahkan etanol 96% hingga terendam. Tutup dan rendam selama 3 hari, dengan mengaduk menggunakan magnetic stirrer selama 8 jam setiap harinya
 - p) Menyaring kembali hasil remaserasi dan filtratnya ditampung dalam botol kaca
 - q) Menggabungkan filtrat dan dilakukan proses pemekatan dengan memasukkan filtrat kedalam alat evaporator dengan suhu 60°C.
- 2) Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan legundi (Suyasa dkk, 2022) :
- a) Membuat konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan legundi 20, 40, 60, dan 80%. Membuat masing-masing variasi konsentrasi dengan cara menimbang dan mengencerkan ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi konsentrasi 100% dengan pelarut etanol 96%
 - b) Menentukan variasi konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi dengan rumus sebagai berikut :
- $$\% = \frac{b}{v} \times 100$$
- Keterangan :
- % : variasi konsentrasi (%) ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi

b : massa ekstrak kombinasi daun mimba dan legundi (100%)

v : volume pelarut.

c) Membuat variasi konsentrasi uji adalah sebagai berikut :

Tabel 2
Variasi Konsentrasi Ekstrak Kombinasi
Daun Mimba dan Daun Legundi

Konsentrasi (%)	Komposisi Bahan	
	Ekstrak Kombinasi Daun Mimba dan Daun Legundi (gram)	Etanol 96% (ml)
20	0,2	1
40	0,4	1
60	0,6	1
80	0,8	1

d) Menghomogenkan campuran masing-masing konsentrasi.

3) Prosedur pembuatan media uji sensitivitas (*Mueller Hinton Agar*) (Nofita dkk, 2020) :

a) Menimbang bubuk media MHA sebanyak 5,7 g menggunakan neraca analitik

b) Memindahkan bubuk media yang telah ditimbang ke dalam Erlenmeyer dan melarutkannya dengan 150 ml aquades

c) Memanaskan larutan media dengan hotplate sampai mendidih

d) Mensterilkan larutan media dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 25 menit

e) Mendiamkan media hingga suhu media menjadi 40°C

f) Menuang larutan media kedalam cawan petri steril \pm 15 ml, lalu didiamkan hingga memadat

- g) Meletakkan cawan petri dengan posisi terbalik, dan apabila tidak langsung digunakan dapat membungkusnya dengan kertas buram dan menyimpannya didalam refrigerator.
- 4) Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* (Nurhayati, Yahdiyani dan Hidayatulloh, 2020) :
- a) Mengambil koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakan murni menggunakan ose dan disuspensikan kedalam tabung berbeda yang masing-masing berisi 5 ml larutan NaCl fisiologis 0,9% steril sampai memperoleh konsentrasi 0,5 Mc Farland untuk setiap bakteri.
- b) Membaca kekeruhan suspensi bakteri dengan menggunakan Mc Farland densitometer. 0,5 Mc Farland setara dengan $1,5 \times 10^8$ (Colony Forming Unit) CFU/ml.
- 5) Tahap pemeriksaan uji daya hambat antibakteri (Suyasa dkk, 2022) :
- a) Menyiapkan variasi konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi 20, 40, 60, dan 80%, serta kloramfenikol sebagai kontrol kerja dan pelarut etanol 96% sebagai kontrol negatif
- b) Merendam cakram *disk* kosong kedalam 50 μ l masing-masing ekstrak kombinasi daun mimba dan legundi dan untuk kontrol negatif menggunakan cakram *disk* kosong yang direndam ke dalam 50 μ l etanol 96%
- c) Mencilupkan swab kapas steril ke dalam suspensi bakteri 0,5 Mc Farland *Staphylococcus aureus*
- d) Mengusapkan swab kapas secara merata pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) lalu mendiamkannya selama 15 menit

- e) Meletakkan cakram *disk* yang sudah jenuh secara aseptis pada permukaan media MHA dengan jarak antar cakram minimal 15 mm
 - f) Meletakkan kontrol kerja cakram *disk* dengan menggunakan antibiotik kloramfenikol
 - g) Menginkubasi media pada suhu 37°C selama 24 jam
- 6) Pelaporan hasil

Mengamati dan mengukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang terbentuk. Zona bening yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong (Surjowardojo, Susilorini dan Sirait, 2015).

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data yang dikumpulkan adalah data primer dan data sekunder. Data primer dalam penelitian ini meliputi data diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai variasi konsentrasi ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi. Data sekunder yang dikumpulkan yaitu referensi-referensi yang berhubungan dengan penelitian ini seperti jurnal, buku, dan *e-book* yang terkait.

2. Teknik pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan teknik pengumpulan data secara observasi atau penelitian laboratorium menggunakan metode difusi cakram.

3. Instrumen pengumpulan data

Adapun instrumen pengumpulan data pada penelitian ini yaitu :

- a. Alat Pelindung Diri (APD), digunakan untuk melindungi diri dari resiko kerja
- b. Alat tulis, digunakan untuk mencatat data
- c. Kamera, digunakan sebagai alat dokumentasi
- d. Alat pengambilan sampel dan pengujian

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Data yang diperoleh dicatat, dikumpulkan, diolah, disajikan dalam tabulating yaitu data yang disajikan dalam bentuk tabel dan narasi.

2. Analisis data

- a. Uji statistik *Kolmogorov-Smirnov* digunakan untuk menentukan apakah data terdistribusi normal atau tidak normal
- b. Uji statistik *One Way ANOVA* digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan ekstrak kombinasi daun mimba dan daun legundi antara konsentrasi 20, 40, 60, dan 80% untuk data berdistribusi normal
- c. Uji statistik *LSD (Least Significant Deference)* digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* untuk data berdistribusi normal