

BAB IV

METODELOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian eksperimen semu (quasi-experiment) berusaha menciptakan hubungan sebab-akibat dengan memberikan intervensi (perlakuan) pada kelompok subjek. Namun, mereka tidak dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi eksperimen (Sugiono, 2020).

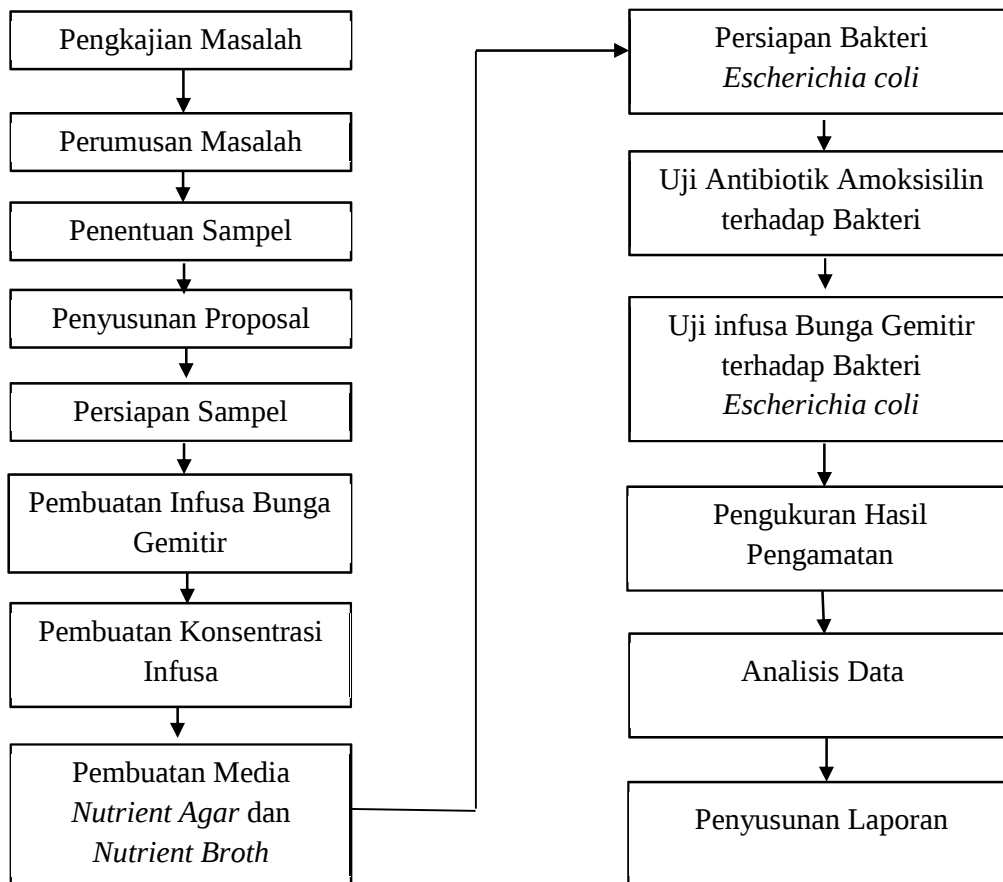
Tabel 2
Desain penelitian

Kelompok	Perlakuan	Posttest
R1	X	O1
R2	Kontrol	Q2

Keterangan:

- R1 (Random 1): Kelompok penelitian/eksperimen, yaitu berbagai konsentrasi infusa bunga gemitir.
- R2 (Random 2): Kelompok kontrol, yaitu antibiotik amoksisilin 1% (b/v), dan akuades sebagai kontrol negatif.
- X (Exposure): Intervensi (Perlakuan).
- Observasi (O1): Serapan media dan adanya koloni yang tumbuh pada media pada berbagai konsentrasi infusa.
- Observasi (O2): Serapan media dan adanya koloni yang tumbuh pada media kontrol positif dan kontrol negatif.

B. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Laboratorium Teknologi Steril Sekolah Tinggi Farmasi Mahaganesa
beralamat Jalan Tukad Barito Timur No 56 Renon.

2. Waktu penelitian

Pada bulan September sampai bulan November 2025.

D. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian

Pada penelitian ini yang menjadi sampel penelitian adalah infusa bunga gemitir dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%. Bunga gemitir didapatkan dari wilayah Kecamatan Klungkung, Kabupaten Klungkung. Berikut kriteria bunga gemitir yang digunakan:

- a. Varian bunga gemitir yang dipakai adalah varian gemitir maharani.
- b. Bunga gemitir yang dipakai yang berwarna orange.
- c. berukuran 4-7 cm.
- d. berumur 70-90 hari.
- e. Ditanam pada ketinggian < 200 mdpl.

2. Besar dan Jumlah Sampel

Bunga gemitir yang didapatkan sebanyak 1 kg dibersihkan dipisahkan dan diambil mahkota bunganya saja, dikeringkan kemudian dihaluskan hingga diperoleh serbuk simplisianya. Simplisia yang telah dibuat kemudian dibuat menjadi 5 konsentrasi. Adapun konsentrasi yang akan dibuat yaitu 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%. Ditambah 2 kelompok kontrol yaitu, kelompok kontrol positif amoksisilin 1%, dan kelompok kontrol negatif akuades. Pada masing-masing perlakuan tersebut dilakukan pengulangan pada masing-masing variasi konsentrasi infusa bunga gemitir. Menurut Hanafiah (2016) menyebutkan jika syarat minimal jumlah pengulangan yang bisa dilakukan untuk percobaan laboratorium atau eksperimen rumah kaca adalah 3 kali pengulangan. Maka pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah 3 kali pengulangan.

3. Unit Analisis

Unit analisis pada penelitian ini yaitu absorbansi media cair *Nutrien Broth* pada berbagai konsentrasi infusa bunga gemitir konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% yang dibuat dahulu oleh peneliti secara terpisah kemudian digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum.

E. Jenis dan Cara Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data Primer

Data primer didapat dengan eksperimen di laboratorium meliputi penghitungan Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum infus bunga gemitir terhadap bakteri *E. coli*.

b. Data Sekunder

Data sekunder didapatkan dari studi kepustakaan yang didapatkan dari berbagai jurnal ilmiah yang tersedia berkaitan mengenai senyawa bahan alam sebagai senyawa antibakteri.

2. Cara pengumpulan data

Cara pengumpulan data yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan melakukan pengukuran menggunakan alat ukur melalui eksperimen. Pada uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) kekeruhan larutan diukur menggunakan spektrofotometer Uv-Vis dan uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan melihat ada atau tidaknya koloni yang tumbuh setelah inkubasi.

3. Instrumen pengumpulan data

- 1) Alat Tulis
- 2) Alat Spektrofotometer UV Vis untuk penentuan kekeruhan uji (KHM).

F. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja

1. Alat

Alat penghalus (blender) (*Philips*), kertas saring, oven (*B-One*), botol steril, erlenmeyer (*Pyrex*), mikropipet (*Dragonlab*), dan tip, gelas ukur (*Herma*), beaker glass (*Iwaki Pyrex*), spiritus, cawan petri (*Herma*), tabung reaksi (*Pyrex*) dan rak tabung reaksi, spektrofotometer UV Vis (*Thermo Evolution 201*)

2. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini, yaitu : bunga gemitir, akuades steril, bakteri *Escherichia coli*, media *Nutrient Broth* (*Himedia*), media *Nutrient Agar* (*Himedia*), larutan NaCl fisiologis 0,95%, kapas steril, aluminium foil, kertas saring.

3. Prosedur Kerja

a. Preanalitik

1) Pembuatan Infusa Bunga Gemitir

- a) Memilih mahkota bunga gemitir yang berwarna orange dipisahkan dari tangkai bunga, membersihkan bunga gemitir yang telah dipilih.
- b) Menimbang bunga gemitir sebanyak 1 kg.
- c) Mengeringkan bunga gemitir pada oven pada suhu 60 °C sampai kering.
- d) Menghaluskan bunga yang sudah kering menggunakan blender.
- e) Melakukan penyerbukan dengan cara diayak menggunakan mesh ukuran 40.
- f) Menimbang serbuk halus bunga gemitir sesuai perhitungan untuk membuat

masing-masing konsentrasi infusa. Adapun variasi berat simplisia yang digunakan sebagai berikut:

Tabel 3
Variasi Berat Simplisia Pembuatan Infusa

Konsentrasi	Berat Simplisia	Jumlah Akuades
10%	2,5 gram	25 ml
20%	5 gram	25 ml
30%	7,5 gram	25 ml
40%	10 gram	25 ml
50%	12,5 gram	25 ml

- g) Dipanaskan pada suhu 90°C selama 15 menit.
- h) Mendinginkan larutan dan saring (Noval dkk., 2023).

2) Pembuatan Media *Nutrient Agar*

- a) Gunakan timbangan analitik untuk menimbang 11,2 gram bubuk media *Nutrient Agar*.
- b) Timbang bubuk media, lalu tambahkan ke dalam labu Erlenmeyer berisi 400 mililiter air suling untuk melarutkannya.
- c) Panaskan media di atas kompor listrik dan aduk hingga tercampur rata.
- d) Gunakan aluminium foil dan kapas yang diminyaki untuk menutup labu Erlenmeyer.
- e) Autoklaf media selama 15 menit pada suhu 121°C untuk mensterilkannya, dihitung dari saat suhu mencapai 121°C.
- f) Biarkan media yang telah disterilkan berada pada suhu $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$.
- g) Pindahkan media ke cawan Petri ± 15 ml secara aseptik, lalu biarkan mengeras.

h) Pembuatan Media *Nutrien Broth*

- a) Gunakan timbangan analitik untuk menimbang 0,8 gram bubuk media Nutrient Broth.
- b) Timbang bubuk media, lalu tambahkan ke dalam labu Erlenmeyer dengan 60 mililiter air suling untuk melarutkannya.
- c) Panaskan media di atas kompor listrik dan aduk hingga tercampur rata.
- d) Gunakan aluminium foil dan kapas yang diminyaki untuk menutup labu Erlenmeyer.
- e) Autoklaf media selama 15 menit pada suhu 121°C untuk mensterilkannya, dihitung dari saat suhu mencapai 121°C.
- f) Biarkan media yang telah disterilkan berada pada suhu $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$.

Pembuatan suspensi *Escherichia coli*

- a) Lima mililiter larutan NaCl fisiologis 0,95% ditambahkan ke dalam tabung yang berisi satu hingga tiga loop kultur murni bakteri *Escherichia coli*.
- b) Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 625 nm digunakan untuk mengukur suspensi tersebut.
- c) Nilai absorbansi berada antara 0,08 dan 0,13, yang berarti kekeruhan suspensi tersebut sesuai dengan standar McFarland 0,5, atau $1,5 \times 10^8$ (CFU)/mL (Munier dkk., 2021).

3) Pembuatan Larutan Kontrol Positif Amoksisilin

- a) Timbang 1000 mg antibiotik amoksisilin.
- b) Dilarutkan dengan 50 ml akuades.
- c) Didapatkan konsentrasi kontrol positif sebesar 1%.

b. Tahap Analitik

1) Tahap pemeriksaan konsentrasi hambat minimum (KHM)

- a) Untuk setiap konsentrasi, siapkan tiga tabung reaksi steril.
- b) Tuangkan 3,5 mililiter kaldu nutrisi.
- c) Tambahkan 0,5 mililiter suspensi bakteri, atau 0,5 McFarland.
- d) Tulis 1a-5a pada setiap tabung reaksi.
- e) Ambil 1 mililiter konsentrasi infus per tabung (10, 20, 30, 40, dan 50%).
- f) Gunakan pengaduk vortex untuk menghomogenkan campuran dan aduk.
- g) Ukur absorbansi awal dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm.
- h) Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- i) Gunakan spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan absorbansi akhir.
(Munira dan Nasir, 2023).

2) Tahap pemeriksaan konsentrasi bunuh minimum (KBM)

- a) Sebelum inkubasi, pipet 0,1 mL dari setiap pengenceran dari tahap penyaringan MIC ke agar nutrisi steril.
- b) Inkubasi selama satu hari penuh pada suhu 37°C.
- c) Setelah inkubasi, periksa apakah terjadi pertumbuhan bakteri pada media agar (Munira dan Nasir, 2023).

c. Tahap Pasca Analitik

1) Pelaporan Hasil

- a) Mengukur absorbansi media cair *Nutrien broth* yang telah diinkubasi untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

- b) Melihat terdapatnya koloni yang tumbuh pada media padat untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

2) Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum

- a) Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan cara sebagai berikut:

$$OD = X - Y$$

Keterangan:

OD : *Optical Density*

X : Nilai absorbansi setelah inkubasi

Y : Nilai absorbansi sebelum inkubasi

- b) Konsentrasi minimum yang mampu menciptakan nilai OD negatif (-) ditetapkan sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).
- c) Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara observasi ada atau tidaknya koloni yang tumbuh
- d) Konsentrasi yang tidak menimbulkan pertumbuhan koloni maka ditetapkan sebagai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Konsentrasi Hambat Minimum(KHM) untuk bakteri *Escherichia coli* dihitung menggunakan data yang dikumpulkan dari temuan eksperimental, yang dinyatakan sebagai nilai absorbansi untuk setiap konsentrasi dalam pengenceran cair. Kehadiran atau ketidakhadiran pertumbuhan bakteri pada media padat dikenal sebagai Konsentrasi Bakterisida Minimum (KHM). Data tersebut kemudian ditabulasi dan disajikan secara naratif.

2. Analisis data

Data yang dikumpul dan disediakan telah dianalisis menggunakan program komputer. Ujian parametrik yang dipanggil Analisis Varians Sehala (ANOVA) membandingkan perbezaan min antara dua atau lebih kumpulan rawatan pada aras signifikansi 0.05 menggunakan skala data berangka.(Elzuhria dkk., 2023).