

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Metode eksperimen digunakan dalam penelitian ini untuk menilai pengaruh perlakuan (*treatment*) terhadap objek yang diteliti. Jenis eksperimen yang diterapkan adalah *true experimental*, yang melibatkan kelompok kontrol sebagai pengendali terhadap variabel luar yang dapat memengaruhi hasil penelitian. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu *pretest-posttest control group design*, dimana kedua kelompok dipilih secara acak dan diberikan *pretest* terlebih dahulu untuk mengetahui kondisi awal pada kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol (Sugiyono, 2019). Bentuk rancangan penelitian ini dapat dilihat pada gambar berikut :

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

Kelompok	<i>Pre-test</i>	Perlakuan	<i>Post-test</i>
R1	O1	X	O3
R2	O2	Kontrol	O4

Keterangan :

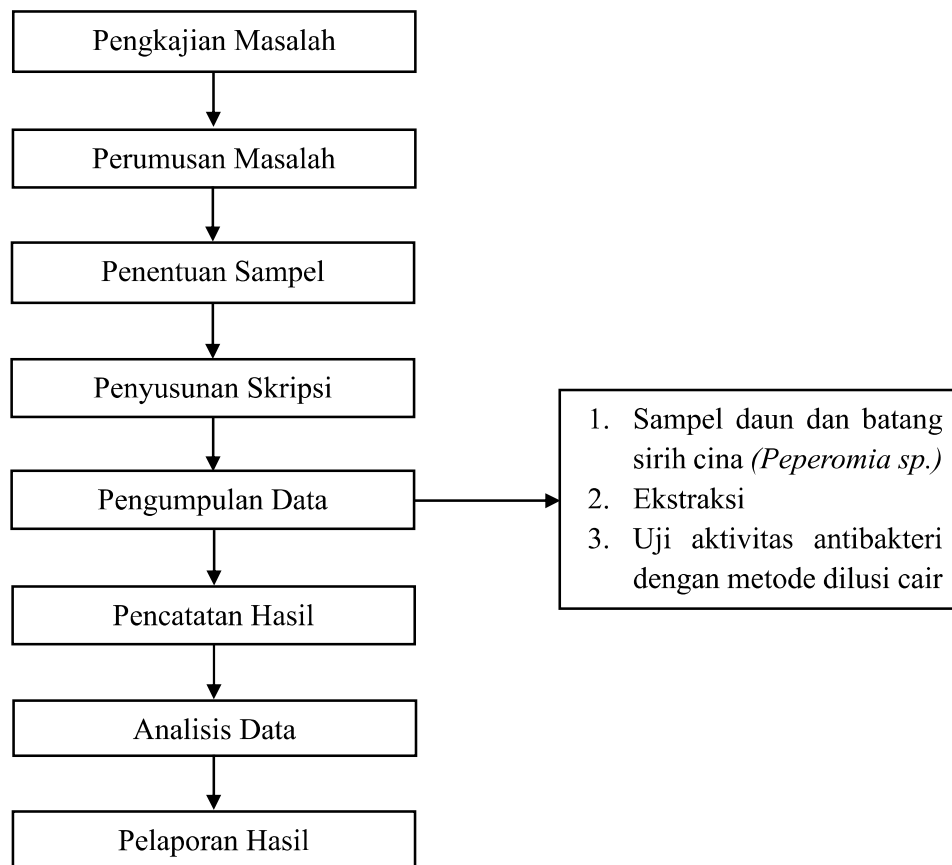
R1 (*Random 1*) : Kelompok eksperimen yang terdiri atas berbagai konsentrasi uji ekstrak daun dan batang sirih cina yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39%.

R2 (*Random 2*) : Kelompok kontrol yaitu suspensi bakteri $1,5 \times 10^6$ CFU/mL yang ditambahkan antibiotik *gentamicin* 10 μ g/mL sebagai kontrol positif dan suspensi bakteri $1,5 \times 10^6$ CFU/mL sebagai kontrol negatif.

- X (*Exposure*) : Perlakuan atau 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

Alur penelitian ini disajikan dalam bagan dibawah ini :



Gambar 5 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar, Laboratorium Kimia dan Toksikologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar, dan Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO) Karangasem Provinsi Bali.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2026 hingga bulan Maret 2026.

D. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daun dan batang sirih cina (*Peperomia sp.*) yang telah melewati tahap evaporasi sehingga diperoleh ekstrak pekat. Tumbuhan sirih cina diperoleh dari Desa Nyalian, Kecamatan Banjarangkan, Kabupaten Klungkung. Pemilihan sampel dilakukan dengan kriteria inklusi yaitu tumbuhan sirih cina bagian daun ke-3 dari pucuk hingga pangkal dengan kondisi berwarna hijau dan tidak busuk. Batang yang digunakan berwarna hijau dan tidak busuk. Sedangkan kriteria ekslusinya yaitu tumbuhan sirih cina dengan daun berlubang dan busuk.

2. Jumlah dan besar sampel

Sebanyak 3 kg daun dan batang sirih cina segar digunakan sebagai bahan awal, kemudian dilakukan proses sortasi, pengeringan, dan pengayakan hingga diperoleh 160 gram bahan kering. Sampel yang diuji dalam penelitian ini berupa ekstrak etanol 96% daun dan batang sirih cina dengan pengenceran berseri pada konsentrasi uji 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39% di

tambah dengan dua perlakuan kontrol, yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Penentuan pengulangan dapat dihitung berdasarkan jumlah konsentrasi pengenceran berseri yang digunakan dan jumlah kontrol. Dalam penelitian ini ditetapkan 8 perlakuan dan 2 kontrol, sehingga total perlakuan adalah 10 perlakuan. Perhitungan besar sampel untuk setiap perlakuan ditentukan dengan menggunakan rumus Federer, yaitu (Indratama dan Yenita, 2019):

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

Keterangan :

t = banyaknya perlakuan

n = banyaknya pengulangan

Perhitungan:

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

$$(10 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$9(n - 1) \geq 15$$

$$9n - 9 \geq 15$$

$$9n \geq 15 + 9$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 2,6$$

$$n \geq 3 \text{ (dibulatkan)}$$

Berdasarkan hasil perhitungan, jumlah pengulangan yang diterapkan dalam penelitian ini yaitu minimal tiga kali. Pengukuran nilai absorbansi dilakukan sebelum dan setelah inkubasi dengan spektrofotometer UV-Vis sebanyak tiga kali ulangan. Oleh karena itu, diperoleh 48 data dari perlakuan dan 12 data dari kontrol, sehingga total data yang dihasilkan adalah sebanyak 60 data.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Penelitian ini menggunakan data yang bersumber dari pengujian langsung di laboratorium serta data pendukung lainnya. Data hasil pengujian laboratorium tersebut berupa nilai absorbansi sebelum dan setelah inkubasi dikategorikan sebagai data primer. Selisih kedua nilai tersebut dihitung untuk memperoleh nilai *optical density* (OD), yang selanjutnya digunakan sebagai dasar penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Data sekunder diperoleh dari berbagai literatur, jurnal, dan sumber referensi lain yang relevan dengan topik penelitian ini.

2. Teknik pengumpulan data

Data penelitian dikumpulkan melalui pengujian di laboratorium dengan melakukan pengukuran nilai absorbansi sebelum dan setelah proses inkubasi dengan spektrofotometer UV-Vis. Tujuan pengukuran ini adalah untuk mengetahui nilai absorbansi ekstrak daun dan batang sirih cina pada berbagai konsentrasi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* berdasarkan metode dilusi cair.

3. Persiapan alat dan bahan

a. Alat

Alat penelitian yang digunakan terdiri dari : wadah sampel, neraca analitik, blender, spatula, toples kaca, corong kaca, pipet ukur, *ball* pipet, mikropipet, gelas ukur, *rotary evaporator*, gelas beaker, cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, rak tabung, ose bulat *disposable*, *hotplate*, *magnetic stirrer*, bunsen, *Biosafety Cabinet*, McFarland densitometer, *vortex*, inkubator, autoklaf, oven, pot tutup ulir, *refrigerator*, *cool box*, spektrofotometer UV-Vis, kuvet, dan alat tulis.

b. Bahan

Dalam penelitian ini digunakan bahan-bahan yaitu : daun dan batang sirih cina, etanol 96%, *aquadest*, media *Mueller Hinton Broth* (MHB), media *Nutrient Agar* (NA), antibiotik *gentamicin* 80mg/2mL, alkohol 70%, NaCl 0,9%, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *blue tip*, aluminium foil, kertas saring, strip pH, kapas lemak, plastik pp, tali kasur, *tissue*, spidol, kertas label.

4. Prosedur kerja

a. Pembuatan simplisia daun dan batang sirih cina

Pembuatan simplisia diadaptasi dari prosedur kerja yang dilakukan oleh Nafiisah dkk., (2024) yang dimodifikasi sesuai dengan penelitian yang akan dilakukan.

- 1) Sampel daun dan batang sirih cina (*Peperomia sp.*) sebanyak 3 kg dicuci dan ditiriskan untuk mengurangi sisa air bekas pencucian.
- 2) Kemudian dilakukan sortasi basah sesuai dengan kriteria inklusi yang ditetapkan. Daun dan batang sirih cina yang telah di sortasi di potong-potong menjadi lebih kecil dan ditimbang.
- 3) Pengeringan daun dan batang sirih cina yang telah dipotong dilakukan pada suhu ruang dan tidak terpapar sinar matahari langsung, atau dengan metode oven pada suhu 40°C.
- 4) Jika sudah kering, daun dan batang sirih cina dihaluskan menggunakan blender dan diayak hingga diperoleh serbuk simplisia yang halus dan kering.

b. Pembuatan ekstrak daun dan batang sirih cina

Proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Penggunaan etanol 96% bertujuan untuk melarutkan senyawa

metabolit sekunder secara optimal serta meminimalkan risiko pertumbuhan mikroorganisme yang dapat mengganggu proses ekstraksi. Prosedur kerja ini diadaptasi dari metode yang dikembangkan oleh Estikomah dkk., (2021) dengan modifikasi tertentu sesuai kebutuhan.

- 1) Serbuk simplisia ditimbang menggunakan neraca analitik sebanyak 160 gram, kemudian dimasukkan ke dalam wadah dan dilarutkan dengan 1600 mL etanol 96% pada perbandingan 1:10 atau hingga simplisia terendam sempurna oleh pelarut.
- 2) Wadah yang berisi campuran simplisia dan etanol 96% di tutup rapat, rendaman disimpan selama 72 jam atau tiga hari tanpa terkena sinar matahari sambil diaduk setiap 8 jam.
- 3) Setelah tiga hari, rendaman tersebut disaring dan dipisahkan antara ampas dan filtratnya, kemudian ditampung pada wadah kaca. Proses maserasi dapat diulangi hingga warna filtrat telah memudar.
- 4) Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C untuk menguapkan pelarut dan memperoleh ekstrak pekat.
- 5) Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian ditimbang untuk mengetahui total massanya.

c. Pembuatan media *Mueller Hinton Broth* (MHB)

- 1) Pembuatan media diawali dengan melakukan perhitungan penimbangan media sesuai etiket pada kemasan media. Pada etiket tertera 21,0 gram per 1000 mL, sehingga media *Mueller Hinton Broth* (MHB) ditimbang sebanyak 3,15 gram menggunakan neraca analitik, kemudian bubuk media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 150 mL akuades.

- 2) Larutan media kemudian dipanaskan menggunakan *hotplate* dengan *magnetic stirrer* hingga larut sempurna.
- 3) Pengukuran pH larutan dilakukan dengan stik pH untuk memastikan nilainya berada dalam rentang $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C .
- 4) Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan kapas lemak dan juga aluminium foil, selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit terhitung dari suhu tersebut tercapai.
- 5) Setelah proses sterilisasi media selesai, media dibiarkan hingga suhunya kisaran $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$.
- 6) Jika erlenmeyer sudah bisa dipegang dan tidak panas, media dapat dituangkan ke dalam tabung steril sebanyak 6 mL secara aseptis.
- 7) Setelah suhu media benar-benar dingin/tidak panas lagi, media dapat langsung digunakan. Jika media tidak langsung digunakan, media disimpan terlebih dahulu di dalam *refrigerator*.

d. Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)

- 1) Berat bubuk media yang diperlukan diperoleh dari perhitungan berdasarkan etiket pada kemasan media. Pada media *Nutrient Agar* (NA) ini tertera 28,0 gram per 1000 mL, sehingga bubuk media yang di timbang sebanyak 1,4 gram dan dilarutkan dengan 50 mL akuades.
- 2) Pemanasan media dilakukan menggunakan *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga larut sempurna.
- 3) Erlenmeyer ditutup menggunakan kapas lemak dan juga aluminium foil, selanjutnya media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

- 4) Setelah proses sterilisasi selesai, media dibiarkan hingga mencapai suhu ruang atau hangat $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$.
- 5) Jika sudah dirasa tidak begitu panas, ketika masih hangat media segera dituang ke cawan petri steril dengan volume ± 20 mL atau hingga seluruh permukaan cawan tertutup media.
- 6) Kemudian media ditunggu hingga membeku dan siap untuk digunakan. Jika media tidak langsung digunakan, media dapat di simpan terlebih dahulu di dalam pendingin atau *refrigerator*.

e. Peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus*

Dilakukan peremajaan bakteri berdasarkan prosedur yang telah diadaptasi dari penelitian Hendri, Zakiah dan Kurniatuhadi, (2023).

- 1) Diambil beberapa koloni murni dari bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 dan di *streak* ke media *Nutrient Agar* (NA).
- 2) Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- 3) Setelah masa inkubasi selesai. Kultur murni tersebut siap digunakan untuk pembuatan suspensi.

f. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Prosedur penelitian ini mengacu pada metode yang dikemukakan oleh Citraningsih, Sianturi dan Taufiqurrahman, (2024) dan disesuaikan dengan penelitian yang akan dilakukan.

- 1) Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 diambil dari biakan murni menggunakan ose steril dan di masukkan ke dalam tabung yang berisi 10 mL NaCl 0,9% steril, kemudian dihomegenkan menggunakan *vortex mixer* selama 15 detik.

- 2) Kekeruhan suspensi di ukur menggunakan McFarland densitometer hingga mencapai 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Kemudian suspensi tersebut diencerkan dengan mencampurkan 2 ml suspensi 0,5 McFarland dan di tambahkan 198 mL NaCl 0,9% steril untuk memperoleh suspensi konsentrasi $1,5 \times 10^6$ CFU/mL).

g. Uji aktivitas antibakteri metode dilusi cair

Uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi cair diadaptasi dari prosedur yang dilakukan oleh Nurmala dkk., (2025); Rahmah dkk., (2025) dan telah dimodifikasi sesuai dengan penelitian yang akan dilakukan.

- 1) Disiapkan 11 tabung reaksi yang telah disterilisasi, kemudian beri label tabung 1 hingga 8, tabung 9 sebagai K+ (kontrol positif), tabung 10 sebagai K- (kontrol negatif), dan tabung 11 sebagai KP (kontrol perlakuan). Ini merupakan rangkaian 1 seri pengenceran, dimana pengulangan uji atau seri pengenceran dilakukan sebanyak tiga kali.
- 2) Uji dimulai dari tabung 1 diisi dengan 8 ml ekstrak daun dan batang sirih cina 100%, kemudian tabung 2 sampai 8 diisi media *Mueller Hinton Broth* (MHB) sebanyak 4 mL.
- 3) Pengenceran berseri dimulai dari tabung 1, diambil 4 mL ekstrak kemudian dipindahkan ke tabung 2 (homogenkan). Pengenceran dilanjutkan sampai ke tabung 8. Pengenceran ini dilakukan dengan rasio 1:2.
- 4) Tambahkan 4 mL suspensi bakteri $1,5 \times 10^6$ CFU/mL ke dalam tabung 1 (homogenkan) sehingga diperoleh konsentrasi 50%, dan 4 mL suspensi $1,5 \times 10^6$ CFU/mL di tambahkan ke dalam tabung 2 hingga 8 (dihomogenkan),

sehingga diperoleh konsentrasi 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39%.

- 5) Kemudian pada tabung 9 diisi 4 mL suspensi bakteri $1,5 \times 10^6$ CFU/mL dan 4 mL antibiotik *gentamicin* 10 µg/ml (kontrol positif), tabung 10 diisi 8 mL suspensi bakteri $1,5 \times 10^6$ CFU/mL tanpa pemberian antibiotik maupun ekstrak (kontrol negatif) dan tabung 11 diisi 8 mL media MHB tanpa pemberian antibiotik dan ekstrak (kontrol perlakuan/media).
- 6) Dilakukan pengukuran nilai absorbansi sebelum inkubasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm dan catat hasilnya.
- 7) Setelah dilakukan pengukuran, tabung di tutup dengan kapas lemak dan di inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 8) Setelah proses inkubasi, dilakukan pengukuran ulang nilai absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm, kemudian hasil pengukuran tersebut dicatat.
- 9) Pengukuran sebelum dan setelah inkubasi dilakukan untuk mendapatkan nilai *optical density* (OD) dengan perhitungan :

$$\text{Nilai OD} = A \text{ Setelah Inkubasi} - A \text{ Sebelum Inkubasi}$$

- 10) Nilai A menyatakan absorbansi larutan. Nilai KHM diperoleh melalui pengukuran absorbansi sebelum dan setelah inkubasi, kemudian dihitung selisihnya untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan nilai absorbansi. Peningkatan nilai absorbansi mengindikasikan adanya pertumbuhan bakteri, sedangkan penurunan atau nilai yang tetap menunjukkan

bahwa pertumbuhan bakteri berhasil dihambat oleh agen antibakteri. Sehingga nilai KHM diambil dari hasil *optical density* (OD) yang mendekati nol.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun dan batang sirih cina (*Peperomia pellucida* sp.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* menghasilkan data berupa nilai absorbansi sebelum dan setelah inkubasi. Dari selisih nilai absorbansi setelah dan sebelum inkubasi diperoleh nilai *optical density* (ΔOD), yang digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dengan satuan mg/mL. Data hasil uji kemudian dianalisis secara tabulating dengan penyajian data dalam bentuk tabel dan penjelasan naratif.

2. Analisis data

Penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan melalui pendekatan deskriptif kuantitatif berdasarkan perubahan nilai absorbansi sebelum dan setelah inkubasi pada setiap konsentrasi uji. Konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak adanya peningkatan nilai absorbansi setelah inkubasi diinterpretasikan sebagai KHM, karena mencerminkan terhambatnya pertumbuhan bakteri secara biologis. Analisis statistik tidak digunakan untuk menetapkan nilai KHM, melainkan untuk menguji perbedaan efek penghambatan pertumbuhan bakteri antar berbagai konsentrasi ekstrak yang diuji. Uji statistik dilakukan terhadap nilai selisih (ΔOD) untuk mengetahui apakah perbedaan efek antar kelompok konsentrasi tersebut terjadi secara signifikan berdasarkan uji statistik, sehingga hasil pengujian tidak hanya bersifat deskriptif, tetapi juga didukung oleh pembuktian kuantitatif yang objektif.

Uji statistik dilakukan menggunakan perangkat komputer dengan aplikasi IBM SPSS *Statistics* 21. Jenis uji statistik ini diadaptasi dari uji analisis yang telah dilakukan oleh Rahmah dkk., (2025) dan Saputra dkk., (2023). Adapun data yang digunakan ialah nilai *optical density* (ΔOD) yang diperoleh dari selisih nilai absorbansi setelah dan sebelum inkubasi pada setiap perlakuan. Kemudian analisis data dilakukan dengan tahapan sebagai berikut :

a. Uji normalitas

Pengujian normalitas data dilakukan melalui uji *Shapiro-Wilk* untuk menilai apakah data tersebut berdistribusi normal atau tidak. Dengan pertimbangan bahwa jumlah data yang dianalisis relatif kecil, yaitu 30 data. Adapun kriteria keputusan dalam uji normalitas yaitu $p > 0,05$ (data berdistribusi normal) dan $p \leq 0,05$ (data berdistribusi tidak normal).

b. Uji homogenitas

Uji homogenitas dilakukan menggunakan uji *Levene Test* untuk memastikan varians antar kelompok relatif sama (homogen). Kriteria keputusan dalam uji homogenitas yaitu $p > 0,05$ (data homogen) dan $p \leq 0,05$ (data tidak homogen).

c. Asumsi terpenuhi

Jika data yang diperoleh normal dan homogen uji dapat dilanjutkan menggunakan *One-Way* ANOVA. Kriteria Keputusan pada uji *One-Way* ANOVA yaitu $p \leq 0,05$ (ada perbedaan signifikan) dan $p > 0,05$ (tidak ada perbedaan signifikan). Jika hasil ini signifikan, uji dilanjutkan dengan *Post Hoc Tukey HSD* (*Honestly Significant Difference*) untuk mengetahui perbedaan signifikan antar kelompok secara spesifik.

d. Asumsi tidak terpenuhi

Jika salah satu atau kedua asumsi tidak terpenuhi maka uji *One-Way* ANOVA tidak dapat dilakukan. Jika data berdistribusi normal namun tidak homogen, maka dilakukan uji *Welch* ANOVA. Jika hasil signifikan dilanjutkan dengan uji *Games-Howell Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan signifikannya. Kemudian jika data berdistribusi tidak normal namun homogen atau data berdistribusi tidak normal dan juga tidak homogen, maka uji yang digunakan yaitu uji *Kruskal-Wallis*. Jika hasil signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* secara berpasangan dengan koreksi *Bonferroni* untuk mengetahui pasangan kelompok yang menunjukkan perbedaan signifikan.

G. Etika Penelitian

Penelitian ini tidak melibatkan manusia sebagai objek penelitian, sehingga aspek etika difokuskan pada penerapan prinsip bioetika dalam kegiatan laboratorium mikrobiologi. Penerapan biosafety dilakukan dengan mengikuti prosedur kerja yang aman untuk meminimalkan risiko kontaminasi, infeksi, dan kecelakaan kerja, serta melindungi peneliti, lingkungan, dan masyarakat. Selain itu, pengelolaan limbah biologis dilakukan sesuai prosedur yang berlaku melalui proses dekontaminasi sebelum pembuangan, untuk mencegah pencemaran dan dampak negatif terhadap lingkungan (Humairoh dkk., 2026).