

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental murni (true experimental) yang lebih menekankan pada validitas internal, dengan cara mengendalikan pengaruh faktor pengganggu diluar penelitian (Auliya dkk., 2020). Desain penelitian yang diterapkan adalah *pretest-posttest with control group*. Dalam desain penelitian ini, peneliti melakukan pengukuran awal (O1) pada kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol, dan diikuti dengan intervensi atau perlakuan (X) pada kelompok eksperimen. Untuk menentukan pengaruh intervensi atau perlakuan yaitu dengan melakukan perbandingan antara hasil pengukuran pada kelompok yang diberikan perlakuan dengan hasil pengukuran pada kelompok control (Masturoh & Anggita T, 2018). Pemilihan kedua kelompok dilakukan 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 Grup*

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

Keterangan:

R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen yang terdiri atas berbagai variasi konsentrasi ekstrak daun singkil (*Premna serratifolia L*)

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 40 mg/2 mL 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.

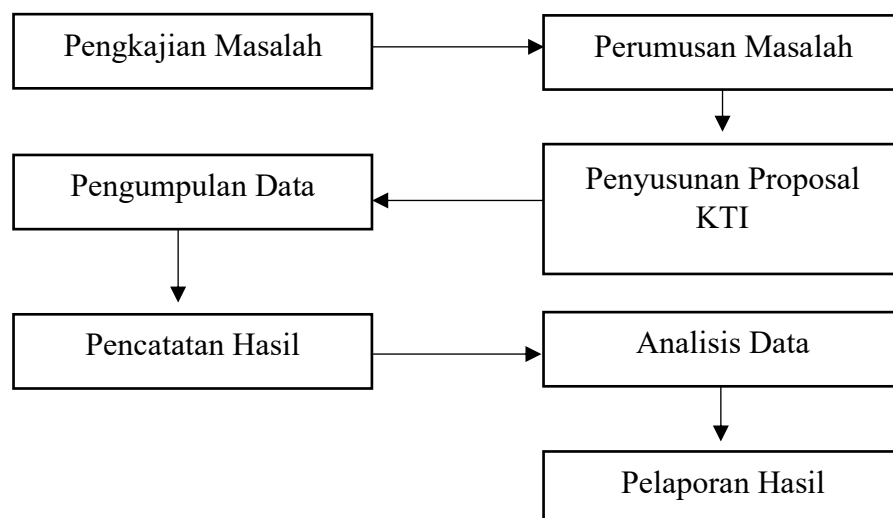
O2 (Observasi 2) : Nilai absorbansi R2 sebelum inkubasi.

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 3 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu pengambilan sampel daun singkil dilakukan di Desa Bitera, Kecamatan Bitera, Kabupaten Gianyar ($8^{\circ}31'57.7''\text{S}+115^{\circ}18'59.7''\text{E}$). Pembuatan ekstrak daun singkil 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 2025 hingga bulan April 2026.

D. Unit Analisis

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

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

singkil dilakukan dengan berbagai konsentrasi sebagai perlakuan, yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39% (Kowalska-krochmal & Dudek-wicher, 2021). Rentang konsentrasi yang dipilih berdasarkan standar penentuan konsentrasi dari CLSI M100 untuk mengidentifikasi Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Dalam penelitian ini terdapat kelompok kontrol yang meliputi larutan media *Muller Hinton Broth* (MHB) sebagai kontrol negatif, suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* 0,5 McFarland yang ditambah antibiotik gentamicin 40 mg/2 mL sebagai kontrol positif, dan media MHB sebagai kontrol media.

Jumlah minimal pengulangan yang diperlukan dalam percobaan laboratorium adalah tiga kali, untuk memastikan hasil yang diperoleh memiliki nilai akurasi pada tingkat tinggi maka pengulangan yang dilakukan harus lebih sering (Rori dkk., 2018). Dalam penelitian ini, setiap konsentrasi diuji dengan metode dilusi cair dan diukur dengan alat spektrofotometer UV-Vis dengan tiga kali pengulangan. Oleh karena itu, total data yang diperoleh adalah sebanyak 60 data yang terdiri dari 48 data dari perlakuan dan 12 data dari kontrol.

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 singkil, akuades steril, etanol 96%, biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, media *Mueller-Hinton Broth (MHB)*, *gentamicin 40 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 singkil

Pembuatan simplisia dan ekstrak daun singkil dengan metode maserasi sesuai prosedur yang dilakukan oleh (Priamsari & Nuraida, 2022). Adapun prosedur kerja pembuatan simplisia yaitu:

- a) Daun singkil dipetik secukupnya sesuai kebutuhan, lalu dicuci bersih dengan air mengalir.
- b) Proses rotasi basah dilakukan dengan memilih daun yang memenuhi kriteria inklusi sesuai dengan yang telah ditetapkan.
- c) Tiriskan daun singkil untuk mengurangi sisa air.
- d) Daun singkil yang sudah selesai ditiriskan kemudian dipotong dengan ukuran kecil dan ditimbang menggunakan neraca analitik untuk menentukan berat yang akurat.
- e) Daun singkil yang telah dipotong dan ditimbang, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.

- f) Dilakukan proses sortasi pada bahan untuk memisahkan bagian-bagian yang tidak sesuai dengan yang diinginkan.
 - g) Hancurkan bahan dengan blender atau mortal dan pestel hingga menjadi serbuk halus.
- 2) Pembuatan ekstrak daun singkil
- a) Serbuk simplisia halus dimasukkan ke dalam gelas *beaker* untuk dilarutkan.
 - b) Simplisia hasil ayakan ditimbang sebanyak 200 gram menggunakan neraca analitik, kemudian ditambahkan pelarut etanol hingga seluruh simplisia terendam.
 - 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 terendam seluruhnya. Wadah ditutup rapat dan terlindung dari paparan sinar matahari langsung selama tiga hari, sambil diaduk menggunakan batang pengaduk steril selama delapan jam setiap hari.
 - e) Semua filtrat yang diperoleh lalu digabungkan dan dievaporasi dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40–60 °C hingga diperoleh ekstrak kental.
 - f) Ekstrak kental yang diperoleh kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik untuk menentukan total massanya.

3) Pembuatan media *Mueller Hinton Broth* (MHB)

- a) Timbang media *Muller-Hinton Broth* (MHB) menggunakan timbangan analitik sebesar 4 gram.
- b) Setelah ditimbang, bubuk media dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan dilarutkan dengan menambahkan 190,5 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 pada 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 $\pm 40\text{--}50^{\circ}\text{C}$.
- f) Tuang media secara aseptik ke dalam tabung dengan volume ± 4 ml.
- g) Setelah suhu 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 Kausar (2024) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut:

- a) Diambil satu ose koloni *Staphylococcus aureus* dari biakan murni dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl 0,9% steril, kemudian dihomogenkan hingga mencapai konsentrasi setara dengan 0,5 McFarland.
- b) Kekeruhan suspensi bakteri diukur menggunakan densitometer McFarland, di mana konsentrasi 0,5 McFarland setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

b. Tahap pelaksanaan (analitik)

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

- 1) Siapkan 12 tabung reaksi steril dan beri label 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 singkil konsentrasi 100% ke dalam tabung pertama dan kedua.
- 3) Tambahkan 4 ml media cair *Muller-Hinton Broth* (MHB) ke dalam tabung nomor 2 sampai 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 bakteri sesuai standar 0,5 McFarland sebagai kontrol negatif (tanpa antibiotik atau ekstrak).
- 6) Tambahkan 8 mL *Muller-Hinton Broth* (MHB) ke dalam tabung 12 sebagai kontrol media (tanpa bakteri atau ekstrak).
- 7) Ambil 4 ml larutan dari tabung kedua, pindahkan ke tabung ketiga 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% sampai semua dilakukan dengan rasio pengenceran 1:2.
- 8) Tambahkan masing-masing 4 ml suspensi bakteri yang telah disetarakan (dengan standar McFarland) ke dalam tabung nomor 1 hingga 9.

- 9) Amati tingkat kekeruhan dan lakukan pengukuran awal menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 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 absorbansi kembali menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm, lalu catat hasil absorbansi setelah inkubasi.

c. Tahap akhir (*post-analitik*)

- 1) Lakukan pengamatan kekeruhan serta membandingkan 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).
- 3) Nilai absorbansi setelah inkubasi pada kelompok perlakuan dan kontrol negatif digunakan untuk menghitung persentase inhibisi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada setiap konsentrasi ekstrak. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan sebagai konsentrasi terendah ekstrak yang menunjukkan persentase inhibisi pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

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 singkil, 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 singkil terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* berupa data nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi yang digunakan untuk menghitung persen inhibisi pertumbuhan bakteri pada masing-masing konsentrasi ekstrak. Data tersebut selanjutnya dianalisis menggunakan metode tabulasi, yakni dengan penyajian dalam bentuk tabel serta uraian deskriptif.

2. Analisis Data

Data yang telah diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif kuantitatif. Konsentrasi Hambat Minimum yang telah diperoleh diklasifikasikan sesuai dengan tabel yang telah ditentukan sehingga dapat ditarik kesimpulan untuk menjawab rumusan masalah yang telah ditetapkan sebelumnya.

G. Etika Penelitian

Dalam penelitian ini, prinsip etika yang diterapkan meliputi *beneficence*, yaitu prinsip berbuat baik yang dapat memberikan manfaat dan mengurangi kerugian atau resiko pada subjek penelitian. Selain itu, diterapkan juga prinsip *non maleficence*, yaitu prinsip memperkirakan kemungkinan yang akan terjadi dalam penelitian agar tidak merugikan dan mencegah risiko yang berbahaya bagi subjek penelitian (Masturoh & Anggita T, 2018).