

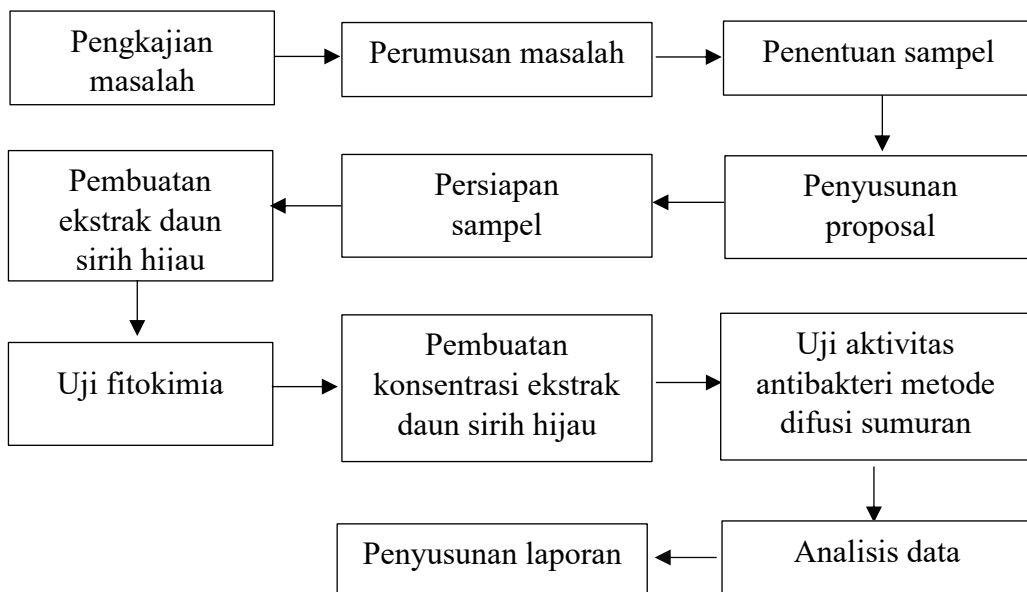
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *true experimental* dengan rancangan *posttest only control group design*. *Post Test Only Control Design*, yaitu rancangan dengan kelompok kontrol yang hanya diberikan pengukuran setelah perlakuan tanpa dilakukan pretest sebelumnya. Pada desain *true experimental* terdapat kelompok lain yang tidak menerima perlakuan, tetapi tetap dilakukan pengamatan. Kehadiran kelompok pembanding (kelompok kontrol) memungkinkan peneliti menilai secara lebih pasti pengaruh perlakuan (*treatment*) yang diberikan pada kelompok eksperimen (Islam and Bangdiwala, 2024).

B. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Tempat dilaksanakannya pengambilan sampel daun sirih hijau (*Piper betle linn*) yaitu di desa Pucaksari, kecamatan Busungbiu, kabupaten Buleleng. Pelaksanaan penelitian akan dilakukan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar yang berlokasi di Jl. Pulau Moyo No.33 A, Pedungan, Denpasar Selatan, Kota Denpasar, Bali 80222.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Oktober 2025 sampai dengan bulan April 2026.

D. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun sirih hijau (*Piper betle linn*) yang diambil dari desa Pucaksari, kecamatan Busungbiu, kabupaten Buleleng.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle linn*) yang dibedakan menjadi 4 kelompok berdasarkan perbedaan perlakuan pemberian ekstrak daun sirih hijau dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%, serta terdapat kontrol positif yaitu bakteri *Escherichia coli* yang dilakukan induksi dengan antibiotik *levofloxacin hemihydrate* dan kontrol negatif dilakukan induksi dengan pelarut etanol 96%.

a. Unit analisis

Unit analisis pada penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dari ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle linn*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%.

b. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini yaitu *purposive sampling*. *Purposive sampling* adalah teknik pengambilan sampel yang relevan pada tujuan penelitian dan memiliki ciri khusus. Ciri khusus tersebut ditentukan oleh keputusan peneliti (Asrulla *et al.*, 2023)

Menurut Zahra dan Maryati (2024) terdapat dua kriteria sampel yaitu kriteria inklusi dan kriteria eklusi:

1. Kriteria inklusi

- Daun sirih hijau yang berwarna hijau tua
- Permukaan daun halus dan licin
- Daun utuh atau tidak sobek dan tidak berlubang.

2. Kriteria eklusi

- Daun berwarna kuning
- Kondisi daun layu dan kering
- Daun rusak, sobek atau berlubang.

c. Replikasi sampel penelitian

Dalam suatu percobaan laboratorium, perlu melakukan pengulangan terhadap pengujian yang dilakukan. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan akurasi hasil percobaan. Semakin banyak pengulangan maka akan semakin tinggi juga ketelitian

percobaan yang dilakukan. Jumlah pengulangan yang dibutuhkan dalam percobaan ditentukan dengan menggunakan rumus Federer (Widiyatno dan Muniroh, 2018).

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

Keterangan:

r : Jumlah Pengulangan

t : Jumlah Perlakuan

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

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

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$5r \geq 20$$

$r \geq 4$, sehingga diperoleh

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

$$(6-1)(4-1) \geq 15$$

$$(5)(3) \geq 15$$

Berdasarkan perhitungan diatas, pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini sebanyak empat kali. Pada penelitian ini menggunakan enam perlakuan yang terdiri dari kontrol positif, kontrol negatif, konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% serta masing-masing konsentrasi dilakukan empat kali pengulangan, sehingga total sampel yang diperlukan dalam penelitian ini sejumlah 24 sampel.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data

Pada penelitian ini menggunakan data primer yang didapatkan dengan melakukan eksperimen laboratorium yang diperoleh dari hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Penelitian ini juga menggunakan data sekunder yang diperoleh dari jurnal dan dokumen terkait.

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data dalam penelitian ini adalah pengukuran zona hambat bakteri *Escherichia coli* yang dihasilkan oleh ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle linn*) dan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

3. Instrumen Pengumpulan Data

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat tulis, handphone untuk dokumentasi, dan jangka sorong.

F. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja

1. Alat

a. Alat uji fitokimia

Alat yang digunakan untuk melakukan uji fitokimia yaitu tabung reaksi, rak tabung, mikropipet dan tip dan pipet tetes.

b. Alat metode difusi sumuran

Alat yang digunakan untuk melakukan metode difusi sumuran yaitu *autoclave*, inkubator, *biosafety cabinet*, api bunsen, *beaker glass*, rak tabung, tabung reaksi, pipet, *magnetic stirrer*, gelas ukur, sendok kecil, cawan petri, erlenmeyer, penangas atau kompor, densitometer, *vortex*, ose *disposable*, *cotton swab*, plastik wrap, label, penggaris, *hand gloves*, masker, neraca analitik, jangka sorong, aluminium foil.

2. Bahan

a. Bahan uji fitokimia

Bahan yang digunakan untuk uji fitokimia yaitu ekstrak kental daun sirih hijau (*Piper betle linn*) 100%, etanol 96%, sulfat pekat (H_2SO_4), aquadest, ferri klorida 10%, dan kloroform.

b. Bahan metode difusi sumuran

Bahan yang digunakan untuk melakukan metode difusi sumuran yaitu pelarut etanol 96%, ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle linn*), bakteri *Escherichia coli*, media MHA (*Mueller Hinton Agar*), dan antibiotik *levofloxacin Hemihydrate*.

3. Prosedur kerja

a. Pra analitik

Daun sirih hijau (*Piper betle linn*) dipilih sesuai dengan kriteria inklusi dikumpulkan sebanyak 3 kg dan dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dari permukaan daun (Suarantika dkk., 2023).

b. Analitik

1) Pembuatan serbuk simplisia

Daun sirih hijau (*Piper betle linn*) sebanyak 3 kg dikeringkan dengan diangin-anginkan lalu dipotong menjadi bagian kecil-kecil kemudian keringkan selama kurang lebih 7-14 hari pada tempat yang teduh dan tidak terkena sinar matahari langsung. Simplisia yang telah kering diblender menjadi serbuk kasar lalu diayak untuk memperoleh serbuk yang lebih halus. Kemudian hasil ayakan simpan dalam wadah tertutup (Rani,2021).

2) Pembuatan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle linn*)

Timbang serbuk simplisia daun sirih hijau (*Piper betle linn*) sebanyak 300 gram lalu tambahkan 3.000 mL pelarut etanol 96% kemudian masukan dalam wadah yang tertutup. Proses maserasi akan berlangsung selama 3 x 24 jam sambil diaduk sesekali, kemudian saring dengan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan ampas simplisia. Kumpulkan filtrat kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45-50°C sampai diperoleh ekstrak kental dan disimpan dalam wadah tertutup (Zahra dan Maryati, 2024)

3) Uji fitokimia

Uji fitokimia dilakukan secara kualitatif untuk mendeteksi adanya senyawa fitokimia seperti flavonoid, saponin, tanin, dan terpenoid dengan menggunakan reagen secara spesifik (Shaikh dan Patil, 2020)

a. Uji flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan siapkan 1 ml ekstrak yang sudah diencerkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 ml larutan NaOH 2% serta beberapa tetes HCl. Reaksi positif terhadap flavonoid akan ditunjukkan dengan munculnya perubahan warna menjadi merah, kuning, atau *orange*.

b. Uji saponin

Uji saponin dilakukan dengan menyiapkan 2 ml ekstrak yang sudah diencerkan kemudian ditambahkan 2 ml larutan sodium bikarbonat dan air suling lalu kocok dengan kencang. Hasil positif pada saponin akan ditunjukkan dengan terbentuknya busa konsisten setinggi 1-2 cm setelah dikocok dan bertahan selama 10 menit.

c. Uji tanin

Uji tanin dilakukan dengan menyiapkan 0,4 ml ekstrak yang sudah diencerkan kemudian ditambahkan 4 mL NaOH 10% lalu homogenkan. Hasil positif pada tanin akan ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi biru kehijauan.

d. Uji terpenoid

Uji terpenoid dilakukan dengan menyiapkan 2 ml kloroform kemudian tambahkan 5 ml ekstrak sambil diuapkan pada waterbath lalu tambahkan 3 ml konsentrat H_2SO_4 . Hasil positif pada terpenoid akan ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi keabu-abuan.

4) Pembuatan seri konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan kontrol

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini yaitu antibiotik *Levofloxacin* yang berfungsi sebagai pembanding untuk mengetahui efektivitas antibakteri dari ekstrak yang diuji. Kontrol negatif dibuat dengan menggunakan pelarut etanol 96%.

Pembuatan seri konsentrasi ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle linn*) dilakukan dengan menimbang sampel ekstrak pekat sesuai dengan perhitungan presentase perbandingan konsentrasi yang dapat ditentukan melalui rumus berikut:

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

Keterangan:

% : variasi konsentrasi (%) ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle linn*)

b : massa ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle linn*) 100%

v : volume pelarut.

Berdasarkan rumus diatas, maka dapat dicari massa ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle linn*) yang digunakan dalam pembuatan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% disajikan dalam tabel berikut:

Tabel 3
Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau

No	Konsentrasi (%)	Ekstrak Daun sirih hijau (<i>Piper betle linn</i>) Pekat 100% (gram)	Etanol 96% (ml)
1	20	2	8
2	40	4	6
3	60	6	4
4	80	8	2

5) Pembuatan media *Muller Hinton Agar* (MHA)

Siapkan serbuk *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebanyak 9,5 gram lalu dilarutkan dalam 250 mL akuades di dalam erlenmeyer, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga homogen. Larutan selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 120°C selama 15 menit dan didinginkan hingga $\pm 60^{\circ}\text{C}$. Media kemudian dituangkan ke cawan petri masing-masing sebanyak 25 mL hingga mengeras, lalu diinkubasi terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam untuk uji sterilitas. Setelah itu, media siap digunakan. (Cappucino and Sherman, 2020)

6) Pembuatan subkultur bakteri *Escherichia coli*

Lakukan sterilisasi pada *biosafety cabinet* sebelum bekerja, siapkan alat dan bahan yang diperlukan lalu dengan menggunakan ose *disposable* ambil koloni tunggal bakteri dari stok kemudian lakukan streak pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebanyak empat kuadran secara aseptis. Setelah melakukan subkultur

bakteri simpan media yang sudah ditanam pada inkubator dengan suhu 35–37°C selama 18 – 24 jam.

7) Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli*

Ambil 2-3 koloni bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan ose lalu disuspensikan dalam 5 mL *natrium klorida* (NaCl) 0,9% ke tabung reaksi yang steril kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Inkubasi suspensi selama 24-48 jam pada suhu 37°C, lalu bandingkan kekeruhannya dengan standar *Mc Farland* (Jawetz, Melnick, and Adelberg, 2020).

8) Uji aktivitas antibakteri metode difusi sumuran

Siapkan suspensi bakteri *Escherichia coli* lalu celupkan *cotton swab* steril, tiriskan *cotton swab* dengan menekannya pada dinding tabung lalu inokulasikan pada media *Muller Hinton Agar* (MHA) goresan dilakukan secara merata sampai tertutup semua permukaan media, kemudian diamkan selama 2 menit agar suspensi bakteri meresap. Setelah meresap buat sumuran pada media dengan menggunakan *corer borer* dengan masing-masing sumuran berukuran 6 mm, kemudian masing-masing sumuran ditambahkan ekstrak dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% sebanyak 10 µL. Kontrol negatif diisi etanol 96% sebanyak 10 µL, sedangkan kontrol positif diisi antibiotik *levofloxacin hemihydrate* sebanyak 1 µL dan 9 µL NaCl. Media selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam untuk diamati zona hambat yang terbentuk. (Nurhayati dkk, 2024)

c. Pasca analitik

Hasil pengamatan dilakukan dengan melihat terbentuknya zona bening di sekitar sumur sebagai indikator adanya hambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Diameter zona hambat diukur dengan menggunakan jangka jorong dari satu

sisi ke sisi lainnya melalui bagian tengah sumur dan dicatat dalam satuan milimeter (mm). Klasifikasi kekuatan antibakteri ekstrak daun sirih hijau dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan besarnya diameter zona hambat, yaitu:

- a. Sangat kuat bila diameter zona hambat mencapai > 20 mm.
- b. Kuat bila diameter zona hambat mencapai $10 - 20$ mm.
- c. Kekuatan sedang bila diameter zona hambat mencapai $5 - 10$ mm.
- d. Kekuatan lemah bilamana diameter zona hambat mencapai < 5 mm

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabulating data yang disajikan dalam bentuk tabel naratif. Data diperoleh dari diameter zona hambat hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle linn*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

2. Analisis data

Data yang diperoleh dilanjutkan dengan uji statistik dengan bantuan *software* komputer. Data dianalisis menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak. Apabila data menunjukkan distribusi normal akan ditunjukkan dengan nilai $p > 0,05$. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Levene* untuk mengetahui homogenitas, dimana kriteria homogenitas yang ditetapkan apabila $p > 0,05$. Analisis dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* untuk menentukan adanya perbedaan zona hambat pertumbuhan *Echerichia coli*. Jika diperoleh perbedaan, maka dilakukan uji lanjut *LSD (Least Significant Difference)* untuk mengidentifikasi perbedaan zona hambat antar masing-masing

konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Sebaliknya, apabila data tidak berdistribusi normal, analisis dilanjutkan menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*.

H. Etika Penelitian

Peneliti menetapkan etika penelitian berdasarkan prinsip *beneficence* dan *non-maleficence*, yaitu keharusan untuk menghasilkan manfaat bagi subjek penelitian serta menghindari atau meminimalkan resiko yang mungkin terjadi selama proses penelitian (Purwati dan Ruslita, 2025).