

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental murni (true experimental) yang memungkinkan pengendalian variabel pengganggu, sehingga meningkatkan validitas internal atau kualitas desain penelitian (Hardani dkk., 2020). Desain penelitian yang diterapkan adalah pretest-posttest with control group. Dalam desain ini, peneliti melakukan pengukuran awal pada kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, kemudian memberikan intervensi atau perlakuan hanya pada kelompok eksperimen. Setelah periode waktu tertentu, pengukuran kembali dilakukan pada kedua kelompok untuk melihat pengaruh perlakuan (Imas Masturoh, 2018). Kedua kelompok dipilih secara random, sehingga diasumsikan memiliki karakteristik yang serupa sebelum pemberian perlakuan. Desain penelitian tersebut dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3
Desain Penelitian *Pretest-posttest With Control Group*

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

Keterangan:

R1 (*Random 1*) : Kelompok eksperimen terdiri atas berbagai variasi konsentrasi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*), yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39%.

R2 (*Random 2*) : Kelompok kontrol, yaitu suspensi bakteri sesuai standar 0,5 McFarland yang ditambahkan antibiotik *gentamicin* 80mg/2ml sebagai kontrol positif, suspensi bakteri sesuai standar 0,5 McFarland sebagai kontrol negatif, dan larutan media *Mueller Hinton Broth* (MHB) sebagai kontrol media.

X (*Exposure*) : Perlakuan (intervensi).

O1 (Observasi 1) : Nilai absorbansi R1 sebelum inkubasi.

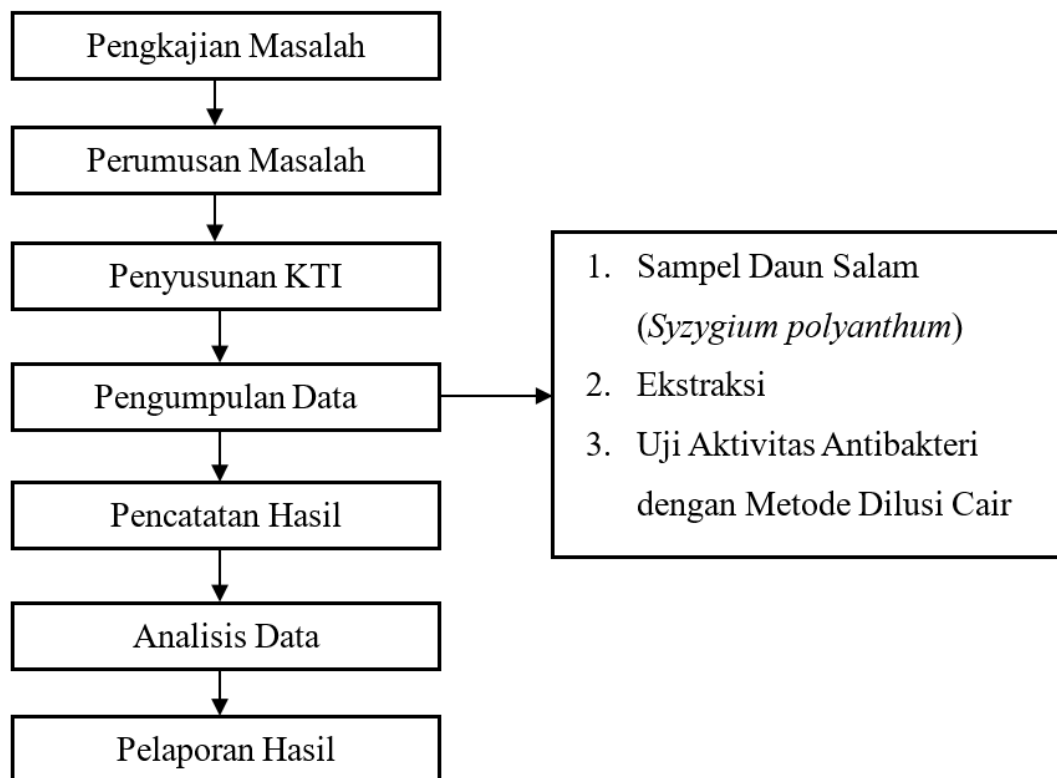
O2 (Observasi 2) : Nilai absorbansi R2 sebelum inkubasi.

O3 (Observasi 3) : Nilai absorbansi R1 setelah inkubasi.

O4 (Observasi 4) : Nilai absorbansi R2 setelah inkubasi.

B. Alur Penelitian

Berikut merupakan bagan alur penelitian pada penelitian ini:



Gambar 5 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu pengambilan sampel daun salam dilakukan di Desa Pering Sari, Kecamatan Selat, Kabupaten Karangasem. Pembuatan ekstrak daun salam dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Denpasar. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Denpasar.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari Bulan Oktober 2024 hingga Bulan April 2025.

D. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai tingkat konsentrasi ekstrak etanol daun salam, yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39%.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan memilih daun salam menggunakan teknik purposive sampling, yaitu pemilihan sampel berdasarkan kriteria inklusi (daun salam yang baru dipetik, berada pada posisi tangkai ketiga hingga keenam dari pucuk, dan tidak berlubang) dan eksklusi (daun salam yang dipetik lebih dari satu hari sebelumnya atau berlubang) yang telah ditentukan peneliti. Daun salam yang terpilih kemudian diekstraksi, menghasilkan ekstrak etanol daun salam berkonsentrasi 100% sebagai sampel utama. Uji antibakteri ekstrak etanol daun salam dilakukan dengan delapan variasi konsentrasi sebagai perlakuan, yaitu 50%,

25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39% (Kowalska-Krochmal, 2021). Rentang konsentrasi ini dipilih berdasarkan standar penentuan konsentrasi dari CLSI M100 untuk mengidentifikasi Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang paling efektif dalam menekan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Kelompok kontrol dalam penelitian ini meliputi suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* 0,5 McFarland sebagai kontrol negatif, suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* 0,5 McFarland yang ditambahkan antibiotik gentamicin 20 mg/2 ml sebagai kontrol positif, dan media MHB sebagai kontrol media.

Jumlah minimal pengulangan yang diperlukan dalam percobaan laboratorium adalah tiga kali (Rori dkk., 2018). Semakin sering pengulangan dilakukan, semakin tinggi tingkat akurasi hasil yang diperoleh. Dalam penelitian ini, setiap konsentrasi diuji dengan metode dilusi cair dan diukur dalam alat Spektrofotometer UV-Vis dengan tiga kali pengulangan. Oleh karena itu, diperoleh 48 data dari perlakuan dan 12 data dari kontrol, sehingga total data yang dihasilkan adalah sebanyak 60 data.

1. Alat

Blender (Philips), neraca analitik (RADWAG AS220.R2), pipet ukur (IWAKI), mikropipet (*socorex*), *ball* pipet, gelas ukur (IWAKI), *rotary evaporator* (IKA®RV 10 *basic*), gelas beaker (IWAKI), tabung reaksi, rak tabung reaksi, *ose* bulat *disposable*, pinset, *hotplate*, *magnetic stirrer*, bunsen spritus, *biosafety cabinet* (BSC-1800 II B2-X), McFarland densitometer (biosan DEN-1B), inkubator (ESCO Isotherm), autoklaf (TOMY SX-500), botol hitam tutup ulir, labu Erlenmeyer (IWAKI), *refrigerator* (YC-395L), Spektrofotometer UV-Vis (*analytikjena* SPECORD 210 PLUS – 223F2098C), dan *cool box*.

2. Bahan

Ekstrak daun salam, akuades steril, etanol 96%, biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, media *Mueller Hinton Broth* (MHB), *gentamicin* 80 mg/2 ml, standar 0,5 McFarland, NaCl 0,9%, *yellow tip*, *blue tip*, *aluminium foil*, kertas saring, strip pH, kapas lemak, *tissue*, benang, dan alkohol 70%.

3. Prosedur kerja

a. Persiapan sampel (pra-analitik)

1) Pembuatan simplisia daun salam

Pembuatan simplisia dan ekstrak daun salam dengan metode maserasi sesuai prosedur kerja yang dilakukan oleh Rudiana dkk. (2020) dan (Wasiaturrahmah dan Jannah, 2018) yang dimodifikasi. Adapun prosedur kerja pembuatan simplisia, yaitu:

- a) Daun salam muda hingga sedang dipetik secukupnya sesuai kebutuhan, lalu dibersihkan dengan air mengalir.
- b) Proses rotasi basah dilakukan dengan memilih daun yang memenuhi kriteria inklusi yang telah ditetapkan.
- c) Tiriskan daun salam untuk mengurangi sisa air.
- d) Daun salam yang sudah ditiriskan kemudian dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil dan ditimbang menggunakan neraca analitik untuk mendapatkan berat yang akurat.
- e) Daun salam yang telah dipotong dan ditimbang dikeringkan dengan cara diangin-anginkan menggunakan bantuan kipas angin.
- f) Dilakukan proses sortasi pada bahan untuk memisahkan bagian-bagian yang tidak sesuai atau tidak diinginkan.

- g) Hancurkan bahan dengan mortar dan pestel atau blender hingga menjadi serbuk halus.
- 2) Pembuatan ekstrak daun salam
- a) Setelah halus, serbuk simplisia dimasukkan ke dalam gelas *beaker* untuk dilarutkan.
- b) Simplisia hasil ayakan ditimbang sebanyak 300 gram menggunakan neraca analitik, kemudian ditambahkan pelarut etanol hingga seluruh simplisia terendam sempurna.
- c) Wadah yang berisi simplisia dan etanol ditutup rapat dan dibiarkan selama tiga hari, dengan perlindungan dari paparan sinar matahari langsung. Selama periode ini, campuran diaduk menggunakan magnetic stirrer selama delapan jam setiap harinya.
- d) Setelah tiga hari proses maserasi pertama, campuran disaring dan filtratnya ditampung dalam wadah kaca. Residu yang tersisa kemudian dimaserasi kembali dengan menambahkan etanol secukupnya hingga seluruhnya terendam. Wadah ditutup rapat dan dijauhkan dari sinar matahari langsung selama tiga hari, sambil diaduk menggunakan batang pengaduk steril selama delapan jam setiap hari.
- e) Semua filtrat yang diperoleh lalu digabung dan diuapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 40-60°C hingga didapatkan ekstrak kental.
- f) Ekstrak kental yang didapat kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik untuk menentukan total massanya.
- 3) Pembuatan media *Mueller Hinton Broth* (MHB)

- a) Media Mueller Hinton Broth (MHB) seberat 3,675 gram ditimbang menggunakan timbangan analitik.
 - b) Setelah ditimbang, bubuk media dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan dilarutkan dengan menambahkan 175 ml air suling (akuades).
 - c) Larutan media kemudian dipanaskan di atas hot plate sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer hingga larut sepenuhnya.
 - d) pH larutan diukur menggunakan stik pH, dan dipastikan berada dalam kisaran optimal, yaitu $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C .
 - e) Proses sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit setelah suhu tersebut tercapai. Media yang telah disterilisasi dibiarkan hingga suhunya menurun menjadi $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$.
 - f) Tuangkan media secara aseptis ke dalam tabung dengan volume ± 6 ml.
 - g) Setelah suhu media stabil, media dapat langsung digunakan. Jika media tidak langsung digunakan, masukkan media ke dalam *refrigerator*.
- 4) 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) Satu ose koloni *Staphylococcus aureus* dari biakan murni diambil dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 85 mL larutan NaCl 0,9% steril, kemudian dihomogenkan hingga mencapai konsentrasi setara dengan 0,5 McFarland.
 - b) Kekeruhan suspensi bakteri diukur menggunakan McFarland densitometer, dimana konsentrasi 0,5 McFarland setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.
- b. Tahap pelaksanaan (analitik)

Uji aktivitas antibakteri metode dilusi cair yang diadaptasi dari penelitian Warokka dkk. (2016) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut:

- 1) •Siapkan 12 tabung reaksi steril dan beri label dari 1 sampai 9. Tabung 10 diberi label sebagai kontrol positif (K+), tabung 11 sebagai kontrol negatif (K-), dan tabung 12 sebagai kontrol perlakuan (KP).
- 2) Masukkan 4 mL ekstrak daun salam konsentrasi 100% ke dalam tabung pertama.
- 3) Tambahkan 6 mL media cair Mueller Hinton Broth (MHB) ke dalam tabung nomor 2 hingga 9.
- 4) Isi tabung 10 dengan suspensi *Staphylococcus aureus* yang telah disesuaikan dengan standar kekeruhan McFarland, lalu tambahkan antibiotik gentamicin dengan konsentrasi 0,4% sebagai kontrol positif.
- 5) Tabung 11 diisi dengan suspensi *Staphylococcus aureus* yang telah disetarakan dengan standar McFarland sebagai kontrol negatif (tanpa antibiotik atau ekstrak).
- 6) Tambahkan 4 mL Mueller Hinton Broth ke dalam tabung 12 sebagai kontrol media (tanpa bakteri maupun ekstrak).
- 7) Ambil 3 mL larutan dari tabung pertama, pindahkan ke tabung kedua dan homogenkan untuk mendapatkan konsentrasi 50%. Lanjutkan proses pengenceran secara bertingkat hingga tabung ke-9 untuk mendapatkan konsentrasi 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39% — semua dilakukan dengan rasio pengenceran 1:2.
- 8) Tambahkan masing-masing 3 mL suspensi bakteri yang telah disetarakan (dengan standar McFarland) ke dalam tabung 2 hingga 9.

- 9) Amati tingkat kekeruhan dan lakukan pengukuran awal menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm untuk mencatat nilai absorbansi sebelum inkubasi.
- 10) Setelah pengukuran, masukkan semua tabung ke dalam inkubator dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 11) Setelah proses inkubasi, ulangi pengamatan kekeruhan dan lakukan pengukuran nilai absorbansi kembali menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm, lalu catat hasil setelah inkubasi.

c. Tahap akhir (*post*-analitik)

- 1) Lakukan pengamatan kekeruhan serta bandingkan nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi.
- 2) Peningkatan nilai absorbansi setelah inkubasi mengindikasikan adanya pertumbuhan bakteri, sementara penurunan nilai absorbansi menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri terhambat, yang mengarah pada penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM).

E. Jenis, Teknik, dan Instrumen Pengumpulan Data

1. Jenis data

Data primer yang diperoleh dalam penelitian ini adalah selisih nilai absorbansi sebelum dan setelah inkubasi pada berbagai konsentrasi ekstrak yang diuji. Data tersebut digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* melalui metode dilusi cair.

2. Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan melalui percobaan di laboratorium dengan mengukur nilai absorbansi sebelum dan sesudah proses inkubasi menggunakan alat Spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran ini bertujuan untuk melihat perbedaan nilai absorbansi pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun salam, yang dianalisis menggunakan metode dilusi cair.

3. Instrumen pengumpulan data

Pada penelitian ini, perangkat yang dimanfaatkan untuk pengumpulan data meliputi Spektrofotometer UV-Vis, alat tulis, serta kamera.

F. Teknik Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun salam terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* berupa data Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang dinyatakan dalam satuan mg/ml. Data tersebut selanjutnya dianalisis menggunakan metode tabulasi, yakni dengan penyajian dalam bentuk tabel serta uraian naratif.

2. Analisis data

Penelitian ini menerapkan analisis data kuantitatif. Untuk memverifikasi distribusi normal data, dilakukan uji normalitas Shapiro-Wilk. Apabila data menunjukkan distribusi normal, analisis dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan Levene's Test guna memastikan keseragaman varians antar kelompok. Selanjutnya, perbedaan signifikan antara nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi pada berbagai konsentrasi diuji dengan Two-Way ANOVA. Jika ditemukan perbedaan signifikan, uji lanjut (post-hoc) LSD digunakan untuk

mengidentifikasi kelompok yang menunjukkan perbedaan nyata. Namun, apabila data tidak berdistribusi normal, digunakan uji non-parametrik Wilcoxon Signed Rank Test untuk menilai signifikansi perbedaan nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi terhadap variasi konsentrasi.

G. Etika Penelitian

Dalam penelitian ini, prinsip etika yang diterapkan meliputi beneficence, yaitu prinsip berbuat baik yang bertujuan memberikan manfaat sekaligus mengurangi potensi kerugian bagi pihak lain. Selain itu, diterapkan juga prinsip non-maleficence, yaitu prinsip untuk tidak merugikan, yang memastikan subjek penelitian tidak hanya dijadikan sebagai alat dan dilindungi dari tindakan penyalahgunaan (Imas Masturoh dan Nauri, 2018).