

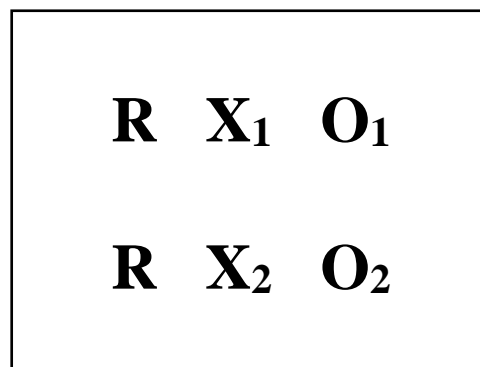
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *True Experimental*, dengan desain rancangan penelitian *Posttest Equivalent Groups Study*. Dalam jenis penelitian *Posttest Equivalent Groups Study* dilakukan pengacakan dan perbandingan dua kelompok. Setiap kelompok dipilih dan diberikan perlakuan secara acak. Kemudian dilakukan posttest pada setiap kelompok, selanjutnya hasil yang didapatkan dibandingkan untuk menentukan apakah ada perbedaan antara kedua kelompok (Heffner, 2014).

Adapun desain dalam penelitian ini dapat digambarkan seperti berikut:



(Heffner, 2014)

Gambar 5. Desain *Posttest Equivalent Groups Study*

Keterangan:

R = *Randomization* (pengelompokan sampel daun sirih secara acak)

X₁ = *Treatment 1* (diolah dengan metode rebusan)

X₂ = *Treatment 2* (diolah dengan metode maserasi)

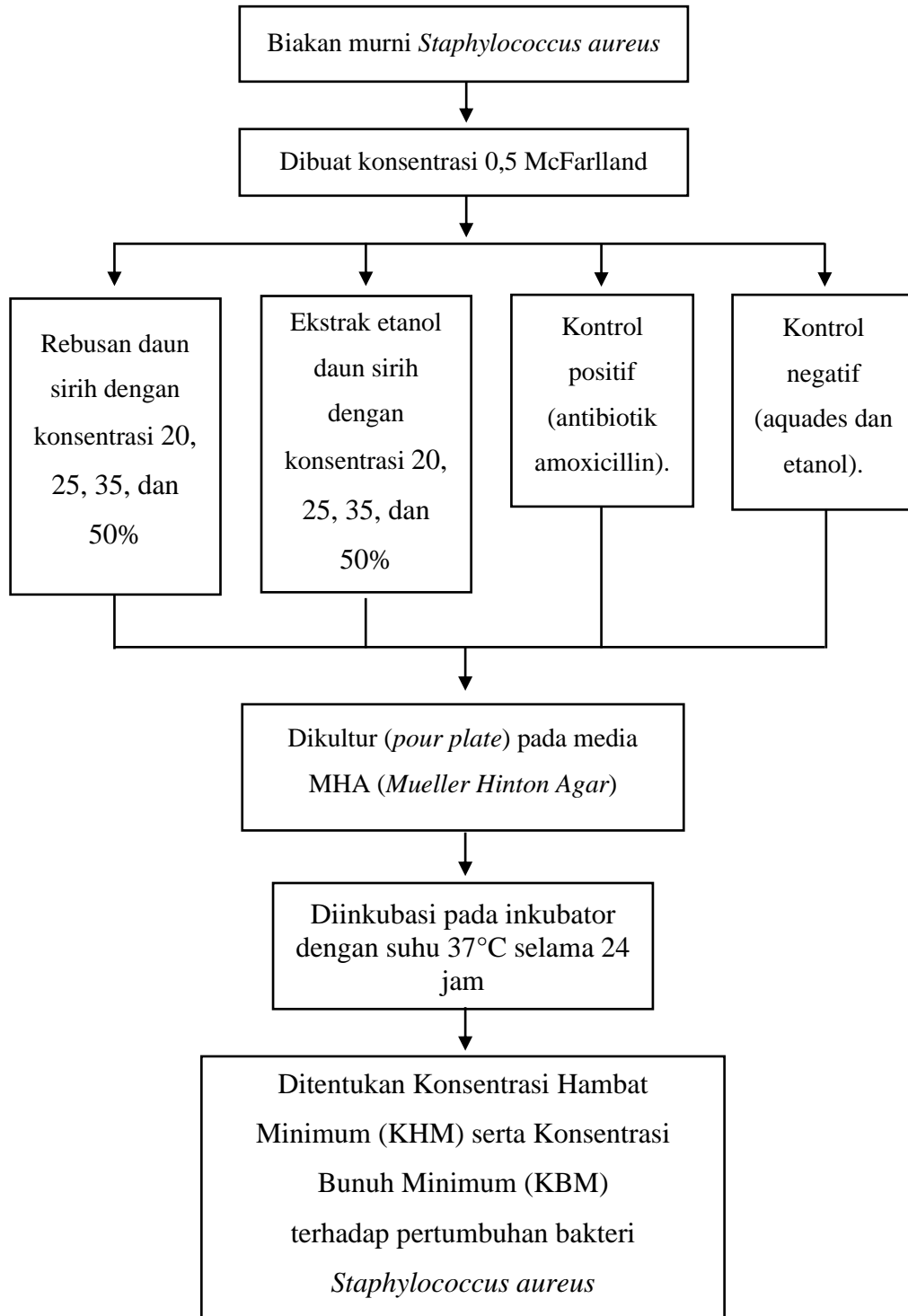
O₁ = *Posttest 1* (KHM dan KBM dari metode rebusan)

O₂ = *Posttest 2* (KHM dan KBM dari metode maserasi)

Desain ini dapat diartikan sebagai berikut, sampel daun sirih akan dibagi menjadi dua kelompok secara acak. Selanjutnya kelompok pertama akan diberikan perlakuan pertama yaitu, dengan diolah dengan metode rebusan, dan kelompok kedua diberikan perlakuan kedua yaitu, dengan diolah dengan metode maserasi. Kemudian dilakukan *posttest* pada masing-masing kelompok untuk mengetahui KHM dan KBM yang dihasilkan dari kedua perlakuan. Selanjutnya hasil kedua *posttest* tersebut dibandingkan untuk mengetahui apakah ada perbedaan antara kedua kelompok.

B. Alur Penelitian

1. Kerangka kerja uji aktivitas antibakteri



Gambar 6. Kerangka kerja

Keterangan kerangka kerja :

Bakteri *Staphylococcus aureus* dibuat suspensi dengan kekeruhan 0,5 McFarland (setara dengan $1,5 \times 10^8$ sel bakteri) yang diukur dengan alat densitometer, kemudian diambil sebanyak 0,5mL dan dicampurkan 0,5mL dari setiap variasi konsentrasi dari hasil rebusan serta maserasi, kontrol positif, dan kontrol negatif. Selanjutnya diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) serta Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil kemudian dianalisis dengan analisis statistik menggunakan aplikasi *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS).

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Adapun tempat dilaksanakannya penelitian ini yaitu di Laboratorium Bakteriologi dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari hingga April 2021.

D. Populasi dan Sampel

1. Sampel penelitian

Adapun sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil rebusan dan maserasi dari daun sirih (*Piper betle* L.). Rebusan dan maserasi etanol dari daun sirih (*Piper betle* L.) dibuat dengan konsentrasi yang sama yaitu 20, 25, 35, dan 50%.

2. Jumlah dan besar sampel

Untuk memastikan ketelitian dari suatu penelitian diperlukan adanya replikasi. Menurut Hanafiah (2016) replikasi adalah frekuensi suatu perlakuan yang diselidiki dalam suatu percobaan. Jumlah ulangan suatu perlakuan tergantung pada derajat ketelitian yang diinginkan oleh peneliti terhadap kesimpulan hasil percobaannya. Sebagai suatu patokan, jumlah ulangan dianggap telah cukup baik bila memenuhi persamaan berikut :

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

Gambar 7. Persamaan jumlah replikasi minimal.

Keterangan :

t = jumlah perlakuan

r = jumlah ulangan

Sehingga untuk menentukan jumlah pengulangan dalam penelitian ini digunakan persamaan sebagai berikut :

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

$$(4 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$3(r - 1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan maka diketahui pada penelitian ini diperlukan minimal pengulangan enam kali pada setiap variasi sampel. Namun dikarenakan keterbatasan waktu, dan alat, maka dalam penelitian ini digunakan tiga kali pengulangan. Karena dengan tiga kali pengulangan sudah cukup untuk dapat

meminimalisir kemungkinan kesalahan data dalam penelitian (Hanafiah, 2016). Sehingga didapatkan jumlah sebesar 24 sampel yang dibutuhkan.

3. Teknik pengambilan sampel.

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah *purposive sampling*, karena sampel yang diambil harus memenuhi kriteria-kriteria tertentu yang telah disesuaikan dengan kebutuhan peneliti. Dimana bahan dari rebusan dan maserasi daun sirih (*Piper betle* L.) didapatkan dari daun sirih dengan kriteria inklusi daun sirih yang berwarna hijau tua, dipetik mulai dari daun ke-3 setelah pucuk sampai ke-5, sedangkan untuk kriteria eksklusi, yaitu daun yang layu, dan rusak akibat hama.

4. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) serta Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari metode maserasi dan rebusan daun sirih (*Piper betle* L.) dengan variasi konsentrasi 20, 25, 35, dan 50% terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Konsentrasi ini dipilih karena mengacu pada penelitian sebelumnya, salah satunya penelitian yang dilakukan Purwantiningsih, Haumein dan Presson (2020) menyatakan rebusan daun sirih (*Piper betle* L.) dengan konsentrasi 50% efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Begitu juga untuk ekstrak etanol daun sirih, dimana hasil penelitian Effa dan Puetri (2015) menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak etanol daun sirih 25% cukup efektif untuk digunakan sebagai zat antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibiotik *amoxicillin*.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer. Dimana data primer merupakan data yang diperoleh melalui pengamatan langsung oleh peneliti. Dalam penelitian ini data primer tersebut meliputi data KHM dan KBM dari pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dari hasil rebusan dan maserasi daun sirih (*Piper betle* L.).

2. Cara pengumpulan data

Cara pengumpulan data yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan melakukan observasi. Dilakukan penentuan KHM dan KBM dari pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dari hasil rebusan dan maserasi daun sirih (*Piper betle* L.).

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data pada penelitian ini adalah alat tulis, kamera, dan alat instrumen laboratorium.

4. Alat dan Bahan

a. Alat

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut, autoclave (Tomy ES-215) (1 buah), ball pipet (b&n ball pipet) (1 buah), beaker glass (Iwaki-Pyrex[®]) 500mL dan 1000mL (masing-masing 1 buah), biosafety cabinet (Biobase) (1 buah), blender (1 buah), Erlenmeyer (Iwaki-Pyrex[®]) 1000mL (masing-masing 1 buah), evaporator (Buchi I-300) (1 buah), gelas ukur (Iwaki-Pyrex[®]) 250mL (1 buah), *hotplate* (1 buah), inkubator (*Esco Isotherm*) (1 buah), lampu spiritus (1 buah), magnetic stirrer (1 buah), McFarland densitometer

(Biosan) (1 buah), mikropipet 1000 μ l (secorex) (masing--masing 1 buah), neraca analitik (Radwag) (1 buah), oven (Wagtech), ose (1 buah), petridish steril (30 buah), pipet ukur (Iwaki-Pyrex[®]) 1mL dan 10mL (masing- masing 1 buah), rak tabung reaksi (1 buah), tabung reaksi (Iwaki-Pyrex[®]) (2 buah), saringan, dan tabung vial (4 buah).

b. Bahan

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut, alkohol 70%, aluminium foil, aquades 1000mL, bakteri *Staphylococcus aureus*, daun sirih (*Piper betle* L.) 1kg, Etanol 96%, media *Muller Hinton Agar*, NaCl fisiologis 0,85%, standar McFarland 0,5, tabung Eppendorf (4 buah), blue tip (4 buah).

5. Prosedur kerja

a. Pengambilan sampel daun sirih (Rivai, Nanda dan Fadhilah, 2017 yang telah dimodifikasi).

- 1) Memilih tempat untuk pengambilan sampel daun sirih.
- 2) Mengambil daun sirih yang sesuai kriteria yang telah ditentukan.
- 3) Pengambilan sampel diambil pada saat siang hari (dari jam 10 sampai jam 12).
Daun diambil secara langsung tanpa menggunakan alat khusus. Dan daun sirih diambil dengan memperhatikan kriteria inklusi dan eksklusi.
- 4) Hingga diperoleh sebanyak satu kilogram.
- 5) Selanjutnya daun dibersihkan dari kotoran dengan air bersih, sembari dipilih daun yang sesuai kriteria yang telah ditentukan.
- 6) Lalu ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.

- b. Pembuatan rebusan daun sirih (Purwantiningsih, Haumein dan Presson, 2020 yang telah dimodifikasi)
- 1) Daun dicuci hingga bersih lalu dipotong kecil-kecil untuk memudahkan saat perebusan.
 - 2) Dilakukan penimbangan dan selanjutnya dibuat air rebusan sirih dengan konsentrasi 20, 25, 35, dan 50% (berat/volume).

Tabel 2
Berat Sampel Untuk Setiap Variasi Konsentrasi Rebusan

No.	Konsentrasi (%)	Berat Sampel Daun Sirih (g)
1	50	50
2	35	35
3	25	25
4	20	20

- 3) Setiap konsentrasi rebusan yang berbeda dimasukkan ke dalam empat Erlenmeyer berbeda dan kemudian masing-masing Erlenmeyer ditambahkan aquades hingga 100mL.
 - 4) Daun direbus pada suhu 90°C selama 45 menit menggunakan *hotplate*, terhitung mulai suhu mencapai 90°C.
 - 5) Untuk mengurangi penguapan minyak atsiri dapat dilakukan dengan cara menutup botol Erlenmeyer selama proses perebusan.
 - 6) Setelah dingin, rebusan daun sirih kemudian disaring dengan kertas saring.
- c. Pembuatan simplisia (Rivai, Nanda dan Fadhilah, 2017 yang telah dimodifikasi)
- 1) Daun sirih dikeringkan dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena matahari langsung, sampai daun menjadi kering, kurang lebih selama 3 minggu.
 - 2) Bahan yang sudah kering kemudian ditimbang

- 3) Setelah daun benar-benar kering, daun dihancurkan dengan alat blender, kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk halus.
 - 4) Serbuk simplisia ditimbang dan diuji kadar airnya hingga berada dibawah 10% (BPOM, 2014).
- d. Pengujian kadar air (Kumesan, Pandey dan Lohoo, 2017)
- 1) Cawan porselen dipanaskan dengan oven selama 1 jam dengan suhu 105°C. kemudian didinginkan selama 15 menit dan ditimbang beratnya, sehingga didapatkan A gram.
 - 2) Sampel ditimbang sebanyak 1 gram dan ditaruh dalam cawan porselen yang telah diketahui beratnya sehingga didapatkan B gram.
 - 3) Sampel dalam porselen ini kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampel konstan selama 3 jam, selanjutnya didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang sehingga didapatkan C gram.
 - 4) Penimbangan akan terus dilakukan hingga diperoleh berat yang konstan. Rumus perhitungan kadar air yaitu:

$$Kadar\ air = \left(\frac{B - C}{B - A} \right) \times 100\%$$

Kumesan, Pandey dan Lohoo, 2017

Gambar 8. Persamaan uji kadar air

Keterangan :

A = Berat kering cawan (g)

B = Berat kering cawan dan sampel awal (g)

C = Berat kering cawan dan sampel setelah dikeringkan (g)

- e. Maserasi (Nuralifah dkk., 2019 yang telah dimodifikasi)
- 1) Simplisia daun sirih ditimbang sebanyak 150 gram dan ditambahkan etanol 3000mL ke dalam beaker glass dan ditutup dengan aluminium foil.
 - 2) Maserasi dilakukan selama 3 hari (dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* 6 jam/hari).
 - 3) Setelah 3 hari kemudian simplisia dari pelarutnya disaring menggunakan kertas saring.
 - 4) Selanjutnya dilakukan proses remaserasi (maserasi kembali) selama 3 hari (dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* 6 jam/hari).
 - 5) Setelah 3 hari simplisia dari pelarutnya kembali disaring menggunakan kertas saring.
 - 6) Setelah proses maserasi, dilakukan pemekatan (evaporasi).
- f. Evaporasi filtrat (Fannani dan Nugroho, 2014 yang telah dimodifikasi)
- 1) Filtrate dari maserasi dituangkan ke labu penampung pada alat evaporator
 - 2) Proses evaporasi dilakukan dengan kondisi suhu water bath 50°C. Hasil ekstraksi daun sirih yang dihasilkan ditampung pada tabung vial yang telah disiapkan dan kemudian ditimbang berat bersih ekstrak.
- g. Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol daun sirih
- 1) Disiapkan empat tabung reaksi
 - 2) Ekstrak etanol 50% dibuat menyiapkan 2,5g ekstrak pekat daun sirih kedalam tabung reaksi I.
 - 3) Ekstrak etanol 35% dibuat menyiapkan 1,75g ekstrak pekat daun sirih kedalam tabung reaksi II.

- 4) Ekstrak etanol 25% dibuat menyiapkan 1,25g ekstrak pekat daun sirih kedalam tabung reaksi III.
 - 5) Ekstrak etanol 20% dibuat menyiapkan 1g ekstrak pekat daun sirih kedalam tabung reaksi IV.
 - 6) Selanjutnya setiap tabung ditambahkan etanol hingga 5mL, dan dihomogenkan.
- h. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (Hidayat, 2018 yang telah dimodifikasi)
- 1) Ditimbang sebanyak 19,08 gram medium dan ditambahkan sebanyak 250mL aquades (dari perbandingan pada etiket media yaitu, 38,0g medium disuspensikan ke dalam satu liter aquades).
 - 2) Medium dipanaskan selama pada *hotplate* sambil diaduk sampai serbuk benar-benar larut dan tercampur dengan sempurna.
 - 3) Masukkan ke dalam Erlenmeyer untuk disterilisasi di dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan satu sampai dua atm.
 - 4) Setelah selesai, keluarkan dari autoclave dan tunggu hingga agak dingin \pm suhu 40-45°C.
 - 5) Tuangkan ke dalam cawan petri (*plate*) masing-masing *plate* sebanyak 15mL.
- i. Pembuatan suspense *Staphylococcus aureus* (Wijayanti dan Safitri, 2018 yang telah dimodifikasi)
- 1) Satu sampai tiga ose koloni *Staphylococcus aureus* dari biakan murni diambil dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5mL larutan NaCl fisiologis 0,85%.
 - 2) Suspensi ini dibandingkan dengan kekeruhan standar 0,5 McFarland menggunakan alat densitometer.

j. Pengujian Dilusi Agar (CLSI, 2012 yang telah dimodifikasi)

- 1) Diambil 0,5 ml bahan uji tiap konsentrasi dicampur dengan 0,5 ml suspensi bakteri, dimasukkan ke dalam petri dish steril.
- 2) Dituangkan sebanyak 20 ml media MHA ke dalam petri dish tersebut, dihomogenkan, dibiarkan memadat 15-30 menit. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 3) Diamati pertumbuhan koloni bakteri pada media MHA.

k. Pelaporan hasil

Setelah inkubasi selama 24 jam diamati pertumbuhan koloni pada petridish, dan ditentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). KHM adalah kadar bahan uji terendah yang masih menunjukkan pertumbuhan ketika ditanam dalam cawan agar. Sedangkan KBM adalah kadar bahan uji terendah yang sama sekali tidak menunjukkan adanya pertumbuhan ketika ditanam dalam cawan agar.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Data yang diperoleh melalui penelitian langsung di dalam laboratorium, kemudian data tersebut diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating (data disajikan dalam bentuk tabel) dan narasi (deskriptif).

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis kuantitatif. Kegiatan analisis data dalam penelitian kuantitatif meliputi pengolahan dan penyajian data, melakukan berbagai perhitungan untuk mendeskripsikan data, serta melakukan analisis untuk menguji hipotesis. Perhitungan dan analisis data

kuantitatif dilakukan menggunakan teknik statistik dilakukan dengan memakai uji statistic menggunakan bantuan perangkat lunak komputer (*software*) *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS). Analisis data dilakukan dengan beberapa tahap, antara lain :

a. Uji normalitas

Uji Normalitas merupakan uji statistika yang dilakukan dengan tujuan untuk menilai sebaran data pada sebuah kelompok data atau variabel, apakah sebaran data tersebut berdistribusi normal ataukah tidak. Pada penelitian ini, digunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Metode *Shapiro-Wilk* adalah metode uji normalitas yang efektif dan valid digunakan untuk sampel berjumlah kecil (kurang dari 50).

b. Uji homogenitas

Uji homogenitas adalah pengujian yang berkaitan dengan sama tidaknya variasi-variasi dua buah distribusi atau lebih. Uji homogenitas hanya digunakan pada uji parametris yang menguji perbedaan antara kedua kelompok atau beberapa kelompok yang memiliki subjek atau sumber data yang berbeda. Oleh karena itu, uji homogenitas diperlukan sebagai asumsi dari uji *independent t test*. Uji *Levene's test* adalah salah satu jenis uji homogenitas yang bisa digunakan dalam penelitian ini, karena *Levene's Test* memiliki tujuan utama untuk mengetahui perbedaan dari dua kelompok data dengan varians yang berbeda. Dimana nantinya hasil perhitungan dari tes ini akan menunjukkan nilai signifikansi (p) dari dua kelompok data yang berbeda.

c. Uji Kruskal Wallis

Uji Kruskal Wallis (*Kruskal Wallis one-way analysis of variance by ranks*) merupakan teknik statistika nonparametrik yang bertujuan untuk menguji hipotesis

awal bahwa beberapa contoh berasal dari populasi yang sama atau identik. Uji Kruskal Wallis digunakan untuk rancangan acak lengkap. Berdasarkan uji normalitas dan homogenitas, didapatkan hasil yaitu data yang diperoleh dari penelitian tidak berdistribusi normal, dan tidak homogen, hal ini menyebabkan data yang ada tidak bisa diuji dengan uji ANOVA dan uji LSD (*Least Significance Different*). Sehingga uji Kruskal Wallis adalah uji yang paling tepat untuk digunakan karena tidak membutuhkan data yang berdistribusi normal dan homogen.