# BAB IV

# METODE PENELITIAN

## A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *True Experimental* dengan menggunakan rancangan penelitian yaitu *Posttest Only Control Group Design* yang bertujuan untuk mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Noor, 2011). Bentuk rancangan pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar berikut ini:

| Kelompok Uji | Perlakuan | Posttest |
|---|---|---|
| R1 | X | $O_2$ |
| R2 | | $O_2$ |

Gambar 4. Rancangan Penelitian *Posttest Only Control Group Design*

Keterangan:

R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen, dalam penelitian ini yaitu berbagai konsentrasi dari ekstrak daun juwet konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%.

R2 (Random 2) : Kelompok kontrol, dalam penelitian ini yang digunakan berupa cakram yang mengandung etanol 96%

X (Exposure) : Perlakuan (Intervensi)

02 (Observasi) : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

## B. Tempat dan Waktu Penelitian

### 1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Denpasar.

### 2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari s/d Mei 2019.

## C. Sampel Penelitian

### 1. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak daun juwet, yang diperoleh dari proses pengeringan dan penghalusan daun juwet menjadi simplisia dan diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol teknis 96%, dan dievaporasi sehingga diperoleh ekstrak pekat dengan konsentrasi 100%.

### 2. Kriteria sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak daun juwet yang diperoleh dari daun juwet dengan kriteria inklusi daun juwet segar, berbentuk bundar telur terbalik, berumur muda sampai sedang yang dipetik dari daun ketiga sampai keenam dari pucuk, berwarna hijau muda, tidak berlubang, tidak berjamur, memiliki panjang 7-16 cm, lebar 5-7 cm, sedangkan kriteria eksklusi yaitu, daun juwet yang tidak segar, layu, berwarna kuning kecoklatan, berlubang dan berjamur yang tidak sesuai dengan kriteria yang ditentukan peneliti.

### 3. Besar sampel penelitian

Dari proses ekstraksi didapatkan ekstrak daun juwet dengan konsentrasi 100% yang digunakan sebagai stok sampel. Ekstrak daun juwet diuji dengan 4

perlakuan konsentrasi yaitu menjadi variasi konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% (b/v) yang dibuat dengan melarutkan stok sampel menggunakan pelarut etanol teknis 96%. Untuk konsentrasi 20% massa ekstrak yang diperlukan yaitu 0,2 gram, konsentrasi 40% massa ekstrak yang diperlukan yaitu 0,4 gram, konsentrasi 60% massa ekstrak yang diperlukan yaitu 0,6 gram, dan konsentrasi 80% massa ekstrak yang diperlukan yaitu 0,8 gram. Sebagai kelompok kontrol, digunakan cakram yang telah dijenuhkan dengan etanol 96%.

Menurut Hanafiah, (2016) dalam penentuan pengulangan dapat dihitung berdasarkan jumlah konsentrasi yang digunakan dan jumlah kelompok kontrol. Dalam penelitian ini terdapat 4 pelakuan konsentrasi dan 1 perlakuan kontrol negatif. Total perlakuan dalam penelitian ini adalah 5 perlakuan. Dalam penelitian ini masing-masing perlakuan diulang dengan jumlah yang dapat ditentukan dari persamaan berikut (Hanafiah, 2016) :

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

Keterangan:

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

$(5 - 1)\ (r - 1) \geq 15$

$4(r - 1) \geq 15$

$4r - 4 \geq 15$

$4r \geq 19$

$r \geq 4{,}75$

$r \geq 5$ (pembulatan)

Berdasarkan perhitungan tersebut, pengulangan yang dapat dilakukan dalam penelitian ini adalah lebih dari atau sama dengan lima kali. Menurut Hanafiah, (2016) jumlah ulangan suatu perlakuan tergantung pada derajat ketelitian yang diinginkan oleh peneliti terhadap kesimpulan hasil percobaan. Semakin banyak jumlah pengulangan yang dilakukan, maka derajat ketelitian juga akan semakin tinggi.

Oleh karena itu, maka pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah lima kali, sehingga diperoleh jumlah data pemeriksaan sebesar 25 data. Syarat minimal jumlah pengulangan yang bisa dilakukan untuk percobaan laboratorium adalah cukup tiga kali pengulangan, maka pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini sudah memenuhi syarat (Hanafiah, 2016).

**4. Teknik pengambilan sampel**

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah *purposive sampling* dikarenakan sampel yang digunakan dipilih dan dipertimbangkan secara khusus sehingga layak dijadikan sampel (Noor,2011).

**5. Unit analisis**

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun juwet yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80% terhadap pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dan diameter zona yang terbentuk dalam kontrol, cakram disk yang mengandung etanol 96%. Konsentrasi ini dipilih untuk mengetahui konsentrasi yang paling efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus.*

## D. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu :

Blender (miyako) (1 buah), tabung vial (1 buah), tempayan (1 buah), neraca analitik (Radwag) (1 buah), pipet ukur (Iwaki- Pyrex®) 1 ml dan 10 ml (masing-masing 1 buah), mikropipet 20µl – 1000µl (secorex) (masing--masing 1 buah ) , ball pipet (b&n ballppipet) (1 buah), gelas ukur (Iwaki-Pyrex®) 250ml (1 buah), evaporator (Buchi I-300) (1buah), beaker glass (Iwaki-Pyrex®) 500 ml dan 1000 ml (masing-masing 1 buah),Erlenmeyer (Iwaki-Pyrex®) 250 mL dan 500 mL (masing-masing 1 buah) , tabung reaksi (Iwaki-Pyrex®) (12 buah), rak tabung reaksi (1 buah), ose (1 buah), hotplate (1 buah), magnetic stirer (1 buah), lampu spritus (1 buah), petridish steril (18 buah), biosafety cabinet (Biobase), Mc Farland densitometer (Biosan) (1 buah), jangka sorong (1 buah), inkubator (Esco) (1 buah), oven (Wagtech) dan autoclave (Tomy Sx- 500), refrigerator (1 buah).

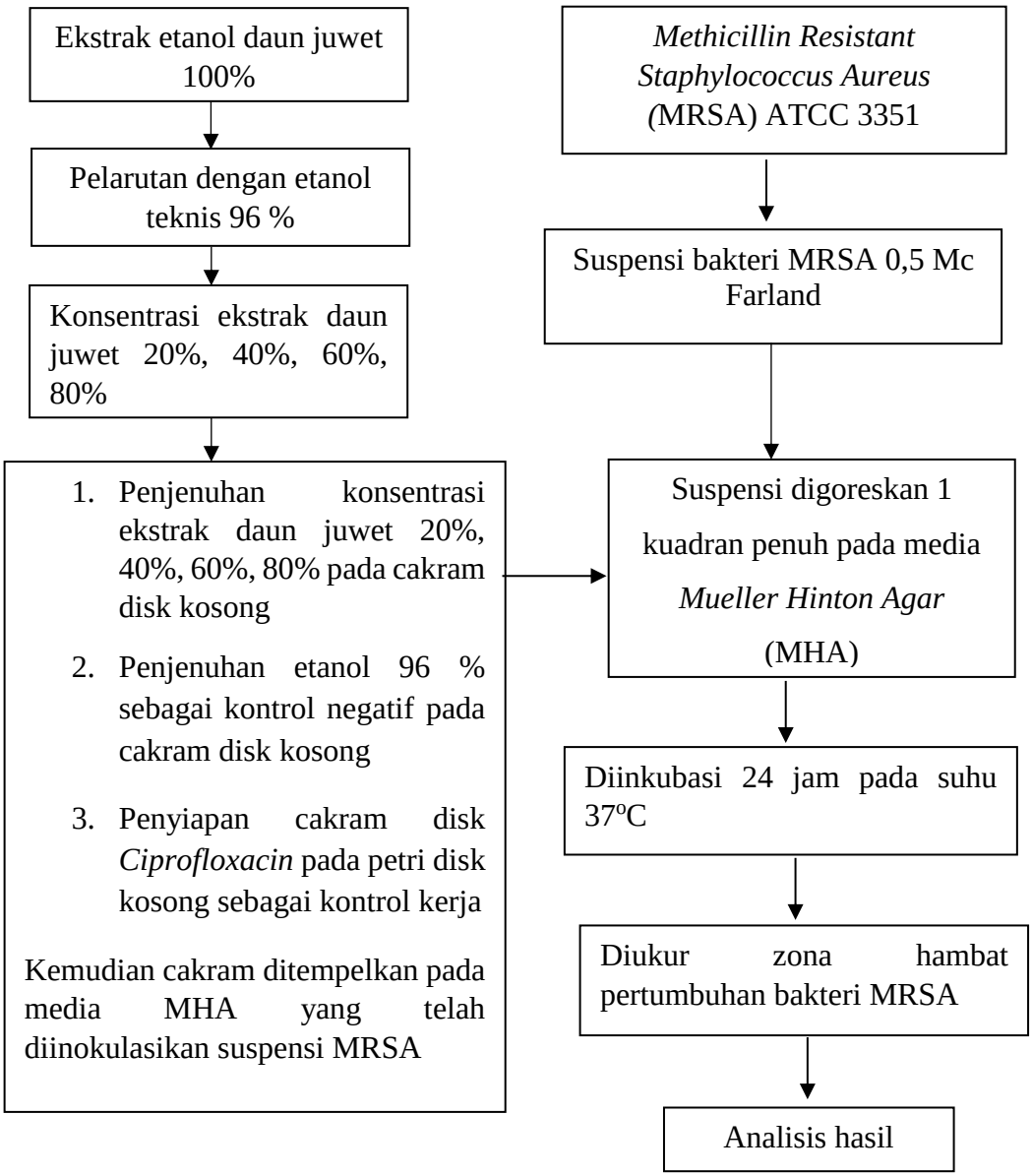
### 2. Bahan

Adapun bahan yang diperlukan yaitu daun juwet, Aquadest steril (Brataco) 1000 ml, Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* ATCC 3351, media MHA (oxoid), standar Mac Farland 0,5%, NaCl (Merk) fisiologis 0,9%, cakram kosong (32 buah), cakram antibiotik ciprofloxacin (10 buah), kertas saring, lidi kapas steril (1 buah), etanol teknis 96% (2000 ml), alumunium foil, kapas, dan tabung Eppendorf.

## D. Kerangka Kerja dan Prosedur kerja

### 1. Kerangka kerja

Kerangka kerja dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:




Gambar 5. Kerangka Kerja Uji Daya Hambat

**2. Prosedur kerja**

**a. Persiapan sampel**

**1) Pembuatan ekstrak daun juwet** dengan modifikasi metode maserasi menurut Kabbashi dkk (2015)

a) Daun juwet dipetik dari daun ketiga sampai keenam dari pucuk sebanyak 1,5 kg, pengambilan sampel dilakukan di Desa Tegal-Tugu, Gianyar, Bali.

b) Daun yang sudah dipetik kemudian dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci pada air mengalir.

c) Dilakukan proses sortasi basah, yaitu pemilihan daun berdasarkan kriteria yang ditentukan dalam penelitian.

d) Daun juwet ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.

e) Daun juwet dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan terhindar dari sinar matahari langsung.

f) Dilakukan proses sortasi pada bahan yang sudah kering. Tujuannya untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotoran-pengotoran lain yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering.

g) Simplisia tersebut kemudian dihaluskan dengan blender, kemudian diayak untuk memperoleh simplisia yang lebih halus dan mudah untuk dilarutkan.

h) Serbuk simplisia yang sudah halus, diuji kadar airnya dengan cara :

(1) Dipanaskan cawan porselen kosong dalam oven pada suhu 100-105$^{o}$C selama 1 jam

(2) Didinginkan dalam suhu ruang selama 10-20 menit

(3) Ditimbang cawan porselen kosong tersebut

(4) Dimasukkan sampel simplisia daun juwet sebanyak 1 gram ke dalam cawan porselen yang telah diketahui beratnya.

(5) Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105 $^{o}$C selama 1 jam

(6) Didinginkan di suhu ruang selama 10-20 menit

(7) Ditimbang lagi berat cawan porselen yang berisi sampel

(8) Dipanaskan kembali dalam oven sampai diperoleh berat yang konstan (selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,02 gram)

(9) Ditentukan kadar air pada sampel (*Drying Ratio*).

i) Serbuk simplisia hasil ayakan dengan kadar air < 10%, dimasukkan ke dalam gelas beker dan ditimbang menggunakan neraca analitik sebanyak 100 gram. Ditambahkan etanol teknis 96% sebanyak 1000 ml, hingga simplisia terendam sempurna. Ditutup rapat dan dibiarkan selama 7 hari terlindungi dari cahaya matahari sambil dibantu pengadukan menggunakan *magnetic stirer* selama 8 jam setiap harinya.

j) Sesudah 7 hari, hasil maserasi disaring, filtrat ditampung kedalam wadah (botol kaca). Residu dari penyaringan dimaserasi kembali dengan menambahkan etanol sampai simplisia terendam (±1000ml). Ditutup rapat dan dibiarkan selama 7 hari terlindungi dari cahaya matahari sambil dibantu pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* selama 8 jam setiap harinya.

k) Sesudah 7 hari, hasil maserasi kembali disaring dan filtratnya ditampung kedalam wadah (botol kaca).

l) Semua filtrate digabung dan diuapkan menggunakan evaporator ( suhu 40 –

$60^{O}C$ ) sampai didapatkan ekstrak kental.

m) Ekstrak kental ditimbang dengan neraca analitik untuk mengetahui massa total dari ekstrak yang diperoleh.

**2) Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak daun juwet**

a) Konsentrasi ekstrak daun juwet yang digunakan adalah 20%, 40%, 60% dan 80%. Masing-masing konsentrasi tersebut dibuat dengan cara penimbangan dan pengenceran ektsrak daun juwet pekat (konsentrasi 100%) dengan pelarut etanol 96%. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak dilakukan dalam tabung eppendorf dengan volume total 1ml.

b) Pelarutan dilakukan dengan pembuatan variasi konsentrasi ekstrak daun juwet menggunakan presentase perbandingan konsentrasi %b/v, melalui rumus berikut:

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

Keterangan:

% : variasi konsentrasi dalam satuan persen

b : massa ekstrak daun juwet (100%)

v : volume pengenceran

c) Perbandingan masing-masing konsentrasi dari ekstrak pekat (gram) dengan pelarut etanol teknis 96% (ml) adalah sebagai berikut : Adapun jumlah ekstrak daun juwet konsentrasi 100% yang diperlukan untuk masing-masing konsentrasi adalah:

(1) Konsentrasi 80% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,8 gram ekstrak daun juwet konsentrasi 100% dan ditambahkan etanol teknis 96% hingga

tanda batas 1 ml.

(2) Konsentrasi 60% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,6 gram ekstrak daun juwet konsentrasi 100% dan ditambahkan etanol teknis 96% hingga tanda batas 1 ml.

(3) Konsentrasi 40% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,4 gram ekstrak daun juwet konsentrasi 100% dan ditambahkan etanol teknis 96% hingga tanda batas 1 ml.

(4) Konsentrasi 20% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,2 gram ekstrak daun juwet konsentrasi 100% dan ditambahkan etanol teknis 96% hingga tanda batas 1 ml.

d) Campuran pada masing-masing konsentrasi dihomogenkan dan disimpan pada tabung Eppendorf.

**b. Pembuatan suspensi bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus***

1) Diambil koloni bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dari biakan murni dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl fisiologis 0,85%.

2) Suspensi dibandingkan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5%.

3) Suspensi diukur dengan menggunakan Mc Farland densitometer.

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

1) Bubuk media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 9,5 gram menggunakan neraca analitik dan setelah proses penimbangan bubuk media dipindahkan kedalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuadest sebanyak 250 mL (etiket media 38,0 g medium disuspensikan ke dalam satu L aquadest)

2) Medium dipanaskan selama satu menit pada hotplate sambil diaduk sampai serbuk benar-benar larut dan tercampur dengan sempurna
3) Setelah bubuk media larut sempurna dan homogen, diukur pH media dengan menggunakan pH stick (pH optimal 7,3 ± 0,1 pada suhu 25$^{o}$C)
4) Erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan aluminium foil
5) Media disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121$^{o}$C selama 15 menit dihitung dari tercapainya suhu 121 $^{o}$C
6) Media yang telah disterilisasi, didiamkan sampai suhu media turun menjadi ±40 - 50 $^{o}$C.
7) Tuangkan ke dalam cawan petri (*Plate*) masing-masing plate sebanyak sebanyak 15 ml, kemudian didiamkan hingga memadat
8) Setelah media memadat, cawan petri dibalik, dan apabila tidak langsung digunakan media yang sudah dituangkan pada cawan petri atau sisa media dalam tabung Erlenmeyer dapat dibungkus dengan kertas buram dan disimpan didalam refrigerator.

**d. Tahap pemeriksaan** (Vandeppite dkk., 2011).

1) Suspensi bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dengan kepekatan Mc Farland 0,5% dsiapkan
2) Swab kapas steril disiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah suspensi bakteri meresap, swab kapas steril diangkat dan diperas dengan cara menekankan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar
3) Swab kapas yang telah dicelupkan tadi disebar dengan cara digores-goreskan pada permukaan media MHA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan

goresan-goresan. Goresan dilakukan dengan merata hingga menutup seluruh permukaan media.

4) Media MHA didiamkan 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam.
5) Cakram *disk* kosong disiapkan dan cakram *disk* ini diteteskan 20µl masing-masing konsentrasi ekstrak daun juwet yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram *disk*
6) Masing-masing cakram yang telah jenuh dengan konsentrasi ekstrak daun juwet kemudian ditempelkan pada permukaan media MHA yang telah digoreskan suspensi bakteri dan sedikit ditekan dengan pinset sampai melekat sempurna
7) Cakram antibiotik *ciprofloxacin* yang berfungsi sebagai kontrol kerja dan cakram disk yang telah dijenuhkan dengan etanol 96% sebagai kontrol negatif ditempelkan pada media MHA
8) Atur jarak cakram ±15 mm antara cakram yang lainnya dan cakram yang sudah ditempelkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan ataupun digeser.
9) Media yang telah ditanami cakram diinkubasi di inkubator selama 24 jam dengan posisi terbalik pada suhu 37°C
10) Setelah diinkubasi diukur zona bening yang terbentuk dengan mistar dan dikonversi ke satuan mm (milimeter).

**e. Pelaporan hasil**

Hasil dilaporkan dengan cara mengukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* yang terjadi dalam media MHA. Diameter zona hambat yang diukur merupakan daerah bening pada cakram (tidak ada pertumbuhan bakteri) diukur dari sisi yang satu ke sisi yang lain melalui tengah-tengah cakram, yang terjadi pada setiap

konsetrasi dan pada kontrol negatif dan kontrol positif dengan menggunakan mistar dan dikonversi ke dalam satuan mm.

## E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

### 1. Jenis data

Jenis data yang dikumpulkan adalah data primer. Data primer meliputi data diameter zona hambat oleh ekstrak daun juwet dengan berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* melalui eksperimen laboratorium.

### 2. Teknik pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan teknik pengumpulan data secara observasi dan penelitian laboratorium menggunakan metode difusi cara *Kirby-Bauer*.

## F. Pengolahan dan Analisis Data

### 1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun juwet dengan berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* yang dinyatakan dalam satuan mm (millimeter) yang diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating dan naratif.

### 2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis kuantitatif, dilakukan dengan uji statistik menggunakan bantuan perangkat lunak komputer. Analisis data dilakukan dengan beberapa tahap, antara lain:

a) Untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak digunakan uji *kolmogorov smirnov*.

b) Untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dengan menggunakan ekstrak daun juwet antara konsenrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% digunakan uji *one way anova*.

c) Untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, uji statistik yang digunakan adalah LSD (*Least Significant Deference*).