

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menerapkan metode eksperimen murni (*true experimental*) dengan memanipulasi variabel bebas dan mengamati dampaknya pada variabel terikat. Desain yang digunakan adalah *posttest only control design*, di mana sampel dibagi secara acak menjadi dua kelompok: kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Kelompok eksperimen menerima perlakuan tertentu (X), sementara kelompok kontrol tidak. Hasil akhir dari kedua kelompok (O1 dan O2) kemudian diukur dan dibandingkan untuk melihat pengaruh perlakuan (Hardani dkk., 2020).

Tabel 3

Bentuk Rancangan Penelitian

Kelompok	Perlakuan	Posttest
R1 2%	X	O1
R2 4%	X	O2
R3 6%	X	O3
R4 8%	X	O4
R5 10%	X	O5
R6 etanol 70%	Kontrol X	O6
R7 levofloxacin 5 mcg	Kontrol X	O7

Keterangan :

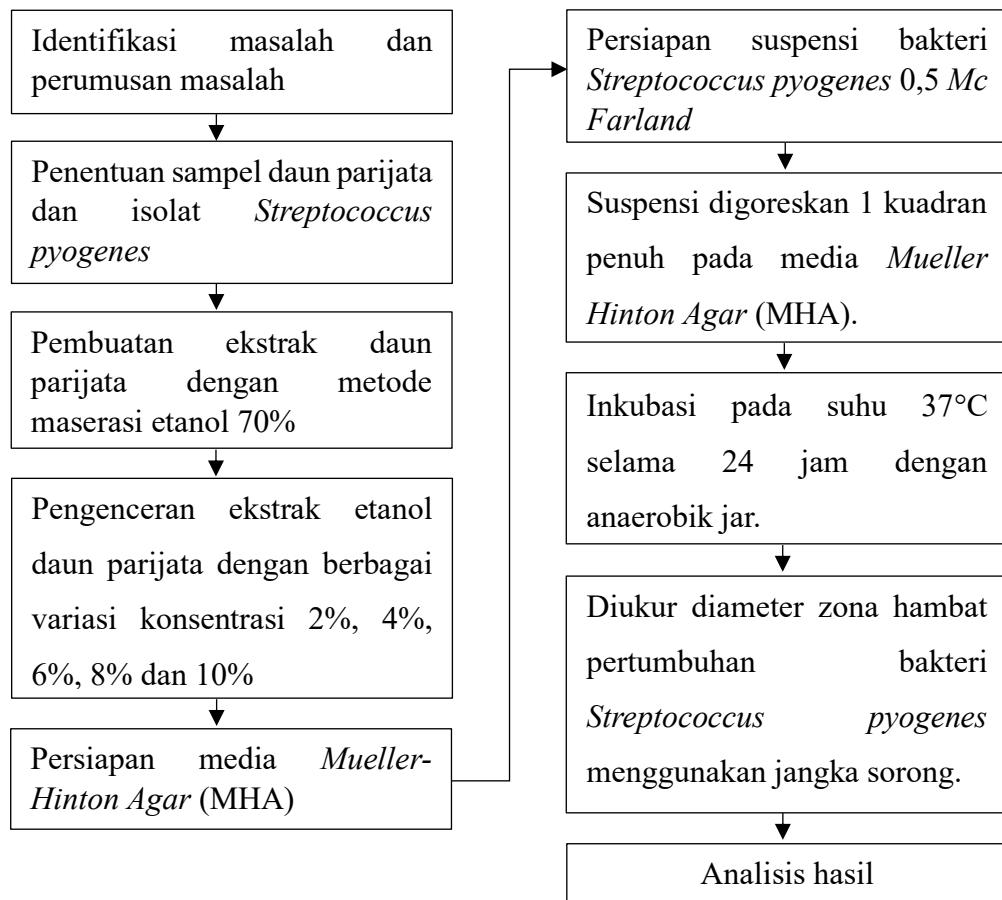
1. R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen yaitu ekstrak daun parijata dengan konsentrasi 2%.

2. R2 (Random 2) : Kelompok eksperimen yaitu ekstrak daun parijata dengan konsentrasi 4%.
3. R3 (Random 3) : Kelompok eksperimen yaitu ekstrak daun parijata dengan konsentrasi 6%.
4. R4 (Random 4) : Kelompok eksperimen yaitu ekstrak daun parijata dengan konsentrasi 8%.
5. R5 (Random 5) : Kelompok eksperimen yaitu ekstrak daun parijata dengan konsentrasi 10%.
6. R6 (Random 6) : Kelompok eksperimen yaitu kontrol negatif menggunakan etanol 70%.
7. R7 (Random 7) : Kelompok eksperimen yaitu kontrol positif menggunakan levofloxacin hemihydrate 5 mcg.
8. X (Exposure) : Perlakuan atau eksperimen.
9. O1 (Observasi 1) : Pengukuran zona hambat ekstrak daun parijata pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi 2%.
10. O2 (Observasi 2) : Pengukuran zona hambat ekstrak daun parijata pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi 4%.
11. O3 (Observasi 3) : Pengukuran zona hambat ekstrak daun parijata pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi 6%.
12. O4 (Observasi 4) : Pengukuran zona hambat ekstrak daun parijata pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi 8%.
13. O5 (Observasi 5) : Pengukuran zona hambat ekstrak daun parijata pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi 10%.

14.O6 (Observasi 6) : Pengukuran zona hambat ekstrak daun parijata pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada kontrol negatif.

15.O7 (Observasi 7) : Pengukuran zona hambat ekstrak daun parijata pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada kontrol positif.

B. Alur Penelitian



Gambar 4 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Lokasi penelitian mencakup Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO) milik Dinas Kesehatan Provinsi Bali dan Laboratorium Bakteriologi di

Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Kesehatan Kemenkes
Denpasar.

2. Waktu penelitian

Rangkaian penelitian dilaksanakan dalam periode Januari 2026 sampai April 2026, dimulai dari tahap perencanaan proposal hingga tahap penyelesaian penulisan skripsi.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Parameter yang dianalisis adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* setelah diberikan ekstrak etanol daun parijata pada lima level konsentrasi yang berbeda: 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%.

2. Sampel penelitian



Sumber : Dokumentasi Pribadi

Gambar 5 Sampel daun parijata (*Medinilla Speciosa Blume*)

Penelitian ini menggunakan ekstrak daun parijata sebagai sampel, dengan perlakuan lima tingkat konsentrasi berbeda (2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%) dan ditambahkan kontrol positif dan negatif. Pada kontrol positif yaitu bakteri *Streptococcus pyogenes* yang dilakukan induksi dengan antibiotik levofloxacin dan

pada kontrol negatif dilakukan induksi dengan pelarut etanol 70%. Sampel daun parijata yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Br. Munduk Lumbang, Desa Angsri, Kecamatan Baturiti, Kabupaten Tabanan, Provinsi Bali.

3. Jumlah dan besar sampel

Uji daya antibakteri tanaman parijata, ekstrak pekat (konsentrasi 100%) diencerkan dengan etanol 70% hingga diperoleh beberapa variasi konsentrasi: 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%. Kelompok kontrol menggunakan cakram yang telah dijenuhkan dengan etanol 70%. Dalam praktik laboratorium, percobaan perlu diulang beberapa kali guna meningkatkan ketelitian hasil. Semakin banyak pengulangan yang dilakukan, semakin tinggi tingkat ketelitian percobaan tersebut. Jumlah pengulangan yang tepat ditentukan dengan menerapkan rumus *Federer* (Hanifah, 1997).

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

Gambar 6 Rumus *Federer*

Keterangan :

t : Jumlah perlakuan

r : Jumlah ulangan

Perhitungan pengulangan :

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

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

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

$$6 r - 6 \geq 15$$

$$6 r \geq 15 + 6$$

$$r \geq 21 \div 6$$

$$r \geq 3,5 \longrightarrow \text{Dibulatkan} = 4$$

Berdasarkan perhitungan menggunakan rumus *Federer*, penelitian ini memerlukan empat kali pengulangan. Dalam perhitungan tersebut, jumlah perlakuan (t) digunakan untuk memperoleh nilai jumlah ulangan (r) dengan hasil minimal 3,5 sehingga ditetapkan empat ulangan. Penggunaan empat ulangan ini juga selaras dengan prinsip yang dijelaskan (Hanifah, 1997), di mana jumlah ulangan dapat ditentukan dengan rumus $(t-1)(r-1) > 15$. Dengan lima perlakuan dalam penelitian ini, empat ulangan telah memenuhi kriteria untuk menghasilkan estimasi kesalahan eksperimen yang cukup. Pengulangan dilakukan guna meningkatkan reliabilitas hasil, mengestimasi kesalahan percobaan, dan memastikan bahwa perbedaan yang teramati antar perlakuan benar-benar disebabkan oleh intervensi, bukan faktor acak. Dalam kondisi laboratorium yang homogen dan terkontrol dengan baik, empat ulangan dianggap memadai untuk mendukung validitas data yang diperoleh (Hanifah, 1997).

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini menggunakan empat kali pengulangan. Artinya, kelima perlakuan (konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%) serta kedua kontrol (positif dan negatif) masing-masing diuji sebanyak empat kali. Dari perhitungan ini, total sampel yang diperiksa adalah 20 untuk kelompok perlakuan dan 8 untuk kelompok kontrol.

a. Kriteria inklusi

Daun parijata (*Medinilla Speciosa Blume*) yang memenuhi syarat untuk diikutsertakan adalah daun ketiga sampai kelima dari pucuk cabang, yang dalam keadaan utuh, dan tidak berlubang.

b. Kriteria eksklusi

Daun yang dikeluarkan dari penelitian adalah daun parijata yang layu, berlubang, berjamur ditandai adanya bercak putih atau kehitaman, atau terdapat serangan hama yang menempel pada permukaannya.

4. Teknik pengambilan sampel

Pengambilan sampel dalam studi ini dilakukan dengan *purposive sampling*, yaitu pemilihan sampel berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi sesuai dengan tujuan penelitian (Sugiyono, 2020).

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer dan data sekunder. Data primer berupa hasil pengukuran zona hambat yang timbul akibat pemberian ekstrak daun parijata dengan berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Data sekunder yaitu informasi yang diperoleh dari sumber-sumber literatur ilmiah sebelumnya, data tersebut berupa laporan-laporan dinas kesehatan, riset kesehatan maupun penelitian terdahulu dan buku.

2. Teknik pengumpulan data

Data dikumpulkan secara kuantitatif melalui pengukuran diameter zona hambat dengan jangka sorong dalam eksperimen laboratorium. Tujuannya adalah untuk menguji pengaruh ekstrak etanol daun parijata terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*. Hasil yang didapatkan berupa nilai dalam milimeter (mm) yang menggambarkan tingkat daya hambat ekstrak terhadap bakteri.

3. Instrument pengumpulan data

Instrument pengumpulan data dalam penelitian ini adalah jangka sorong, alat tulis, kamera dan alat laboratorium.

F. Alat, Bahan dan Prosedur Kerja

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu neraca analitik, toples kaca, pipet ukur, pipet tetes, mikropipet, ball pipet, tabung *sampel cup*, gelas ukur, beaker glass, erlenmeyer, batang pengaduk, hotplate, magnetic stirrer, lampu spritus, korek api, cawan petri, anaerobik jar, biosafety cabinet, *Mc Farland* densitometer, ose steril, vortex, jangka sorong, incubator, autoclave, refrigerator dan corong.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: ekstrak daun parijata, akuades, etanol 70%, darah, biakan bakteri *Streptococcus pyogenes*, media pertumbuhan *Mueller Hinton Agar*, antibiotik Levofloxacin 5 mcg, cakram disk kosong, standar 0,5 *Mc Farland*, NaCl 0,9%, cotton swab, yellow tip, blue tip, lidi kupas steril, microtube, kertas saring, aluminium foil dan kapas.

3. Prosedur kerja

Prosedur kerja pada penelitian ini, sebagai berikut :

a. Pelaksanaan protokol kesehatan

Sebelum melakukan preparasi sampel, digunakan alat pelindung diri (APD) terlebih dahulu. Adapun APD yang digunakan yaitu masker, sarung tangan, dan jas laboratorium. Setelah menggunakan APD dan melakukan disinfeksi pada area kerja dengan menggunakan alkohol 70%.

b. Persiapan sampel

- 1) Pembuatan ekstrak kental daun parijata dilakukan melalui metode maserasi, mengacu pada prosedur kerja yang telah diterapkan oleh Setyowati dkk. (2023) dan Sugiarti dkk. (2018), dengan beberapa modifikasi yang disesuaikan oleh peneliti. Adapun tahapan prosedurnya adalah sebagai berikut :
 - a) Serbuk daun parijata ditimbang sebanyak 300 gram, kemudian dimasukkan ke dalam toples kaca.
 - b) Dilakukan maserasi dengan menambahkan 3 liter etanol 70% hingga seluruh serbuk terendam. Wadah ditutup, disimpan, dan dihindarkan dari cahaya matahari selama 3 hari (3x24 jam).
 - c) Setelah 3 hari, hasil maserasi disaring dan filtratnya ditampung dalam botol kaca. Residu yang tersisa dimaserasi ulang dengan penambahan 3 liter etanol 70%, kemudian disimpan kembali selama 3 hari dalam kondisi tertutup dan terhindar dari sinar matahari.
 - d) Hasil maserasi kedua disaring kembali dan filtratnya ditampung dalam wadah kaca.
 - e) Semua filtrat yang diperoleh digabungkan dan diproses lebih lanjut dengan evaporasi.
- 2) Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun parijata
 - a) Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%. Masing-masing konsentrasi dibuat dengan menimbang dan mengencerkan ekstrak pekat (100%) menggunakan pelarut etanol 70%. Proses pengenceran dilakukan dalam microtube dengan volume akhir 1 mL.
 - b) Variasi konsentrasi disiapkan dengan menghitung jumlah sampel stok yang diperlukan berdasarkan rumus yang ditetapkan.

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

Keterangan :

M_1 : Molaritas sebelum pengenceran (%)

M_2 : Molaritas setelah pengenceran (%)

V_1 : Volume sebelum pengenceran (ml)

V_2 : Volume setelah pengenceran (ml)

c) Pembuatan variasi konsentrasi uji adalah sebagai berikut :

- (1) Untuk konsentrasi 2%, campurkan 20 μ L ekstrak pekat daun parijata (100%) dengan 980 μ L etanol 70%, sehingga total volumenya 1 mL.
- (2) Untuk konsentrasi 4%, campurkan 40 μ L ekstrak pekat dengan 960 μ L etanol 70% hingga volume total 1 mL.
- (3) Untuk konsentrasi 6%, campurkan 60 μ L ekstrak pekat dengan 940 μ L etanol 70% hingga volume total 1 mL.
- (4) Untuk konsentrasi 8%, campurkan 80 μ L ekstrak pekat dengan 920 μ L etanol 70% hingga volume total 1 mL.
- (5) Untuk konsentrasi 10%, campurkan 100 μ L ekstrak pekat dengan 900 μ L etanol 70% hingga volume total 1 mL

d) Campurkan pada masing masing konsentrasi dihomogenkan dan disimpan.

3) Proses penjuanan berbagai konsentrasi ekstrak daun parijata dan kontrol ke dalam cakram kosong

a) Cakram kosong berdiameter 6 mm disiapkan. Sebanyak 20 μ L dari setiap variasi konsentrasi ekstrak etanol daun parijata dipipet dan ditetaskan ke atas cakram hingga seluruh cairan terserap dengan sempurna.

- b) Sebagai kontrol negatif, cakram kosong yang sama ditetesi dengan 20 μ L etanol 70%, yaitu pelarut yang digunakan dalam proses pengenceran.
 - c) Kontrol positif menggunakan cakram yang telah mengandung antibiotik Levofloxacin 5 mcg. Kontrol ini berfungsi sebagai pembanding jika kelompok perlakuan menunjukkan hasil positif (terbentuk zona hambat) serta untuk memastikan bahwa prosedur kerja dilakukan dalam kondisi steril.
- 4) Prosedur pembuatan media uji sensitivitas (*Mueller Hinton Agar*)
- a) Timbang 18,05 gram bubuk media *Mueller Hinton Agar* menggunakan neraca analitik.
 - b) Pindahkan bubuk media ke dalam Erlenmeyer dan larutkan dengan 475 mL akuades.
 - c) Panaskan media di atas hotplate sambil diaduk hingga tercampur rata.
 - d) Setelah larut sempurna dan homogen, ukur pH media menggunakan pH stick (pH optimal $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C).
 - e) Tutup mulut Erlenmeyer dengan kapas berlemak dan bungkus dengan aluminium foil.
 - f) Sterilkan media dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (dihitung sejak suhu 121°C tercapai).
 - g) Setelah sterilisasi, biarkan media hingga agak hangat (suhu sekitar $40\text{-}50^{\circ}\text{C}$).
 - h) Tambahkan 25 mL darah ke dalam media, lalu aduk perlahan hingga homogen.
 - i) Tuang media yang telah dicampur darah secara aseptik ke dalam cawan petri sebanyak 25 mL per cawan, kemudian diamkan hingga memadat.

j) Setelah media memadat, balik cawan petri. Jika tidak langsung digunakan, media dalam cawan petri atau sisa media dalam Erlenmeyer dapat dibungkus kertas buram dan disimpan di dalam lemari pendingin (*refrigerator*).

5) Pembuatan peremajaan bakteri *Streptococcus pyogenes*

- a) Siapkan media steril Mueller Hinton Agar + darah dan ose sekali pakai.
- b) Ambil koloni tunggal *Streptococcus pyogenes* dari biakan murni dengan ose.
- c) Goreskan secara merata menggunakan metode goresan 4 kuadran.
- d) Inkubasi media dalam anaerobik jar (posisi terbalik) pada inkubator 37°C selama 24 jam.

6) Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes*

- a) Ambil beberapa koloni *Streptococcus pyogenes* dari media peremajaan, lalu suspensikan ke dalam tabung berisi 5 mL NaCl 0,9% steril hingga diperoleh kekeruhan sesuai standar 0,5 *McFarland*.
- b) Kekeruhan suspensi bakteri dibaca dengan menggunakan *Mc Farland* densitometer. 0,5 *Mc Farland* setara dengan $1,5 \times 10^8$ (*Colony Forming Unit*) CFU/mL.

c. Tahap pemeriksaan

1) Tahap pemeriksaan uji daya hambat

Prosedur pemeriksaan uji daya hambat berdasarkan langkah kerja yang dilakukan oleh (Anggraini, 2021) yang disesuaikan dengan penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a) Lidi kapas steril disiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* 0,5 *McFarland*. Biarkan beberapa saat hingga suspensi meresap ke dalam kapas.

- b) Lidi kapas yang telah mengandung suspensi bakteri digoreskan secara merata pada seluruh permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA).
- c) Setelah inokulasi, masing-masing cakram yang telah dijenuhkan dengan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun parijata (2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%) serta kontrol negatif ditempelkan pada permukaan media dalam satu cawan yang sama. Tekan perlahan dengan pinset hingga cakram menempel sempurna.
- d) Cakram antibiotik Levofloxacin 5 mcg sebagai kontrol positif ditempelkan pada media MHA yang telah diinokulasi suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes*.
- e) Jarak antar cakram diatur sekitar 15 mm, dan cakram yang telah ditempelkan tidak boleh dipindah atau digeser.
- f) Cawan yang telah berisi cakram kemudian diinkubasi dalam posisi terbalik di dalam anaerobik jar pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam (Savitri dkk, 2019).

d. Pelaporan hasil

Diamati dan diukur diameter zona hambat *Streptococcus pyogenes* yang tampak pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada daerah bening di sekitar cakram (area tanpa koloni bakteri), yaitu dari satu tepi ke tepi lainnya melalui pusat cakram.

G. Pengolahan dan Analisis Data

Teknik pengolahan data dilakukan dengan mengumpulkan ukuran zona hambat ekstrak etanol daun parijata terhadap *Streptococcus pyogenes* dalam satuan milimeter (mm). Data tersebut dirangkum dalam tabel dan dijelaskan secara naratif. Analisis data menggunakan perangkat lunak SPSS dimulai dengan uji normalitas

menggunakan *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis berdistribusi normal atau tidak, di mana data berdistribusi normal jika nilai $p > 0,05$. Uji homogenitas dilakukan dengan *Levene* apakah varians data antar kelompok perlakuan bersifat homogen atau tidak, dan data dinyatakan homogen bila $p > 0,05$. Jika data memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas, analisis perbedaan dilakukan dengan *One Way ANOVA* diikuti uji Post Hoc LSD (*Least Significantly Difference*). Sebaliknya, jika data tidak berdistribusi normal, maka analisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.

H. Etika Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan menerapkan sikap ilmiah (*scientific attitude*) serta menggunakan prinsip-prinsip yang terkandung dalam etika penelitian, tidak semua penelitian memiliki risiko yang dapat merugikan atau membahayakan subjek penelitian tetapi peneliti tetap berkewajiban untuk mempertimbangkan aspek moralitas dan kemanusiaan subjek penelitian. Prinsip-prinsip tersebut diterapkan secara konsisten di seluruh tahapan, mulai dari perencanaan hingga penyelesaian (Masturoh dan Anggita, 2018).

1. Prinsip *beneficence*

Penelitian dirancang untuk memaksimalkan manfaat bagi subjek penelitian sekaligus meminimalkan risiko dan kerugian yang mungkin timbul. Oleh karena itu, desain penelitian harus memprioritaskan keselamatan dan kesehatan subjek penelitian.

2. Prinsip *non-maleficence*

Peneliti bertanggung jawab untuk memprediksi berbagai potensi kejadian yang mungkin timbul selama pelaksanaan penelitian, dengan tujuan utama mencegah terjadinya risiko yang dapat membahayakan subjek penelitian.