

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Penelitian dilakukan dengan jenis *true experiment* dengan rancangan penelitian *Posttest Only Control Design* dengan desain *true experimental* (eksperimen yang sesungguhnya), penelitian ini memiliki kendali penuh terhadap variabel-variabel luar yang berpotensi memengaruhi hasil penelitian. Oleh karena itu, validitas internal atau mutu pelaksanaan rancangan penelitian dapat terjaga dengan baik. Sampel yang digunakan dalam eksperimen ini dibagi kedalam dua kelompok, dengan kelompok eksperimen diberi perlakuan dan kelompok kontrol tidak diberi perlakuan. Pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen diukur dengan cara dibandingkan dengan kelompok kontrol (Hardani, dkk., 2020).

Berikut merupakan bentuk rancangan pada penelitian ini :

**Tabel 1**  
***Posttest Only Control Design***

Kelompok Uji	Perlakuan	Posttest
R <sub>1</sub>	X	O <sub>1</sub>
R <sub>2</sub>		O <sub>2</sub>

Keterangan :

R<sub>1</sub> : Kelompok eksperimen (konsentrasi ekstrak 15, 30, 45, 60, 75, dan 90%)

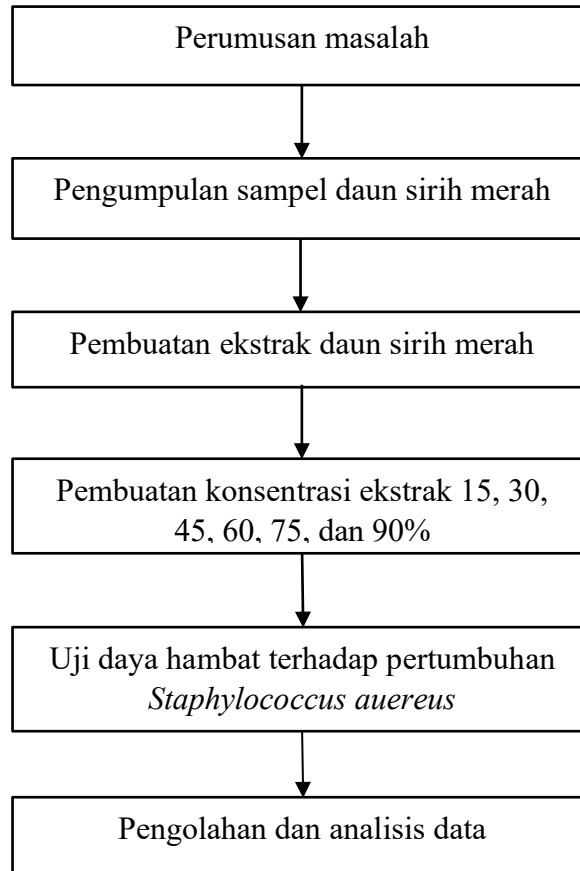
R<sub>2</sub> : Kelompok kontrol (etanol 96% dan *Chloramphenicol* 30 mcg)

X : Perlakuan atau *experiment*

O<sub>1</sub> : Diameter zona hambat bacteria *Staphylococcus aureus* pada R<sub>1</sub>

O<sub>2</sub> : Diameter zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* pada R<sub>2</sub>

## B. Alur Penelitian



**Gambar 5 Alur Penelitian**

## C. Tempat dan Waktu Penelitian

### 1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Dasar, Laboratorium Kimia Terapan, serta Laboratorium Bakteriologi yang berada dibawah naungan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Denpasar.

### 2. Waktu penelitian

Pelaksanaan penelitian ini berlangsung dari bulan Februari hingga Mei 2025.

## **D. Populasi dan Sampel**

### **1. Unit analisa**

Dalam penelitian ini, unit analisis yang digunakan adalah ukuran diameter zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada setiap variasi konsentrasi ekstrak daun sirih merah, yang meliputi beberapa tingkat konsentrasi 15, 30, 45, 60, 75, dan 90%.

### **2. Jumlah dan besar sampel**

Penelitian aktivitas antibakteri daun sirih merah dilakukan dengan menggunakan ekstrak kental yang diencerkan menggunakan etanol 96% dalam proporsi tertentu, sehingga diperoleh variasi konsentrasi sebesar 15, 30, 45, 60, 75, dan 90%. Dalam penelitian ini, cakram kertas (*disk*) yang telah dijenuhkan dengan etanol 96% dan *Chloramphenicol* 30 mcg digunakan sebagai kelompok kontrol. Dibutuhkan 9,45 gram ekstrak daun sirih merah untuk membuat konsentrasi 15, 30, 45, 60, 75, dan 90%.

Dalam setiap percobaan laboratoium, penting untuk Pengulangan dalam setiap pengujian dilakukan untuk meningkatkan ketelitian dan memastikan keandalan hasil percobaan. Tingkat akurasi dan presisi data akan meningkat seiring dengan bertambahnya jumlah pengulangan yang dilakukan. Jumlah pengulangan pada penelitian ini didasarkan oleh rumus yang dikemukakan Federer, guna memastikan keakuratan hasil (Indratama dan Yenita, 2019).

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

Keterangan:

t : Jumlah perlakuan

n : Jumlah pengulangan

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

$$(8 - 1)(n - 1) \geq 15$$

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 15 + 7$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq \frac{22}{7}$$

$$n \geq 3,14$$

Jumlah perlakuan yang dilakukan yaitu sebanyak delapan perlakuan, antara lain enam perlakuan di kelompok eksperimen terdiri atas enam perlakuan, sementara kelompok kontrol terdiri atas dua perlakuan. Berdasarkan persamaan Federer, jumlah perlakuan (t) dimasukkan ke dalam rumus untuk menentukan jumlah pengulangan (n), yang menghasilkan nilai  $\geq 3,14$ . Oleh karena itu, jumlah pengulangan dalam uji daya hambat ditetapkan sebanyak tiga kali. Oleh karena itu, jumlah data yang terkumpul terdiri dari 18 data pada kelompok eksperimen dan 6 data pada kelompok kontrol.

### **3. Kriteria Sampel**

#### **a. Kriteria inklusi**

Kriteria inklusi daun sirih merah yang digunakan dalam penelitian ini dipilih berdasarkan kriteria kesegaran, yakni hanya menggunakan daun yang masih dalam kondisi segar, diambil mulai dari pangkal hingga daun kelima dari ujung pucuk tanaman. Daun harus utuh tanpa lubang, berwarna hijau kemerahan.

## **b. Kriteria eksklusi**

Daun sirih merah yang tidak memenuhi syarat penelitian ini adalah daun yang menunjukkan tanda-tanda layu, kering, berwarna kuning atau coklat, dan yang memiliki kerusakan pada daunnya.

## **E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data**

### **1. Jenis data**

#### **a. Data primer**

Data primer pada penelitian ini mencakup hasil identifikasi senyawa fitokimia serta ukuran diameter zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, yang diperoleh melalui pengujian ekstrak daun sirih merah pada berbagai tingkat konsentrasi.

#### **b. Data sekunder**

Data sekunder pada penelitian ini diperoleh dari studi sebelumnya yang menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum* L.) memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

### **2. Teknik pengumpulan data**

Dua metode digunakan dalam pengumpulan data pada penelitian ini. Pertama, metode pengumpulan data secara kualitatif yang bertujuan untuk menganalisis kandungan fitokimia pada ekstrak daun sirih merah. Kedua, metode pengumpulan data bersifat kuantitatif, dilakukan melalui proses pengukuran dalam eksperimen laboratorium untuk menguji aktivitas hambat ekstrak terhadap bakteri, menggunakan pendekatan metode difusi Kirby Bauer (Hudzicki, 2016). Setiap konsentrasi diukur

diameter zona hambatnya dengan bantuan jangka sorong, kemudian dicatat dalam ukuran milimeter. Dengan menggunakan kedua metode ini, penelitian bertujuan untuk mendapatkan data yang akurat dan menyeluruh.

### **3. Instrumen pengumpul data**

#### **a. Alat**

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi berbagai instrumen laboratorium, antara lain blender, toples, neraca analitik, pipet ukur (1 ml dan 10 ml), mikropipet 1000  $\mu$ l, ball pipet, gelas ukur 250 ml, evaporator, erlenmeyer (50 ml, 500 ml, dan 1000 ml), tabung reaksi beserta raknya, ose, hotplate, *magnetic stirrer*, lampu spiritus, *yellow dan blue tip*, *biosafety cabinet*, *densitometer McFarland* (Biosan), oven, jangka sorong, inkubator, pipet tetes, autoklaf, serta inkubator

#### **b. Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daun sirih merah segar sebanyak 1,5 kg sebagai sampel utama, kain kasa steril, kultur bakteri *Staphylococcus aureus* strain ATCC, media pertumbuhan Muller Hinton Agar (MHA), 21 cakram *dish* kosong, 3 cakram antibiotik *Chloramphenicol* 30 mcg sebagai kontrol positif, tabung urine, 24 *petri dish* sekali pakai, *yellow dan blue tip*, *cotton swab* steril, etanol 96%, larutan NaCl fisiologis 0,9%, aquadest steril, aluminium foil, spuit dengan jarum 5 cc, asam sulfat, reagen Dragendorff, reagen Mayer, air panas, magnesium, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl dan alkohol 70%.

### **c. Prosedur Kerja**

#### **1) Pra Analitik**

##### **a) Persiapan Sampel**

- (1) Bagian tanaman sirih merah yang dimanfaatkan dalam penelitian ini adalah bagian daun. Pemilihan sampel didasarkan pada kriteria yang telah ditentukan peneliti sebelumnya. Untuk memperoleh jumlah ekstrak yang memadai, digunakan sebanyak 1,5 kg daun sirih merah dalam kondisi segar.
- (2) Daun sirih merah yang diperoleh dibersihkan dengan air bersih dan kemudian dilakukan penirisan guna membersihkan kotoran yang masih melekat.
- (3) Proses pengeringan daun sirih merah dilakukan secara alami selama 12 hari dengan bantuan aliran udara. Daun diletakkan di atas nampan di ruang terbuka yang terlindung dari paparan langsung sinar matahari, dan dibiarkan hingga kondisi daun benar-benar kering.
- (4) Setelah bahan benar-benar kering, daun ditimbang dan dihaluskan hingga menjadi serbuk halus yang disebut simplisia.

##### **b) Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah**

Prosedur pembuatan ekstrak daun sirih merah yang diadaptasi dari penelitian (Wendersteyt, Wewengkang and Abdullah, 2021), adalah sebagai berikut:

- (1) Sebanyak 150 gram simplisia dimasukkan ke dalam toples kaca berkapasitas 2000 ml.
- (2) Kemudian, 750 ml etanol 96% ditambahkan hingga simplisia terendam sepenuhnya, dan toples kaca ditutup dengan rapat.

- (3) Proses perendaman dilakukan selama 48 jam ( $2 \times 24$  jam) di tempat yang terlindung dari paparan sinar matahari langsung, dengan pengadukan dilakukan setiap 24 jam sekali untuk menjaga homogenitas larutan.
- (4) Setelah dua hari, hasil maserasi pertama disaring menggunakan kain kasa steril, dan filtrat yang dihasilkan dikumpulkan dalam erlenmeyer. Residu dari penyaringan kemudian dimaserasi ulang menggunakan etanol 96% sebanyak 750 ml selama  $2 \times 24$  jam dalam wadah tertutup serta tetap dilindungi dari sinar matahari. Setelah  $2 \times 24$  jam, maserat kedua difiltrasi kembali, lalu dilakukan maserasi ketiga selama tiga hari, sehingga diperoleh tiga filtrat.
- (5) Seluruh filtrat yang dikumpulkan kemudian dimasukkan ke dalam labu penampung alat evaporator. Proses penguapan dilakukan pada suhu antara 40–60°C sampai menghasilkan ekstrak pekat.
- (6) Ekstrak pekat yang dihasilkan dari proses evaporasi tersebut kemudian dipindahkan ke dalam wadah bersih dan dilakukan penimbangan untuk mengetahui berat bersih ekstrak yang diperoleh.

### c) **Skrining Fitokimia**

Skrining fitokimia dilakukan dengan melakukan pengujian terhadap senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid, dan saponin dan terpenoid. Prosedur pengujian ini diadaptasi dari penelitian oleh (Niluwih *et al.*, 2023)

#### (1) Uji Alkaloid

3 ml sampel ditambahkan dengan 3 tetes larutan HCl, kemudian dibagi menjadi dua tabung. Pada tabung satu diberikan 1 ml reagen Dragendorff, sedangkan tabung dua diberi 1 ml reagen Mayer. Indikasi hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya

endapan jingga kemerahan pada tabung yang mengandung reagen Dragendorff dan endapan berwarna putih dalam tabung reaksi dengan kandungan reagen Mayer.

(2) Uji Flavonoid

Tambahkan 0,1 g magnesium atau ujung spatula ke dalam 1 ml sampel, lalu tambahkan 10 tetes larutan HCl. Hasil positif ditandai dengan munculnya warna jingga pada flavonoid.

(3) Uji Tanin

Sebanyak 2 tetes  $\text{FeCl}_3$  1% ditambahkan pada 2 ml sampel dan dihomogenkan. Hasil positif tanin ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari warna awal sampel uji menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman.

(4) Uji Saponin

Campurkan 1 ml sampel dengan air panas sebanyak 10 ml dan 1 tetes HCl, kemudian dikocok selama 10 detik dengan keras. Jika terdapat busa dengan tinggi 1-10 cm yang stabil selama setidaknya 10 menit, hal itu menunjukkan bahwa terdapat senyawa saponin pada sampel.

(5) Uji Terpenoid dan Steroid

Sebanyak 3 ml sampel dicampurkan dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dan kemudian dihomogenkan dengan di kocok. Adanya kandungan terpenoid dan steroid dapat diidentifikasi melalui terbentuknya warna merah.

**d) Pembuatan Ekstrak Variasi Konsentrasi**

(1) Ekstrak etanol daun sirih merah akan dibuat dengan variasi konsentrasi 15, 30, 45, 60, 75, dan 90%. Setiap konsentrasi dihasilkan dengan cara menimbang dan

mengencerkan ekstrak pekat menggunakan pelarut etanol 96% dan dihitung berdasarkan perbandingan konsentrasi :

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

Dengan persentase (%) menunjukkan variasi konsentrasi, b adalah massa ekstrak etanol daun sirih merah pekat (100%), dan v merupakan volume pelarut atau pengencer (etanol 96%).

- (2) Jumlah massa ekstrak pekat yang diperlukan untuk membuat setiap konsentrasi ekstrak dengan volume etanol 96% 3 ml dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4**  
**Variasi Konsentrasi**

<u>Konsentrasi ekstrak</u> (%)	<u>Massa ekstrak etanol daun sirih</u> <u>merah 100% (gram)</u>	<u>Volume etanol 96%</u> (ml)
15	0,45	3
30	0,9	3
45	1,35	3
60	1,8	3
75	2,25	3
90	2,7	3
<b>Total</b>	<b>9,45</b>	<b>18</b>

- (3) Setelah itu, ekstrak pekat yang sudah tercampur dengan etanol 96% dihomogenkan lalu disimpan.

**e) Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)**

- (1) Untuk membuat 24 media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan ketebalan 4 mm, diperlukan sekitar 610 ml larutan media MHA. Menurut etiket pembuatan media

MHA, 38 gr bubuk media dilarutkan dalam satu liter aquadest. Oleh karena itu untuk membuat 610 ml media, diperlukan sekitar 23,18 gr bubuk media MHA. Bubuk media ditimbang dengan menggunakan neraca analitik dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu ditambahkan sebanyak 610 ml aquadest ke dalam erlenmeyer.

- (2) Media dihomogenkan dan dipanaskan diatas *hotplate* dengan bantuan *magnetic stirrer* hingga larut dengan sempurna.
- (3) Setelah media terlarut sepenuhnya, ukur pH media dengan pH *stick* untuk memastikan pH berada dalam keadaan optimal antara 7,2 hingga 7,4 pada suhu ruang.
- (4) Proses sterilisasi media dilakukan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C, dihitung sejak suhu tersebut tercapai secara stabil.
- (5) Setelah proses sterilisasi selesai, media dikeluarkan dari autoklaf dan didiamkan selama beberapa menit hingga suhunya menurun mencapai kisaran 40–45°C.
- (6) Ketika media telah mencapai suhu 40–45°C, sebanyak ± 25 ml media dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri, kemudian dibiarkan hingga mengalami pematatan sempurna.

**f) Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus***

- (1) Koloni *Staphylococcus aureus* berumur 24 jam diambil secara aseptis menggunakan ose, kemudian dimasukkan ke dalam 10 ml larutan NaCl 0,9% steril dan dihomogenkan.

- (2) Suspensi bakteri yang telah disiapkan kemudian dikalibrasi tingkat kekeruhannya menggunakan McFarland densitometer hingga sesuai dengan standar 0,5 McFarland, setara dengan  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml.

## **2) Analitik**

Prosedur uji daya hambat antibakteri yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada standar prosedur yang ditetapkan oleh CLSI (2018), dengan langkah-langkah sebagai berikut.

### **a) Inokulasi Bakteri**

- (1) Pastikan media berada pada suhu ruang sebelum diinokulasi.
- (2) *Cotton swab* steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri dalam waktu maksimal 15 menit setelah suspensi tersebut dibuat hingga terlapisi secara merata. Setelah itu, peras lidi kapas pada dinding tabung untuk menghilangkan kelebihan cairan.
- (3) Sebarkan suspensi bakteri pada permukaan media MHA dengan cara menggosokkan *cotton swab* secara merata di atas permukaan media, menggunakan teknik *swabbing*.
- (4) Media diputar dengan sudut  $60^\circ$ , kemudian *cotton swab* kembali digosokkan di permukaannya. Prosedur ini diulangi dua kali untuk menjamin distribusi suspensi bakteri yang seragam.
- (5) Sebelum meletakkan cakram disk, biarkan media dalam keadaan terbuka selama 3–5 menit dengan batas waktu maksimal 15 menit guna memastikan kelebihan kelembaban pada media telah terserap.

### **b) Peletakan Cakram *Disk***

- (1) Dengan menggunakan pinset steril, letakkan cakram blanko, cakram yang telah dijenuhkan oleh ekstrak etanol daun sirih merah, dan cakram antibiotik *Chloramphenicol* 30 mcg pada permukaan media MHA yang telah diinokulasikan bakteri secara berurutan dan tertata dengan jarak minimal 24 mm antar cakram.
- (2) Tekan setiap cakram *disk* secara perlahan untuk memastikan tertempel sempurna dengan media MHA.

### **c) Inkubasi Cakram *Disk***

- (1) Tutup dan balikkan cawan petri, pastikan cakram *disk* tidak terjatuh.
- (2) Inkubasi media MHA yang telah berisi cakram *disk* pada inkubator dengan suhu  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  selama 18-24 jam.

## **3) Pasca Analitik**

### **a) Pengamatan Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri**

- (1) Zona hambat yang terbentuk diamati dan diameternya diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan mm.
- (2) Zona hambat diukur berdasarkan diameter area jernih yang terbentuk mengelilingi cakram *disk*, ditandai sebagai area tanpa pertumbuhan bakteri, dengan pengukuran dilakukan dari satu tepi ke tepi yang berseberangan.

## **F. Pengolahan dan Analisis Data**

### **1. Pengolahan data**

Dalam penelitian ini, pengolahan data skrining fitokimia dilakukan terlebih dahulu dengan menganalisis kandungan alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid, dan

saponin daun sirih merah, yang diidentifikasi melalui perubahan warna pada setiap uji. Data dari pengujian ini diolah menggunakan teknik tabulasi dengan disusun dalam bentuk tabel dan narasi. Selanjutnya, data primer dikumpulkan melalui pengukuran diameter zona hambat bakteri dalam milimeter (mm) setelah diberikan ekstrak daun sirih merah. data primer yang dikumpulkan adalah pengukuran diameter zona hambat bakteri dalam milimeter (mm) setelah diberikan ekstrak daun sirih merah. Data tersebut kemudian diolah menggunakan teknik tabulasi, yang berarti data dicatat dan disusun dalam bentuk tabel. Selain itu, hasilnya juga disajikan dalam bentuk naratif untuk memberikan penjelasan yang lebih detail. Data ini juga diolah dengan teknik tabulasi serta narasi untuk memberikan penjelasan yang lebih rinci.

## **2. Analisis data**

Penelitian ini menerapkan pendekatan analisis data kuantitatif yang dilakukan menggunakan uji statistik dengan mengandalkan sistem komputerisasi. Proses analisis dilakukan secara bertahap dan sistematis, meliputi beberapa langkah berikut:

- a. Uji Kolmogorov-Smirnov, yang berfungsi menentukan apakah data memiliki distribusi normal.
- b. Jika data terdistribusi normal, analisis akan dilanjutkan dengan uji One-Way ANOVA. Namun, jika data tidak terdistribusi normal, maka uji Kruskal-Wallis akan digunakan sebagai alternatif non-parametrik.
- c. Jika terdapat perbedaan yang signifikan, analisis data dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui pada konsentrasi mana saja terdapat perbedaan bermakna, uji dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.