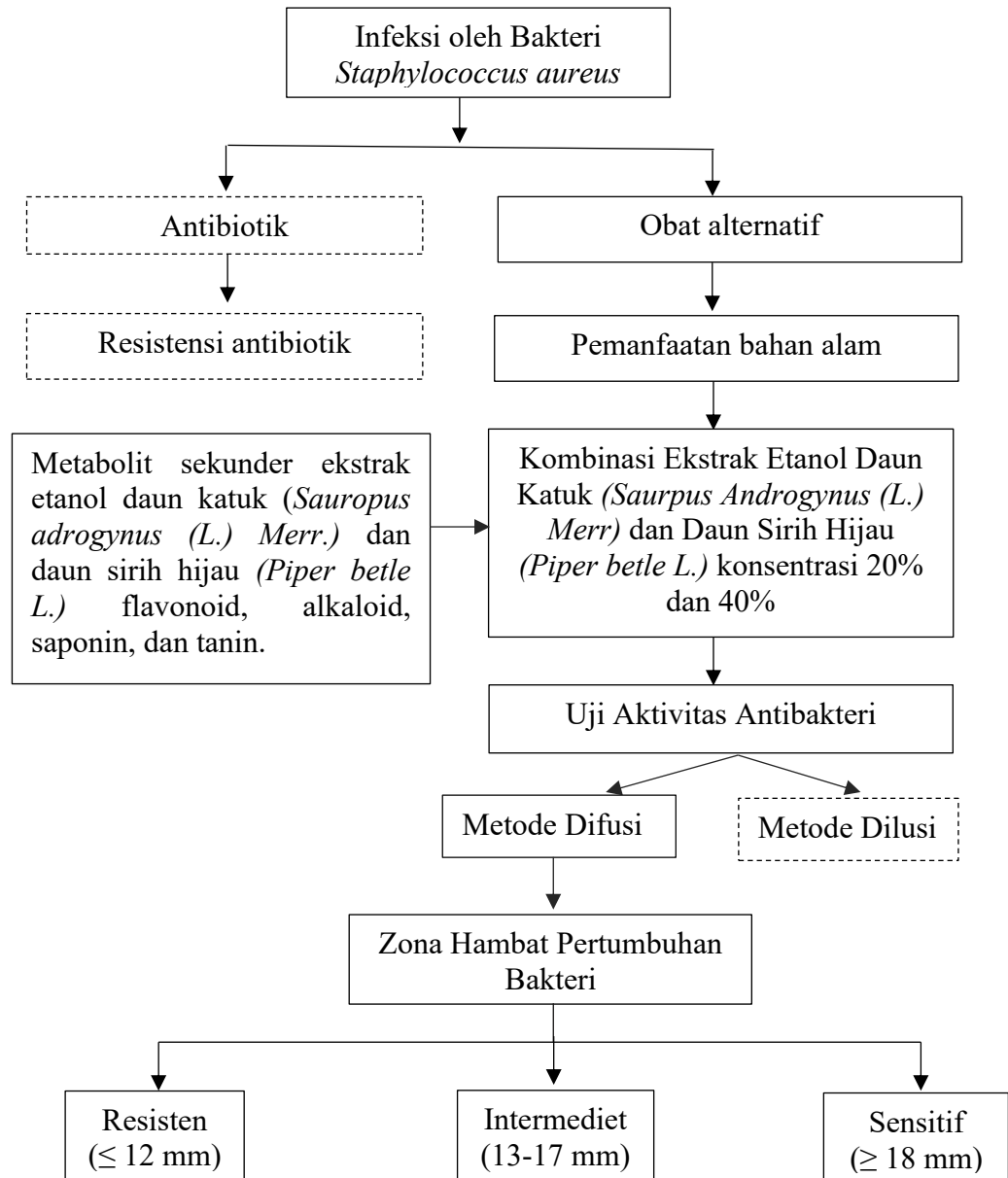


BAB III

KERANGKA KONSEP

A. Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:

: Diteliti

: Tidak diteliti

Gambar 3. Kerangka Konsep Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep diatas dapat diuraikan bahwa penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* dapat diberikan terapi pengobatan dengan antibiotik. Namun pemberian antibiotik yang tidak bijak dapat menimbulkan resistensi antibiotik, sehingga diperlukan pengobatan alternatif dengan menggunakan bahan alam. Bahan alam yang memiliki potensi sebagai antibakteri adalah daun katuk (*Saurpus Androgynus (L.) Merr*) dan daun sirih hijau (*Piper betle L.*). Daun katuk dan daun sirih hijau merupakan bahan alami yang memiliki senyawa antibakteri seperti flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun katuk (*Saurpus Androgynus (L.) Merr*) dan daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan metode difusi cakram. Diameter zona bening yang dihasilkan di sekeliling cakram diukur untuk melihat kemampuan ekstrak bahan alam dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan luasnya diameter zona hambat yang terbentuk diklasifikasikan menjadi kategori resisten, intermediet dan sensitif.

B. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*independent variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi dan kombinasi ekstrak etanol daun katuk (*Saurpus Androgynus (L.) Merr*) dan daun sirih hijau (*Piper betle L.*) yang diuji terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

2. Variabel terikat (*dependent variable*)

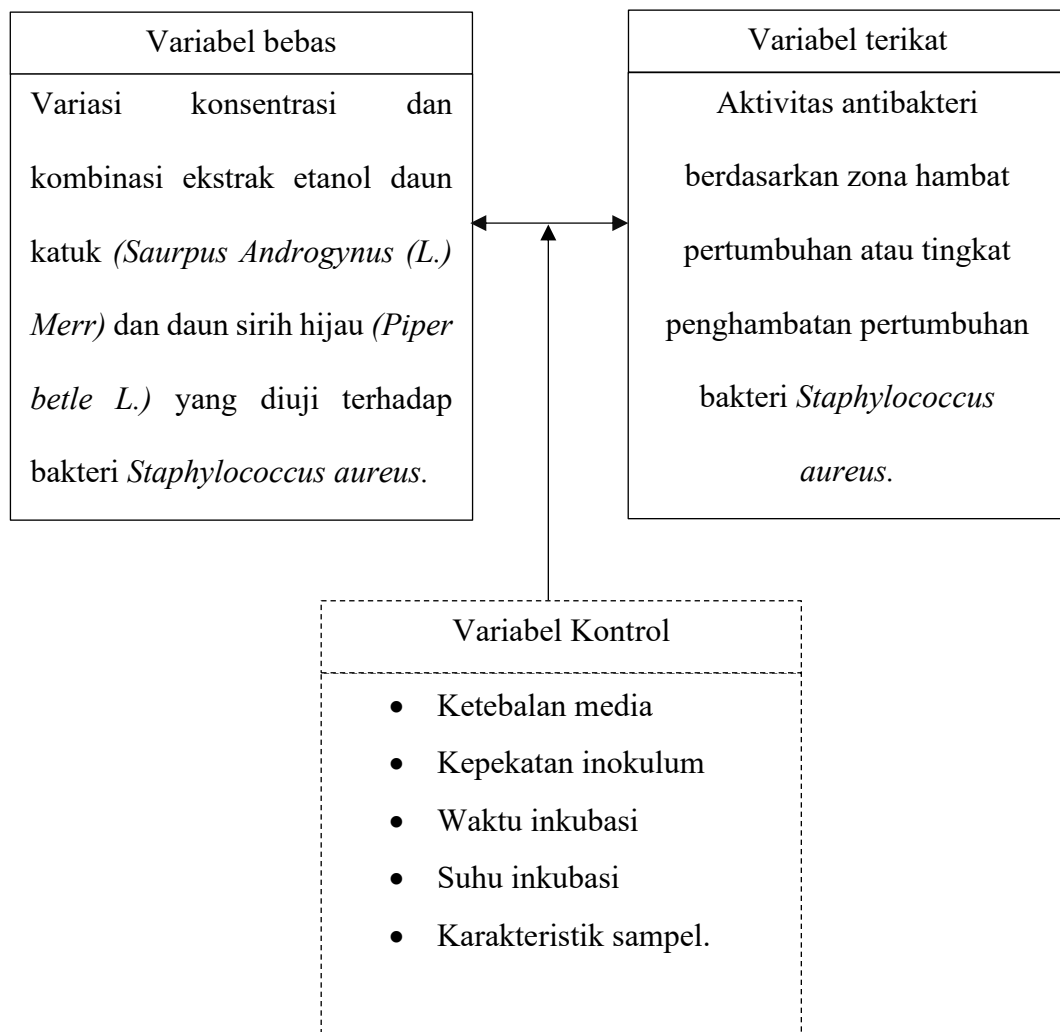
Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri berdasarkan zona hambat atau tingkat penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

3. Variabel kontrol (*control variable*)

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah ketebalan media, kepekatan inokulum, waktu dan suhu inkubasi, dan karakteristik sampel.

4. Hubungan antar variabel

Adapun hubungan antar variabel bebas, variabel terikat dan variabel kontrol tersebut dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Gambar 4. Hubungan Antar Variabel

C. Definisi Operasional

Tabel 2
Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Skala
1	2	3	4
Kandungan metabolit sekunder pada ekstrak daun katuk dan daun sirih hijau	Senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak daun katuk dan daun sirih hijau yang diidentifikasi dengan uji skrining fitokimia untuk senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin	Uji Fitokimia	Nominal
Variasi konsentrasi dan kombinasi ekstrak etanol daun katuk dan daun sirih hijau	Ekstrak etanol daun katuk dan daun sirih hijau masing-masing diencerkan hingga konsentrasi 20% dan 40% kemudian dikombinasi dengan perbandingan 1:1, 1:2 dan 2:1.	Pengenceran dengan etanol 96% dengan presentase perbandingan konsentrasi % (b/v)	Ordinal
Aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak daun katuk dan daun sirih hijau	Daya hambat kombinasi ekstrak daun katuk dan daun sirih hijau terhadap pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> berdasarkan diameter zona bening disekitar cakram pada media MHA	Jangka Sorong (mm)	Rasio
Efek sinergitas antibakteri	Peningkatan aktivitas antibakteri pada kombinasi ekstrak dibandingkan dengan aktivitas antibakteri pada ekstrak tunggal.	Membandingkan aktivitas antibakteri pada ekstrak tunggal dengan kombinasi	Nominal

D. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah terdapat perbedaan aktivitas antibakteri pada variasi konsentrasi dan variasi kombinasi ekstrak etanol daun katuk (*Saurpus Androgynus (L.) Merr*) dan daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan penelitian *true eksperimental* dengan rancangan penelitian *posttest only control group design*. Dalam desain *true experimental* adanya kelompok lain yang tidak dikenai eksperimen, tetapi ikut mendapatkan pengamatan dan dengan adanya kelompok lain (kelompok kontrol) maka akibat perlakuan (*treatment*) terhadap kelompok eksperimen dapat diketahui secara pasti (Arib *et al.*, 2024). Pada penelitian ini digunakan rancangan dengan Kelompok Kontrol Hanya *Post Test* tanpa *Pre Test* (*Post Test Only Control Design*). Bentuk rancangan yang digunakan dapat dilihat pada tabel berikut:

Kelompok	Perlakuan	Post Test
R1 (Kelompok Eksperimen)	X	O1
R2 (Kelompok Kontrol)		O2

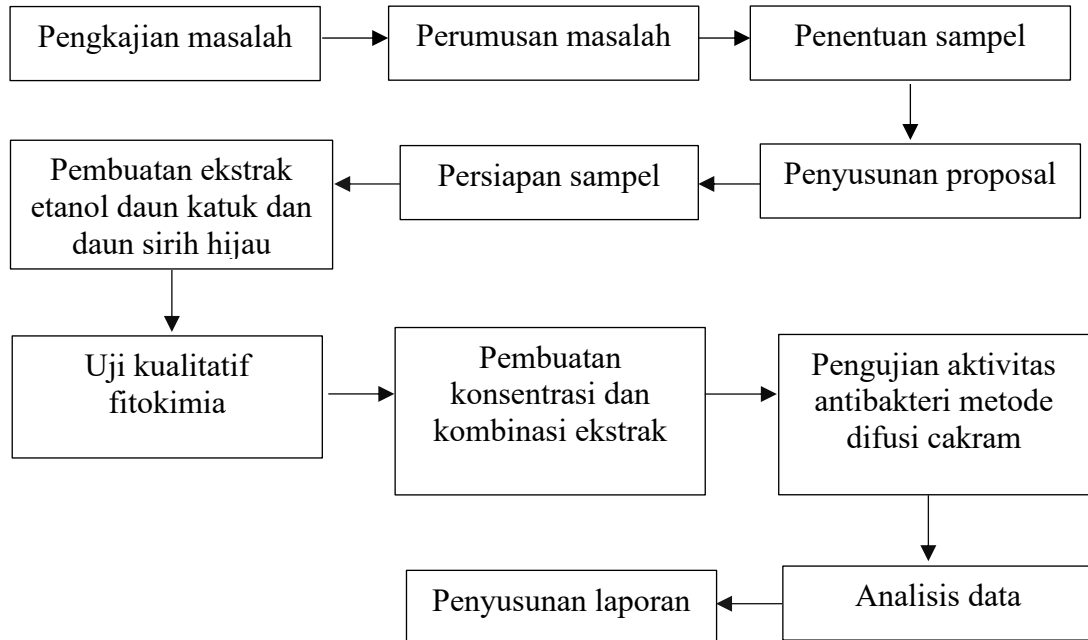
Gambar 5. Desain Penelitian *Posttest Only Control Group Design*

Keterangan:

- R1 : Randomisasi
- R2 : Kelompok kontrol
- X : Perlakuan (*Treatment*)
- O1 : Pengaruh diberikannya perlakuan
- O2 : Pengaruh tidak diberikannya perlakuan

B. Alur Penelitian

Adapun alur penelitian ditampilkan pada gambar berikut.



Gambar 3. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu

1. Tempat Penelitian

Pengambilan sampel penelitian daun katuk dan daun sirih hijau dilaksanakan di Desa Tegal Tugu, Kecamatan Gianyar, Kabupaten Gianyar. Proses pengeringan, pembuatan simplisia dan ekstraksi dilaksanakan di Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO) Provinsi Bali. Proses uji skrining fitokimia dilaksanakan di Laboratorium Kimia Terapan Poltekkes Kemenkes Denpasar serta proses pengujian aktivitas antibakteri dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar di Jl. Pulau Moyo No.33 A, Pedungan, Denpasar Selatan, Kota Denpasar.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2026 sampai April 2026.

D. Populasi dan sampel

1. Unit Analisis

Unit analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang terbentuk sebagai indikator aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus (L.) Merr*) dan daun sirih hijau (*Piple betle L.*).

2. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun katuk (*Sauropus androgynus (L.) Merr*) dan daun sirih hijau (*Piple betle L.*).

3. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus (L.) Merr*) dan daun sirih hijau (*Piple betle L.*) yang sudah melewati tahapan evaporasi. Ekstrak pekat daun katuk dan daun sirih diencerkan hingga konsentrasi yaitu 20% dan 40% kemudian masing-masing konsentrasi dikombinasikan menjadi 3 perbandingan yaitu 1:1, 1:2, dan 2:1.

4. Replikasi sampel penelitian

Jumlah total perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 6 perlakuan. Pada masing-masing perlakuan tersebut dilakukan pengulangan yang ditentukan menggunakan rumus *Federer* sebagai berikut (Indratama and Yenita, 2019):

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

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

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

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Keterangan:

r = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

Berdasarkan perhitungan diatas, pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini sebanyak empat kali, sehingga total sampel yang sejumlah 24 sampel.

5. Teknik pengambilan sampel

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

1) Daun katuk

a. Kriteria inklusi

Daun katuk dipilih berdasarkan kriteria inklusi yaitu daun berasal dari tanaman sehat, tidak diserang hama atau penyakit, berwarna hijau tua, tidak layu serta tidak mengalami kerusakan fisik. Daun yang dipanen adalah daun yang sudah tua dan diperoleh dalam waktu dan dari lokasi yang relatif sama

b. Kriteria eksklusi

Daun katuk yang dikeluarkan dari sampel penelitian berdasarkan kriteria eksklusi yaitu daun yang mengalami kerusakan fisik, mengalami pembusukan, perubahan warna yang tidak normal, daun yang terkontaminasi jamur, serangga atau bahan kimia berbahaya dan dengan asal tanaman yang tidak jelas.

2) Daun sirih hijau

a. Kriteria Inklusi

Daun sirih hijau dipilih berdasarkan kriteria inklusi yaitu daun berasal dari tanaman sehat, tidak diserang hama atau penyakit, berwarna hijau segar, tidak layu serta mengalami kerusakan fisik. Daun yang dipanen adalah daun yang sudah tua dan diperoleh dalam waktu dan dari lokasi yang relatif sama.

b. Kriteria Eksklusi

Daun sirih hijau yang dikeluarkan dari sampel penelitian berdasarkan kriteria eksklusi yaitu daun yang mengalami kerusakan fisik, mengalami pembusukan, perubahan warna yang tidak normal, daun yang terkontaminasi jamur, serangga atau bahan kimia berbahaya dan dengan asal tanaman yang tidak jelas.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Data yang dikumpulkan berupa data primer dan data sekunder. Data primer didapatkan dengan melakukan eksperimen laboratorium. Data diperoleh dari hasil pengukuran diameter zona hambat pada pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yang dihasilkan oleh kombinasi ekstrak daun katuk dan daun sirih hijau. Data sekunder berupa jurnal dan dokumen terkait.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini adalah pengukuran zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yang dihasilkan oleh kombinasi ekstrak daun katuk dan daun sirih hijau dalam berbagai konsentrasi. Hasil pengukuran tersebut dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

3. Instrumen pengumpulan data

Dalam penelitian instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data yaitu jangka sorong, alat tulis, kamera, dan alat laboratorium.

F. Alat, Bahan dan Prosedur Kerja

1. Alat

Alat yang dipergunakan adalah *autoclave*, api bunsen, oven, corong, blender, *vacum rotary evaporator*, *beaker glass*, rak tabung, tabung reaksi, stirer pengaduk, *hot plate*, gelas ukur, sendok kecil, cawan petri, erlenmeyer, inkubator, *vortex*, *bio safety cabinet*, kawat ose, neraca analitik, desintometer, jangka sorong, ose, tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikropipet, pipet tetes, spatula.

2. Bahan

Daun katuk (*Sauropus androgynus (L.) Merr*), daun sirih hijau (*Piple betle L.*), HCl, bakteri *Staphylococcus aureus ATCC 29213*, etanol teknis 96%, akuades, kertas saring, H₂SO₄, FeCl₃ 10%, asam klorida 2N, reagen dragendroff, ose steril, media (*Muller Hinton Agar*) MHA, *cotton swab*, *blank disk*, cakram antibiotik kloramfenikol (kontrol positif).

3. Prosedur kerja

a) Preparasi sampel

1. Daun katuk

Persiapkan sampel daun katuk (*Sauropus androgynus (L.) Merr*) dipilih sesuai kriteria inklusi. Daun katuk segar dipisahkan dari batang dan tangkai daun hingga diperoleh sebanyak 2 kg lalu dicuci bersih menggunakan air mengalir hingga bersih dan ditiriskan. Sampel kemudian melalui proses perajangan dan dilanjutkan dengan pengeringan metode hybrid selama 3-5 hari hingga kadar air <30%. Selanjutnya

dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 60°C hingga kadar air <10%. Sampel yang sudah kering dihaluskan hingga diperoleh serbuk simplisia.

2. Daun sirih hijau

Daun sirih hijau (*Piper betle L.*) dipilih sesuai kriteria inklusi sebanyak 2 kg lalu dicuci bersih menggunakan air mengalir hingga bersih dan ditiriskan. Sampel kemudian melalui proses perajangan dan dilanjutkan dengan pengeringan metode hybrid selama 3-5 hari hingga kadar air <30%. Selanjutnya dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 60°C hingga kadar air <10%. Sampel yang sudah kering dihaluskan hingga diperoleh serbuk simplisia.

b) Pembuatan ekstrak

1. Ekstraksi daun katuk

Serbuk simplisia daun katuk ditimbang sebanyak 300 gram kemudian dimasukkan kedalam wadah dan ditambahkan pelarut etanol teknis 96% sebanyak 3000 ml lalu ditutup dan diekstraksi dengan metode maserasi selama 3 x 24 jam sambil sesekali diaduk (Detami, Indriarini and Lidesna, 2021). Maserat disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan ampas. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 45-50°C sampai diperoleh ekstrak kental dan pekat (Detami, Indriarini and Lidesna, 2021).

2. Ekstraksi daun sirih hijau

Serbuk simplisia daun sirih hijau ditimbang sebanyak 300 gram kemudian dimasukkan kedalam wadah dan ditambahkan pelarut etanol teknis 96% sebanyak 3000 ml lalu ditutup dan diekstraksi dengan metode maserasi selama 3 x 24 jam sambil sesekali diaduk (Detami, Indriarini and Lidesna, 2021). Maserat disaring

menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan ampas. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 45-50°C sampai diperoleh ekstrak kental dan pekat (Detami, Indriarini and Lidesna, 2021).

c) Skrining fitokimia

1. Uji alkaloid

Uji dilakukan dengan mengencerkan ekstrak pekat hingga konsentrasi 5%. Kemudian 2 ml ekstrak yang telah diencerkan ditambahkan dengan 1 ml reagen dragendroff. Hasilnya ditandai dengan endapan jingga pada reagen dragendroff yang mengindikasikan keberadaan senyawa alkaloid (Putri, Suproborini and Kusumawati, 2023).

2. Uji flavonoid

Uji dilakukan dengan mengencerkan ekstrak pekat hingga konsentrasi 5%. Kemudian 2 ml ekstrak yang telah diencerkan ditambahkan dengan 1 ml reagen H₂SO₄. Reaksi positif terhadap flavonoid ditunjukkan dengan munculnya warna kuning, kecoklatan, hijau, hitam dan orange (Afriliana *et al.*, 2025)

3. Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 10 ml akuades yang telah dipanaskan dan kocok dengan kuat selama 10 menit. Amati busa yang muncul selama 5 menit. Jika busa yang terbentuk tidak hilang memberikan indikasi positif adanya saponin (Kusumawati¹, Fakhriyana and Sapri, 2025).

4. Uji tanin

Uji dilakukan dengan mengencerkan ekstrak pekat hingga konsentrasi 5%. Kemudian 1 ml ekstrak yang telah diencerkan ditambahkan dengan 3 ml akuades

dan beberapa tetes FeCl₃ 10% sampai terjadi perubahan warna. Positif mengandung tanin jika muncul warna hijau kecoklatan atau biru, hitam (Detami, Indriarini and Lidesna, 2021).

d) Pembuatan kombinasi ekstrak dan konsentrasi 20%, 40%

Kombinasi ekstrak kental daun katuk dan daun sirih hijau yang didapatkan dari hasil ekstraksi diencerkan menggunakan alkohol 96% dengan tujuan untuk mendapatkan variasi konsentrasi ekstrak (Detami, Indriarini and Lidesna, 2021). Membuat seri konsentrasi dibuat dengan menimbang stok sampel (ekstrak pekat) sesuai perhitungan menggunakan presentase perbandingan konsentrasi % (b/v) yang dapat ditentukan melalui rumus berikut:

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

Keterangan:

% : variasi konsentrasi (%) ekstrak

b : massa kombinasi ekstrak daun katuk dan daun sirih (100%)

v : volume akhir.

Berdasarkan rumus diatas, maka dapat dicari massa ekstrak etanol daun katuk dan daun sirih hijau yang akan digunakan dalam pembuatan konsentrasi 20% dan 40% disajikan dalam tabel 3, berikut:

Tabel 3
Variasi Konsentrasi Ekstrak

No.	Konsentrasi	Ekstrak Pekat (gram)	Volume Akhir (ml)
1.	20%	10	50
2.	40%	20	50

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

Media (*Mueller Hinton Agar*) MHA dibuat dengan menimbang 9,5 gram media, masukkan media ke erlenmeyer 250 mL. Media dilarutkan dalam 250 mL akuades, dan dipanaskan hingga mendidih. Kemudian, tutup permukaan Erlenmeyer dengan kapas dan *aluminium foil*. Media lalu disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C. Setelah prosedur sterilisasi selesai, media dikeluarkan dari autoklaf dan didiamkan hingga hangat $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Media yang sudah hangat dituangkan ke dalam setiap cawan petri ± 20 mL dan dibiarkan membeku.

f) Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Isolat bakteri diambil 2 ose koloni disuspensikan kedalam 5 mL natrium klorida (NaCl) 0,9% ke tabung steril dan dihomogenkan menggunakan vortex. Suspensi bakteri diukur kekeruhan hingga mencapai 0,5 Mc. *Farland*.

g) Uji aktivitas antibakteri metode difusi cakram

Variasi kombinasi ekstrak daun katuk dan daun sirih hijau disiapkan bersama antibiotik kloramfenikol sebagai kontrol positif dan pelarut etanol 96% sebagai kontrol negatif. Kemudian *blank disk* ditetaskan dengan 20 μL kombinasi ekstrak dan etanol 96% sebagai kontrol negatif. Selanjutnya celupkan *cotton swab* steril pada suspensi bakteri yang telah disiapkan, lalu ditiriskan dengan menekannya di dinding dalam tabung. Inokulasi dilakukan pada media *Muller Hinton Agar* (MHA) dengan menggoreskan *cotton swab* secara merata hingga seluruh permukaan media tertutup rapat dengan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*. Setelah diinokulasikan, lalu didiamkan selama 2 menit agar suspensi bakteri meresap kedalam media. Setelah 2 menit kertas cakram diletakkan pada permukaan media

MHA dengan jarak minimal 15mm antar cakram. Setelah itu diinkubasi dalam waktu 24 jam di suhu 37° C dan diamati zona bening yang terbentuk.

h) Pengukuran zona hambat

Pengukuran zona hambat dilakukan pada zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dan diukur menggunakan jangka sorong dari sisi ke sisi melalui bagian tengah dan hasilnya dilaporkan dalam satuan milimeter (mm). Kekuatan dari antibakteri yang diuji pada kombinasi ekstrak ditentukan dengan kategori zona hambatnya yaitu:

1. Resisten bila diameter zona hambat ≤ 20 mm.
2. Kuat bila diameter zona hambat mencapai 10 - 20 mm.
3. Kekuatan sedang bila diameter zona hambat mencapai 5 - 10 mm.
4. Kekuatan lemah bilamana diameter zona hambat mencapai < 5 mm

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen pengujian aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol daun katuk (*Saurpus Androgynus (L.) Merr*) dan daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang dinyatakan dalam satuan millimeter (mm) diolah menggunakan teknik tabulating data yaitu data yang disajikan dalam bentuk tabel naratif.

2. Analisis data

Data diameter zona hambat yang telah diperoleh lalu dianalisis dengan uji statistik menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas data. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan *Levene's Test*. Apabila data

berdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji *Two Way Anova* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* berdasarkan perbedaan variasi kombinasi dan variasi konsentrasi ekstrak. Apabila data tidak berdistribusi normal maka uji statistik dilanjutkan dengan uji non parametrik dengan uji *Aligned Rank Transform* (ART).

Uji *post hoc* dilakukan apabila hasil menunjukkan hipotesis nol ditolak dan hipotesis alternatif diterima. Pada data yang berdistribusi normal untuk menentukan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan digunakan uji *Tukey*. Apabila data berdistribusi tidak normal maka uji *post hoc* dilakukan menggunakan uji *Games-Howell*.

Untuk menguji perbedaan diameter zona hambat, maka hipotesis statistik penelitian adalah sebagai berikut:

a. Hipotesis variabel variasi kombinasi

H0 : Tidak ada perbedaan zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* berdasarkan variasi kombinasi ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) dan daun sirih hijau (*Piple betle* L.)

H1 : Ada perbedaan zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* berdasarkan kombinasi ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) dan daun sirih hijau (*Piple betle* L.)

b. Hipotesis variabel variasi konsentrasi

H0 : Tidak ada perbedaan zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* berdasarkan variasi konsentrasi kombinasi ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) dan daun sirih hijau (*Piple betle* L.)

H1 : Ada perbedaan zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* berdasarkan variasi konsentrasi kombinasi ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) dan daun sirih hijau (*Piple betle* L.)