

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan eksperimen, yaitu metode penelitian yang bertujuan untuk mengidentifikasi pengaruh suatu perlakuan terhadap variabel lain dalam kondisi yang terkontrol (Hardani dkk, 2020). Desain penelitian yang diterapkan adalah *True Experimental*, yang mencakup adanya kelompok kontrol. Namun, desain ini tidak sepenuhnya mampu mengeliminasi pengaruh variabel luar terhadap jalannya eksperimen. Dalam penelitian ini, digunakan bentuk desain *Posttest-Only Control Design* dengan kelompok eksperimen menerima perlakuan dan kelompok kontrol tidak mendapat perlakuan.

Desain penelitian *Posttest-Only Control Design*

Tabel 2
Desain Penelitian

Kelompok	Perlakuan	Posttest
R1	X1	O1
	X2	O2
R2	X3	O3
	X4	O4
R3	X5	O5
	X6	O6
	X7	O7

Keterangan:

R1 (*Random 1*): Kelompok eksperimen maserasi gabungan ekstrak daun sirih dan daun legundi.

R2 (*Random 2*): Kelompok eksperimen maserasi tunggal ekstrak daun sirih dan

daun legundi.

R3 (*Random 3*): Kelompok kontrol terdiri dari kontrol positif, kontrol negatif, dan kontrol reagen.

X1 (*Exposure 1*): Perlakuan kelompok eksperimen maserasi gabungan ekstrak daun sirih dan daun legundi yang dibuat konsentrasi 20%.

X2 (*Exposure 2*): Perlakuan kelompok eksperimen maserasi gabungan ekstrak daun sirih dan daun legundi yang dibuat konsentrasi 30%.

X3 (*Exposure 3*): Perlakuan kelompok eksperimen maserasi tunggal ekstrak daun sirih dan daun legundi yang dibuat konsentrasi 20%.

X4 (*Exposure 4*): Perlakuan kelompok eksperimen maserasi tunggal ekstrak daun sirih dan daun legundi yang dibuat konsentrasi 30%.

X5 (*Exposure 5*): Perlakuan kelompok kontrol positif menggunakan antibiotik disk kloramfenikol.

X6 (*Exposure 6*): Perlakuan kelompok kontrol negatif menggunakan akuades.

X7 (*Exposure 7*): Perlakuan kelompok kontrol reagen menggunakan etanol 96%.

O1 (*Observasi 1*): Hasil diameter zona hambat antibakteri maserasi gabungan ekstrak daun sirih dan daun legundi yang dibuat konsentrasi 20%.

O2 (*Observasi 2*): Hasil diameter zona hambat antibakteri maserasi gabungan ekstrak daun sirih dan daun legundi yang dibuat konsentrasi 30%.

O3 (*Observasi 3*): Hasil diameter zona hambat antibakteri maserasi tunggal ekstrak daun sirih dan daun legundi yang dibuat konsentrasi 20%.

O4 (*Observasi 4*): Hasil diameter zona hambat antibakteri maserasi tunggal ekstrak daun sirih dan daun legundi yang dibuat konsentrasi 30%.

O5 (*Observasi 5*): Hasil diameter zona hambat antibakteri pada kontrol positif

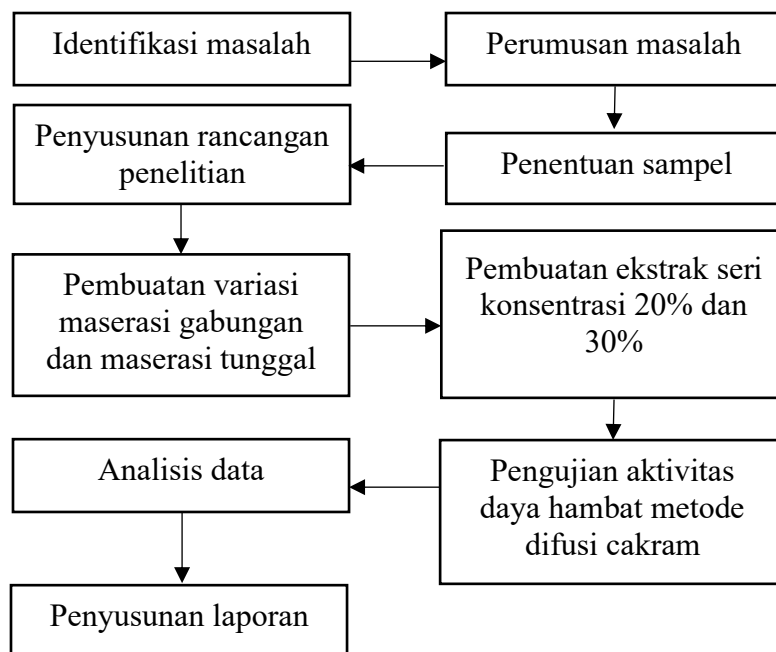
menggunakan antibiotik disk kloramfenikol.

O6 (Observasi 6): Hasil diameter zona hambat antibakteri pada kontrol negatif menggunakan akuades.

O7 (Observasi 7): Hasil diameter zona hambat antibakteri pada kontrol reagen menggunakan etanol 96%.

B. Alur Penelitian

Berikut adalah tahapan dalam pelaksanaan penelitian yang telah dirancang secara sistematis:



Gambar 6 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Dasar dan Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Denpasar berlokasi di Jalan Sanitasi No. 1 Sidakarya, Denpasar dan Laboratorium Terpadu Mikrobiologi dan

Virologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Denpasar berlokasi di Jalan Pulau Moyo No. 33A Pedungan, Denpasar.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan September 2024 sampai dengan April 2025.

D. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) dan daun legundi (*Vitex trifolia* L.) dengan variasi metode maserasi. Daun sirih yang digunakan diperoleh dari Desa Tulikup, Kecamatan Gianyar, Kabupaten Gianyar, Provinsi Bali, dengan pemilihan berdasarkan kriteria daun yang tidak terlalu muda maupun terlalu tua, dan daun yang masih utuh. Daun legundi diperoleh dari daerah Desa Tulikup, Kecamatan Gianyar, Kabupaten Gianyar, Bali yang dipilih dengan kriteria daun yang tidak terlalu muda atau tua, dan daun yang masih utuh. Daun sirih dan daun legundi diolah menjadi simplisia kering yang dimaserasi dengan etanol 96%, lalu dilakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental.

2. Jumlah dan besar sampel

Daun sirih dan daun legundi yang digunakan dalam penelitian ini, disortasi terlebih dahulu dengan masing-masing sampel basah seberat 3 kg. Setelah proses sortasi, daun dikeringkan dan dihaluskan hingga diperoleh simplisia kering. Selanjutnya, ekstrak dari kedua jenis daun tersebut diuji dengan variasi metode maserasi untuk mengevaluasi aktivitasnya sebagai agen antibakteri.

Penelitian eksperimen dengan rancangan acak kelompok menggunakan penentuan banyaknya replikasi yang dilakukan berdasarkan rumus Federer (Eppang, 2020) sebagai berikut:

$$\text{Rumus: } (t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

r = Jumlah replikasi

t = Jumlah perlakuan

Berikut cara penentuan jumlah replikasi sampel yang digunakan pada penelitian ini:

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

$$(7-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$6r - 6 \geq 15$$

$$6r \geq 21$$

$$r \geq 3.5$$

$$r \geq 4 \text{ (dibulatkan)}$$

Jadi, dari perhitungan rumus Federer diatas diperoleh hasil 4 kali pengulangan pada masing-masing perlakuan sampel.

3. Unit analisis

Dalam penelitian ini, unit analisis yang digunakan adalah pengukuran diameter zona hambat antibakteri yang dihasilkan oleh ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) dan daun legundi (*Vitex trifolia* L.). Pengujian dilakukan dengan variasi metode maserasi untuk mengevaluasi aktivitas ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Data yang dikumpulkan merupakan data kuantitatif melakukan eksperimen di laboratorium.

a. Data primer

Data kuantitatif berupa data primer penelitian hasil dari pengukuran zona hambat antibakteri ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) dan daun legundi (*Vitex trifolia* L.) dengan variasi metode maserasi.

b. Data sekunder

Dalam penelitian ini, data sekunder diperoleh dari berbagai sumber literatur yang relevan, seperti *e-book*, jurnal ilmiah, dan artikel yang mendukung kajian penelitian. Referensi tersebut digunakan sebagai landasan teoritis untuk memperkuat analisis dan interpretasi hasil penelitian.

2. Teknik pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan teknik melalui pemeriksaan laboratorium dengan mengukur zona hambat menggunakan alat ukur jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada zona hambat antibakteri variasi konsentrasi dan variasi maserasi ekstrak uji. Hasil yang didapat dari pengukuran diameter zona hambat dari setiap

ekstrak variasi maserasi yang menunjukkan aktivitas penghambatan dinyatakan dalam milimeter (mm).

3. Instrument pengumpulan data

- a. Alat Pelindung Diri (APD), berfungsi sebagai perlengkapan keselamatan yang digunakan untuk melindungi diri selama pelaksanaan kegiatan eksperimen di laboratorium.
- b. Perlengkapan alat tulis, dimanfaatkan untuk mendokumentasikan data dan mencatat hasil pengamatan selama proses penelitian berlangsung.
- c. Kamera, untuk mendokumentasikan proses selama penelitian dilakukan.
- d. Alat instrument laboratorium, sebagai penunjang jalannya eksperimen yang dilakukan di laboratorium.

F. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya neraca analitik, blender, toples kaca, mikropipet, pipet ukur, *ball pipet*, *yellow tip*, gelas ukur, tabung *eppendorf*, evaporator, *beaker glass*, corong, *petri dish* steril, *biosafety cabinet*, *Mac Farland* densitometer, inkubator, dan *autoclave*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya daun sirih (*Piper betle* L.), daun legundi (*Vitex trifolia* L.), etanol 96%, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, Mullen Hinton Agar (MHA), cakram kosong, lidi kapas steril, kertas saring, aquadest, cakram antibiotik *kloramfenikol*, dan NaCl 0,9%.

3. Prosedur kerja

a. Pembuatan simplisia dan ekstraksi metode maserasi.

- 1) Daun sirih dan daun legundi masing-masing dipetik sebanyak 3 kg lalu disortasi, selanjutnya dicuci bersih.
- 2) Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sampai seluruh daun kering merata.
- 3) Masing-masing simplisia kering daun sirih dan daun legundi selanjutnya diblender sampai halus.
- 4) Selanjutnya masing-masing simplisia ditimbang sebanyak 200 gram.
- 5) Disiapkan tiga wadah, wadah pertama dimasukkan bubuk simplisia daun sirih sebanyak 100 gram dan bubuk simplisia daun legundi sebanyak 100 gram. Selanjutnya wadah kedua dimasukkan bubuk simplisia daun sirih sebanyak 100 gram, dan wadah ketiga dimasukkan bubuk simplisia daun legundi sebanyak 100 gram.
- 6) Masing-masing wadah yang sudah berisi bubuk simplisia tersebut dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1500 ml pada wadah pertama, dan masing-masing sebanyak 750 ml pada wadah kedua dan wadah ketiga.
- 7) Waktu maserasi dilakukan selama 3×24 jam.
- 8) Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring, dan filtrat ditampung pada wadah.
- 9) Selanjutnya filtrat ekstrak dievaporasi dengan suhu waterbath 40° - 60°C selama beberapa waktu sampai terbentuk ekstrak kental (Suyasa dkk, 2022).

b. Pengenceran konsentrasi 20% dan konsentrasi 30% ekstrak.

- 1) Pengenceran konsentrasi ekstrak dibuat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% = \frac{b}{v} \times 100$$

Keterangan rumus:

% : variasi konsentrasi dalam satuan persen

b : massa ekstrak etanol daun sirih hijau atau legundi (100%)

v : volume pengencer (etanol 96%)

2) Adapun cara membuat pengenceran ekstrak dengan maserasi gabungan:

- a) Pengenceran konsentrasi 20% dibuat dengan cara mengambil 0,4 gram ekstrak lalu dilarutkan dengan 2 ml pengencer etanol 96%.
- b) Pengenceran konsentrasi 30% dibuat dengan cara mengambil 0,6 gram ekstrak lalu dilarutkan dengan 2 ml pengencer etanol 96%.
- c) Masing-masing konsentrasi dihomogenkan hingga ekstrak larut (Suyasa dkk, 2022).

3) Selanjutnya cara membuat pengenceran ekstrak dengan variasi maserasi tunggal:

- a) Pengenceran konsentrasi 20% dibuat dengan cara mengambil 0,2 gram ekstrak daun sirih dan 0,2 gram ekstrak daun legundi lalu dilarutkan dengan 2 ml pengencer etanol 96%.
- b) Pengenceran konsentrasi 30% dibuat dengan cara mengambil 0,3 gram ekstrak daun sirih dan 0,3 gram ekstrak daun legundi lalu dilarutkan dengan 2 ml pengencer etanol 96%.
- c) Masing-masing konsentrasi dihomogenkan hingga ekstrak larut (Suyasa dkk, 2022).

c. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

- 1) Serbuk media MHA ditimbang sebanyak 5,7 gram menggunakan neraca analitik, larutkan dengan 150 ml aquades pada erlenmeyer, diaduk sebentar hingga tercampur rata.
- 2) Masukkan *magnetic stirrer*, letakkan diatas hotplate tunggu hingga larutan homogen sempurna.
- 3) Disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 120°C selama 15 menit.
- 4) Larutan MHA yang sudah steril didiamkan di suhu ruang hingga tidak terlalu panas.
- 5) Tuangkan pada cawan petri steril masing-masing sebanyak 15 ml, letakkan pada tempat datar dan biarkan hingga padat.
- 6) Setelah media MHA padat, simpan pada refrigerator jika tidak langsung digunakan (Suyasa dkk, 2022).

d. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

- 1) Dari biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*, diambil 1 koloni menggunakan ose steril.
- 2) Masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml larutan NaCl 0,9%
- 3) Larutan dikocok hingga kekeruhan mencapai 0,5 sesuai standar Mc Farland.
- 4) Streak larutan suspensi bakteri hingga memenuhi seluruh permukaan media MHA (Suyasa dkk, 2022).

e. Uji aktivitas antibakteri (metode difusi cakram)

- 1) Letakkan kertas cakram kosong diatas permukaan media MHA yang sudah berisi suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*. Kertas cakram kosong ditetesi

dengan masing-masing pengenceran konsentrasi ekstrak yang telah dibuat sebanyak 2 μ l

- 2) Pada kontrol positif menggunakan cakram antibiotik *kloramfenikol*, kontrol negatif menggunakan cakram kosong yang ditetesi aquades sebanyak 2 μ l, dan pada kontrol reagen digunakan cakram kosong yang ditetesi etanol 96% sebanyak 2 μ l.
- 3) Tempelkan kertas cakram dengan sedikit ditekan-tekan pada media MHA.
- 4) Jarak kertas cakram satu dengan lainnya minimal 15 mm dengan catatan tidak menggeser kertas cakram yang sudah menempel pada media.
- 5) Kertas cakram yang sudah melekat pada media MHA diinkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 37°C (Suyasa dkk, 2022).

f. Pelaporan hasil

- 1) Setelah diinkubasi selama 1x24 jam, zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram disk diukur menggunakan jangka sorong dan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).
- 2) Selanjutnya dikategorikan kekuatan daya hambat antibakterinya (Suyasa dkk, 2022).

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data pada penelitian ini didapat dari hasil melakukan eksperimen pengujian aktivitas daya hambat antibakteri dengan mengukur diameter yang terbentuk di sekitar kertas cakram telah berisi kontrol dan ekstrak uji dengan satuan milimeter (mm).

2. Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif menggunakan aplikasi software SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*), dengan tahapan sebagai berikut: Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak, dilanjutkan uji parametrik yaitu Uji *One-Way Anova* untuk membandingkan perbedaan rata-rata antara kelompok pada dua variabel faktor. Uji *Post Hoc LSD* dilakukan membandingkan pasangan rata-rata kelompok perlakuan yang berbeda signifikan.

H. Etika Penelitian

Hasil penelitian yang dapat dipertanggungjawabkan secara moral merupakan hasil dari peneliti yang senantiasa menerapkan etika dalam melakukan penelitian ilmiah. Berdasarkan etika peneliti dalam penelitian ilmiah oleh Putra dkk. (2021) dipaparkan sebagai berikut:

1. Kejujuran

Kejujuran dengan tidak membuat, memalsukan atau merubah data, jujur Ketika mengumpulkan sumber, melaksanakan cara dan langkah penelitian sesuai referensi serta jujur dengan kekurangan metode yang digunakan. Dalam menyampaikan penelitian sebaiknya melaporkan informasi, hasil, cara dan prosedur apa adanya sesuai yang diperoleh.

2. Objektivitas

Objektivitas yang baik dalam karakteristik dan prosedur penelitian diperlukan untuk meminimalisir kesalahan dalam melakukan analisis penelitian. Keterbukaan penelitian berupa analisis data menggunakan teknik pengumpulan yang

interpretasinya bisa dipertanggungjawabkan. Menghindari hal yang mempengaruhi penelitian seperti mencurangi diri sendiri dan mengutarakan kepentingan pribadi.

3. Integritas

Usaha untuk konsisten dalam berpikir dan bertindak dalam proses penelitian merupakan etika peneliti dalam hal integritas. Peneliti memenuhi janji dan persetujuan yang sudah dibuat serta bertindak tulus dalam penelitian.

4. Ketepatan

Suatu penelitian secara teknis instrumen pengumpulan data harus memiliki validitas dan reliabilitas yang memadai, desain penelitian, pengambilan sampel dan teknik analisis data yang dilakukan harus memiliki tingkat ketepatan. Menghindari kelalaian, kritis dalam memeriksa pekerjaan, membuat catatan kegiatan penelitian yang jelas.

5. Tanggung jawab sosial

Peneliti memiliki tanggung jawab sosial dengan mencakup usaha agar menjadikan penelitian yang dilakukan bermanfaat bagi masyarakat, masyarakat, meningkatkan kualitas hidup peneliti, serta meringankan beban hidup masyarakat. Apabila masyarakat ingin menerapkan hasil dari penelitiannya, peneliti memiliki tugas untuk mendampingi masyarakat.

6. Kompetensi

Peneliti perlu terampil sesuai dengan bidang ilmunya serta berpengetahuan yang sesuai dengan penelitiannya. Keahlian profesional seorang peneliti dapat ditingkatkan dengan melakukan pembelajaran sepanjang hayat, mempromosikan kompetensi dalam sains secara umum.

7. Legalitas

Mematuhi kebijakan pemerintah serta mematuhi peraturan institusi yang berlaku untuk penelitian yang dilaksanakan adalah legalitas seorang peneliti untuk menjelaskan tujuan penelitian dan hal-hal terkait penelitian lainnya, sangat penting memahami hukum dan kebijakan lembaga.