

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian Eksperimental Murni (*True Experimental*), dimana variabel yang dapat memengaruhi jalannya eksperimen dapat dikendalikan, sehingga memungkinkan validitas internal (kualitas pelaksanaan desain penelitian) menjadi tinggi (Hardani dkk., 2020). Desain penelitian ini menggunakan *Post-test Only Control Group Design*, yang memungkinkan peneliti mengukur efek intervensi dengan membandingkan hasil pada kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Kedua kelompok dipilih secara acak, sehingga dianggap setara sebelum dilakukan intervensi (Masturoh dan Nauri, 2018). Desain penelitian tersebut dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 2
Desain Penelitian *Post-test Only Control Group*

Kelompok	Perlakuan	Post-test
R1	X	O1
R2	Kontrol	O2
R3	X	O3
R4	Kontrol	O4

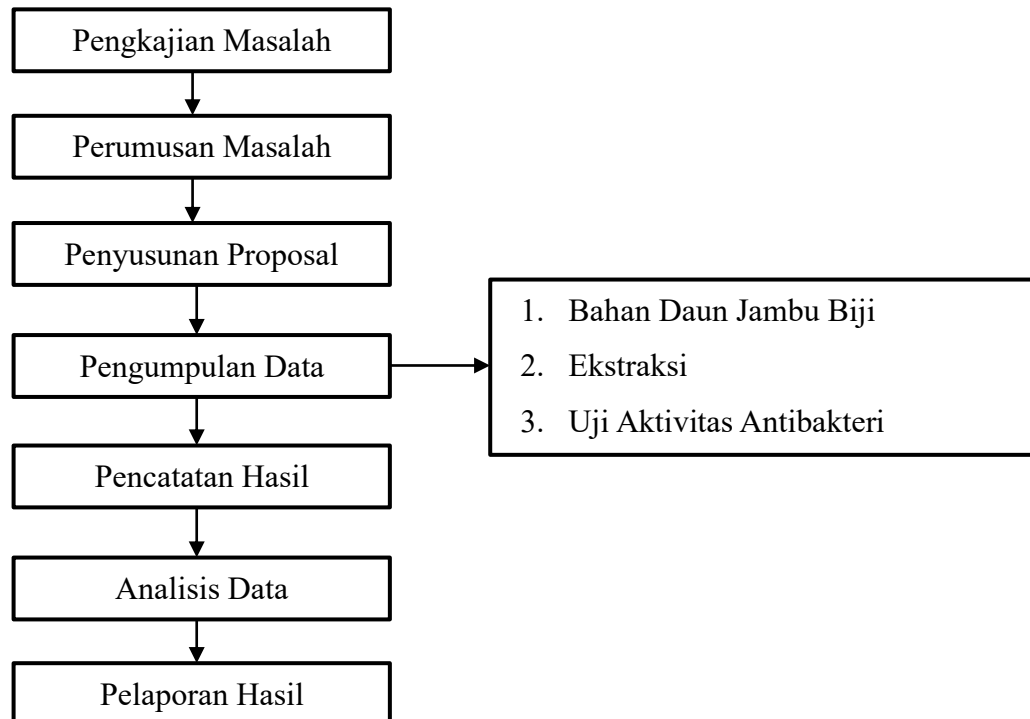
Keterangan:

R1 (*Random 1*) : Kelompok eksperimen pada metode difusi cakram yang terdiri atas berbagai volume ekstrak etanol daun jambu biji dengan konsentrasi 25%, yaitu 12, 5 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, dan 100 μ l.

- R2 (*Random 2*) : Kelompok kontrol pada metode difusi cakram, yaitu etanol 96% sebagai kontrol negatif dan antibiotik *Gentamicin* 10 µg/µl sebagai kontrol positif.
- R3 (*Random 3*) : Kelompok eksperimen pada metode difusi sumuran yang terdiri atas berbagai volume ekstrak etanol daun jambu biji dengan konsentrasi 25%, yaitu 12, 5 µl, 25 µl, 50 µl, 75 µl, dan 100 µl.
- R4 (*Random 4*) : Kelompok kontrol pada metode difusi sumuran, yaitu etanol 96% sebagai kontrol negatif dan antibiotik *Gentamicin* 10 µg/µl sebagai kontrol positif.
- X (*Exposure*) : Perlakuan (intervensi) yang diberikan kepada kelompok eksperimen.
- O1 (Observasi 1) : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada kelompok eksperimen dengan metode difusi cakram.
- O2 (Observasi 2) : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada kelompok kontrol dengan metode difusi cakram.
- O3 (Observasi 3) : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada kelompok eksperimen dengan metode difusi sumuran.
- O4 (Observasi 4) : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada kelompok kontrol dengan metode difusi sumuran.

B. Alur Penelitian

Berikut merupakan alur penelitian pada penelitian ini:



Gambar 5 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada beberapa tempat, yaitu pengambilan bahan daun jambu biji dilakukan di Desa Tyingtali, Kecamatan Abang, Kabupaten Karangasem. Pembuatan ekstrak etanol daun jambu biji dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar. Sementara itu, pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret hingga April 2025.

D. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai volume ekstrak etanol daun jambu biji dengan konsentrasi 25% menggunakan metode difusi cakram dan sumuran.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan memilih daun jambu biji melalui teknik *purposive sampling*, yaitu teknik penentuan bahan berdasarkan kriteria inklusi (daun jambu biji yang dipetik langsung, tidak berlubang, tumbuh pada pucuk hingga tangkai ketiga) dan eksklusi (daun yang dipetik dan disimpan lebih dari satu hari, berlubang, serta tumbuh pada tangkai keempat dan seterusnya) yang ditetapkan oleh peneliti kemudian diekstraksi. Proses ekstraksi menghasilkan ekstrak etanol daun jambu biji dengan konsentrasi 100%, yang kemudian diencerkan menggunakan etanol 96% untuk memperoleh konsentrasi 25% sebagai stok bahan. Pemilihan konsentrasi ini didasarkan pada penelitian Sari dkk. (2023) yang menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu biji pada konsentrasi tersebut memiliki daya hambat kuat terhadap *Staphylococcus aureus*. Pengujian ekstrak etanol daun jambu biji dilakukan dengan lima perlakuan berdasarkan variasi volume, yaitu 12,5 µl, 25 µl, 50 µl, 75 µl, dan 100 µl, yang mengacu pada penelitian Febrianti dkk. (2019) mengenai efektivitas volume bahan uji. Sedangkan, kelompok kontrol menggunakan etanol 96% sebagai kontrol negatif dan antibiotik *Gentamicin* 10 µg/µl sebagai kontrol positif.

Umumnya jumlah pengulangan yang diperlukan dalam percobaan di rumah kaca atau laboratorium adalah sebanyak tiga kali (Antika dkk., 2019). Jumlah pengulangan dapat diminimalkan selama hasil percobaan yang diperoleh dapat dipertanggungjawabkan kebenarannya. Dalam penelitian ini, setiap perlakuan dan kontrol diuji menggunakan metode difusi cakram dan sumuran dengan tiga kali pengulangan. Oleh karena itu, diperoleh 30 data dari perlakuan, 30 data dari kontrol positif, dan 30 data dari kontrol negatif.

1. Alat

Blender (Miyako), neraca analitik (RADWAG AS220.R2), pipet ukur (IWAKI), mikropipet (socorex), ball pipet (D&N), gelas ukur (IWAKI), gelas beaker (IWAKI), tabung reaksi (IWAKI), rak tabung reaksi, ose bulat, ose lurus, pinset, hotplate (IKA[®] C-MAG HS 10), *magnetic stirrer*, bunsen spiritus, cawan petri (OneMed), *biosafety cabinet* (BSC-1800 II B2-X), McFarland densitometer (biosan DEN-1B), jangka sorong (TOKI), inkubator (ESCO Isotherm), autoclave (TOMY SX-500), oven, labu erlenmeyer (IWAKI), *rotary evaporator* (IKA[®] RV 10 basic), cork borer, botol kaca gelap, botol kaca bening, toples kaca, penggaris, corong kaca dan refrigerator (Haire HYC-290).

2. Bahan

Daun jambu biji, aquadest steril (Amidis), etanol 96% (Saba Kimia), biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, media *Mueller Hinton Agar* (Himedia GM173-500G), standar 0,5 McFarland (Remel), NaCl 0,9% (Otsu-NS[®]), yellow tip (OneMed), blue tip (OneMed), cakram disk kosong (MN Germany), antibiotik *Gentamicin* 10 µg/µl (Ottogenta), aluminium foil (Klin pak), kertas saring (UNI-

Sci), lidi kapas steril (OneMed), kapas lemak (OneMed), benang, tissue (Tessa Nature) dan alkohol 70% (OneMed).

3. Prosedur kerja

a. Tahap persiapan (pra-analitik)

1) Pembuatan simplisia daun jambu biji

Proses pembuatan simplisia daun jambu biji yang diadaptasi dari penelitian Seko dkk. (2021) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut:

- a) Daun jambu biji yang tidak berlubang, tumbuh pada pucuk hingga tangkai ketiga langsung dipetik sebanyak 2 kg, kemudian dicuci bersih dan ditiriskan.
- b) Daun jambu biji dipotong menjadi bagian yang lebih kecil, lalu dikeringkan dengan cara dijemur selama 1 minggu tanpa terkena sinar matahari langsung.
- c) Setelah kering, daun jambu biji dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk, kemudian diayak untuk memperoleh serbuk halus.

2) Pembuatan ekstrak etanol daun jambu biji

Proses pembuatan ekstrak etanol daun jambu biji yang diadaptasi dari penelitian Niken dkk. (2022) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut:

- a) Sebanyak 200 g daun jambu biji yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam toples kaca, kemudian direndam dengan larutan etanol 96% (± 1000 ml) hingga seluruh simplisia terendam. Larutan tersebut diaduk hingga merata, ditutup rapat, dan dibiarkan selama 72 jam dengan pengadukan berkala setiap 24 jam sekali menggunakan batang pengaduk steril.
- b) Setelah 72 jam, larutan disaring menggunakan kertas saring. Ampas hasil maserasi kemudian direndam kembali dalam etanol 96% (± 500 ml) hingga terendam sepenuhnya, diaduk hingga merata, ditutup rapat, dan dibiarkan

selama 72 jam dengan pengadukan berkala setiap 24 jam sekali menggunakan batang pengaduk steril.

- c) Setelah 72 jam, larutan hasil remaserasi disaring dan filtrat yang diperoleh ditampung dalam wadah (botol kaca).
 - d) Filtrat yang telah diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-60°C hingga menghasilkan ekstrak kental daun jambu biji.
 - e) Ekstrak kental tersebut kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik untuk menentukan massa total ekstrak yang dihasilkan.
- 3) Pembuatan konsentrasi 25% ekstrak etanol daun jambu biji

Proses pembuatan konsentrasi 25% ekstrak etanol daun jambu biji yang diadaptasi dari penelitian Sari dkk. (2023) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut:

- a) Konsentrasi ekstrak etanol daun jambu biji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25%. Konsentrasi tersebut dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak etanol daun jambu biji pekat (konsentrasi 100%) menggunakan pelarut etanol 96%. Proses pembuatan dilakukan dalam botol kaca gelap dengan volume total 5 ml.
- b) Pengenceran dilakukan berdasarkan rumus berikut:

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

Keterangan:

M_1 : Molaritas sebelum pengenceran (%)

M_2 : Molaritas setelah pengenceran (%)

V_1 : Volume sebelum pengenceran (ml)

V_2 : Volume setelah pengenceran (ml)

- c) Konsentrasi 25% dibuat dengan mencampurkan 1,25 ml ekstrak etanol daun jambu biji pekat (konsentrasi 100%) dengan 3,75 ml etanol 96%. Larutan tersebut dihomogenkan, kemudian disimpan.

4) Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Proses pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang diadaptasi dari penelitian Nurhayati dkk. (2020) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut:

- a) Bubuk media *Mueller Hinton Agar* sebanyak 30,4 g ditimbang menggunakan neraca analitik.
- b) Setelah ditimbang, bubuk media dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer dan dilarutkan dalam 800 ml aquadest.
- c) Media dipanaskan diatas hot plate sambil diaduk hingga serbuk larut sempurna dan homogen. Selanjutnya, pH media diukur menggunakan pH stick dengan pH optimum $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C .
- d) Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit setelah suhu mencapai 121°C .
- e) Media yang telah disterilisasi dibiarkan hingga suhunya menurun menjadi $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$.
- f) Media dituangkan secara aseptis ke dalam cawan petri dengan volume ± 25 ml, kemudian dibiarkan hingga memadat.
- g) Setelah media memadat, cawan petri dibalik. Jika media tidak langsung digunakan, media dalam cawan petri atau sisa media dalam tabung Erlenmeyer dapat dibungkus dengan kertas buram dan disimpan di refrigerator.

5) Penjenuhan berbagai volume ekstrak dan kontrol ke dalam cakram kosong

Proses penjenuhan berbagai volume ekstrak etanol daun jambu biji dalam cakram kosong yang diadaptasi dari penelitian Febrianti dkk. (2019) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut:

- a) Siapkan cakram kosong berdiameter 6 mm. Pipet ekstrak etanol daun jambu biji konsentrasi 25% sebanyak 12, 5 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, dan 100 μ l, lalu masukkan masing-masing ke dalam tabung reaksi, kemudian rendam cakram selama ± 2 jam.
- b) Pada kontrol negatif, pipet etanol 96% sebanyak 12, 5 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, dan 100 μ l, lalu masukkan masing-masing ke dalam tabung reaksi, kemudian rendam cakram selama ± 2 jam.
- c) Pada kontrol positif, pipet antibiotik *Gentamicin* 10 μ g/ μ l sebanyak 25 μ l, lalu masukkan masing-masing ke dalam lima tabung reaksi, kemudian rendam cakram selama ± 2 jam.

6) Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Proses pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang diadaptasi dari penelitian Niken dkk. (2022) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut:

- a) Diambil 1 ose koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakan murni dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl 0,9% steril hingga mencapai konsentrasi 0,5 McFarland.
- b) Kekeruhan suspensi bakteri diukur menggunakan McFarland densitometer, dimana kepekatan 0,5 McFarland setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

b. Tahap pelaksanaan (analitik)

1) Uji aktivitas antibakteri metode difusi cakram

Uji aktivitas antibakteri metode difusi cakram yang diadaptasi dari penelitian Nurhayati dkk. (2020) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut:

- a) Disiapkan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kepekatan 0,5 McFarland.
- b) Swab kapas steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah swab menyerap suspensi, swab diangkat dan diperas dengan cara ditekan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar.
- c) Swab kapas yang telah dicelupkan digunakan untuk menggoreskan suspensi pada permukaan media MHA hingga seluruh permukaan media tertutup rapat secara merata.
- d) Media MHA dibiarkan selama 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap.
- e) Cakram yang telah dijenuhkan dengan berbagai volume ekstrak etanol daun jambu biji konsentrasi 25% diletakkan diatas permukaan media MHA. Cakram ditekan perlahan menggunakan pinset steril hingga melekat sempurna
- f) Kontrol negatif dan positif juga diletakkan diatas permukaan media MHA.
- g) Cakram diletakkan dengan jarak antar cakram ± 3 cm, sedangkan jarak dari tepi cawan petri sekitar ± 2 cm. Setelah diletakkan, cakram tidak boleh dipindahkan atau digeser.
- h) Media yang telah ditanami cakram diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

2) Uji aktivitas antibakteri metode difusi sumuran

Uji aktivitas antibakteri metode difusi sumuran yang diadaptasi dari penelitian Nurhayati dkk. (2020) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut:

- a) Disiapkan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kepekatan 0,5 McFarland.
- b) Swab kapas steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah swab menyerap suspensi, swab diangkat dan diperas dengan cara ditekan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar.
- c) Swab kapas yang telah dicelupkan digunakan untuk menggoreskan suspensi pada permukaan media MHA hingga seluruh permukaan media tertutup rapat secara merata.
- d) Media MHA dibiarkan selama 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap.
- e) Buat tiga lubang pada media MHA menggunakan *cork borer* dengan jarak antar lubang ± 3 cm, sedangkan jarak dari tepi cawan petri sekitar ± 2 cm.
- f) Pipet ekstrak etanol daun jambu biji konsentrasi 25% sebanyak 12, 5 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, dan 100 μ l, lalu masukkan masing-masing ke dalam lubang sumur pada media MHA.
- g) Pada kontrol negatif, pipet etanol 96% sebanyak 12, 5 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, dan 100 μ l, kemudian masukkan masing-masing ke dalam lubang sumur pada media MHA.
- h) Pada kontrol positif, pipet antibiotik *Gentamicin* 10 μ g/ μ l sebanyak 25 μ l, lalu masukkan dalam lubang sumur pada media MHA.

- i) Media yang telah diberi perlakuan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.
- c. Tahap akhir (post-analitik)
 - 1) Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong (satuan milimeter) setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
 - 2) Pengukuran diameter zona hambat dilakukan pada area bening disekitar cakram dan sumur, yaitu daerah tanpa pertumbuhan bakteri. Pengukuran dilakukan dari satu ujung zona hambat ke ujung lainnya melalui bagian tengah cakram dan sumur.
 - 3) Catat hasil pengamatan.

E. Jenis, Teknik, dan Instrumen Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data primer yang berupa zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai volume ekstrak etanol daun jambu biji konsentrasi 25% yang diuji menggunakan metode difusi cakram dan sumuran.

2. Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan melalui eksperimen laboratorium dengan cara mengukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang dihasilkan dari berbagai volume ekstrak etanol daun jambu biji konsentrasi 25% yang diuji menggunakan metode difusi cakram dan sumuran.

3. Instrumen pengumpulan data

Dalam penelitian ini, alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah jangka sorong, alat tulis, dan kamera.

F. Teknik Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh dari eksperimen pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jambu biji terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dinyatakan dalam satuan milimeter (mm). Data tersebut diolah menggunakan teknik tabulasi data, yaitu hasil disajikan dalam bentuk tabel naratif.

2. Analisis data

Penelitian ini menggunakan analisis data kuantitatif. Uji normalitas data dilakukan dengan *Shapiro-Wilk* untuk memastikan data berdistribusi normal atau tidak. Apabila data berdistribusi normal, dilakukan uji homogenitas dengan *Levene's Test* untuk memastikan bahwa varian antar kelompok bersifat homogen. Selanjutnya, uji statistik dilakukan dengan menggunakan *Two-Way ANOVA* untuk menguji perbedaan signifikan antara metode (difusi cakram dan sumuran) dan variasi volume ekstrak terhadap diameter zona hambat. Jika terdapat perbedaan signifikan, dilakukan uji lanjutan dengan *Post-Hoc LSD (Least Significant Deference)* untuk menentukan kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan. Namun, apabila data berdistribusi tidak normal, analisis dilakukan dengan uji statistik non-parametrik *Kruskal-Wallis Test* untuk menguji perbedaan signifikan antara metode (difusi cakram dan sumuran) dan variasi volume ekstrak terhadap diameter zona hambat.

G. Etika Penelitian

Pada penelitian ini, prinsip etika yang diterapkan meliputi *beneficence*, yaitu prinsip kebaikan yang bertujuan memberikan manfaat sekaligus meminimalkan potensi kerugian bagi pihak lain. Selain itu, diterapkan pula prinsip *non-maleficence*, yaitu prinsip untuk tidak merugikan, yang memastikan subjek penelitian tidak diperlakukan sebagai alat semata serta mendapatkan perlindungan dari tindakan penyalahgunaan (Masturoh dan Nauri, 2018).