

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *true experimental* yang digunakan untuk untuk mengetahui hubungan sebab-akibat antara variabel bebas dan variabel terikat melalui pemberian perlakuan pada kelompok eksperimen serta adanya kelompok kontrol sebagai pembanding. Desain penelitian yang digunakan yaitu *Pretest-Posttest with Control Group Design*, dimana terdapat kelompok perlakuan dan kelompok kontrol yang dilakukan pengukuran sebelum dan setelah perlakuan. Pengukuran dilakukan sebelum dan setelah inkubasi untuk mengetahui pengaruh perlakuan dengan membandingkan hasil kedua kelompok berdasarkan perubahan nilai absorbansi (Masturoh dan Anggita, 2018).

Tabel 2
Desain Penelitian *Pretest-posttest With Control Group*

Kelompok	<i>Pre-test</i>	Perlakuan	<i>Post-test</i>
R1	O1	X	O2
R2	O1		O2

Keterangan:

- R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen yang diberikan ekstrak etanol buah legundi (*Vitex trifolia*) dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39%.
- R2 (Random 2) : Kelompok kontrol terdiri atas, suspensi bakteri 0,5 McFarland yang ditambahkan antibiotik *gentamicin* sebagai

kontrol positif digunakan untuk menunjukkan bahwa metode pengujian berjalan dengan baik. Suspensi bakteri 0,5 McF sebagai kontrol negatif yang digunakan sebagai pembanding untuk melihat pertumbuhan alami bakteri. Serta larutan media *MHB* sebagai kontrol media untuk memastikan media *MHB* dalam kondisi steril dan tidak mengalami kontaminasi selama pengujian.

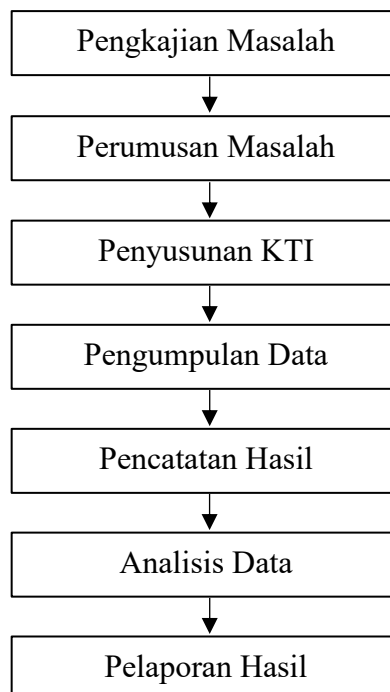
X (Exposure) : Perlakuan pemberian ekstrak etanol buah legundi

O1 (Observasi 1) : Nilai absorbansi sebelum inkubasi.

O2 (Observasi 2) : Nilai absorbansi setelah inkubasi.

B. Alur Penelitian

Berikut merupakan bagan alur penelitian pada penelitian ini:



Gambar 4 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu pengambilan sampel buah legundi dilakukan di Tanjung Bungak, Denpasar Timur. Pembuatan ekstrak buah legundi dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Denpasar. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Denpasar.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Oktober 2025 hingga bulan Mei 2026.

D. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai tingkat konsentrasi ekstrak buah legundi, yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39%.

Uji konsentrasi hambat minimum dilakukan dengan memilih buah legundi menggunakan teknik *nonprobability purposive sampling* yaitu penentuan sampel dengan pertimbangan tertentu (Sugiyono, 2018) berdasarkan kriteria inklusi (buah legundi yang utuh dan dipetik langsung dari tanaman) dan eksklusi (buah legundi yang rusak dan sudah jatuh ke tanah) yang telah ditentukan peneliti. Buah legundi yang terpilih kemudian diekstraksi, menghasilkan ekstrak etanol buah legundi berkonsentrasi 100% sebagai sampel utama. Uji KHM ekstrak etanol buah legundi

dilakukan dengan delapan konsentrasi sebagai perlakuan, yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39%. Rentang konsentrasi dipilih berdasarkan standar penentuan konsentrasi dari CLSI M07 untuk mengidentifikasi KHM yang efektif dalam menekan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Kelompok kontrol dalam penelitian ini meliputi suspensi *S. aureus* 0,5 McF sebagai kontrol negatif, dan suspensi *S. aureus* 0,5 McF yang ditambahkan antibiotik gentamisin sebagai kontrol positif, serta media MHB sebagai kontrol media.

Penelitian ini dilakukan dengan replikasi sebanyak 3 kali serta pengukuran menggunakan spektrofotometer Uv-Vis dilakukan pengukuran sebanyak 3 kali pengulangan. Penggunaan 3 kali replikasi merupakan praktik yang umum diterapkan dalam penelitian laboratorium untuk memperoleh nilai rata-rata yang lebih representatif serta mengurangi pengaruh kesalahan acak selama proses pengukuran (Masturoh & Anggita, 2018). Semakin sering pengulangan dilakukan, semakin tinggi tingkat akurasi hasil yang diperoleh. Sampel penelitian diambil dengan jumlah sampel minimal dihitung berdasarkan rumus Federer dengan rumus $(r - 1) (t - 1) \geq 15$ (r: jumlah sampel, t: jumlah perlakuan) dengan perhitungan sebagai berikut (Fauziyah, 2019):

$$(r - 1)(12 - 1) \geq 15$$

$$(r - 1)11 \geq 15$$

$$11r - 11 \geq 15$$

$$11r \geq 26$$

$$r \geq 26/11$$

$$r \geq 2,36 \approx 3$$

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, diperoleh nilai $r \geq 2,36$, karena jumlah pengulangan harus berupa bilangan bulat, maka peneliti membulatkan nilai tersebut ke atas menjadi 3 kali pengulangan untuk setiap kelompok agar memenuhi syarat rumus Federer, sehingga diperoleh total data yang dihasilkan adalah 60 data.

1. Alat

Blender, neraca analitik, pipet ukur, mikropipet, *ball* pipet, gelas ukur, *rotary evaporator*, ose bulat *disposable*, *hotplate*, *magnetic stirrer*, bunsen spritus, *biosafety cabinet*, McFarland densitometer, inkubator, autoklaf, labu Erlenmeyer, tabung reaksi steril, tabung sentrifugasi, rak tabung, *cool box*, spatula, wadah urin, botol kaca, saringan, corong, toples kaca, plastik PP, karet gelang, timbangan, APD, kuvet, cawan petri, *refrigerator*. spektrofotometer Uv-Vis.

2. Bahan

Buah legundi, ekstrak pekat buah legundi, akuades steril, etanol 70%, biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, media *Nutrient Agar*, media *Mueller Hinton Broth* (MHB) cair steril, *gentamicin* 80 mg/2 ml, suspensi bakteri 0,5 McF, NaCl 0,9%, tip kuning, tip putih, aluminium foil, kertas saring, strip pH, kapas lemak, tisu, dan alkohol desinfektan.

3. Prosedur kerja

a. Persiapan sampel (pra-analitik)

1) Pembuatan simplisia buah legundi mengacu pada penelitian (Fatmawati dkk., 2020)

a) Proses sortasi dilakukan dengan memilih buah legundi yang memenuhi kriteria inklusi sebanyak 1000 gram lalu dibersihkan dengan air mengalir dan ditiriskan untuk mengurangi sisa air sehingga menurunkan risiko pertumbuhan bakteri.

b) Dikeringkan dengan cara diangin-anginkan hingga sepenuhnya kering.

c) Setelah kering, dilakukan sortasi kering guna memisahkan bagian yang tidak sesuai.

d) Tahap terakhir menghancurkan buah legundi yang telah kering menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus.

2) Pembuatan ekstrak etanol buah legundi mengacu pada penelitian (Fatmawati dkk., 2020)

a) Simplisia buah legundi diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10. Ditimbang serbuk buah legundi yang telah dihaluskan sebanyak 250 gram dimasukkan ke dalam toples, kemudian ditambahkan 2500 ml etanol.

b) Toples ditutup rapat dan disimpan selama 3×24 jam ditutupi aluminium foil agar sepenuhnya gelap untuk proses maserasi.

c) Setelah itu, rendaman disaring menggunakan kertas saring untuk diambil filtratnya.

- d) Filtrat atau hasil penyaringan kemudian dievaporasi pada suhu 45–70°C menggunakan *rotary evaporator* sampai sudah tidak terjadi penguapan hingga diperoleh ekstrak pekat.
 - e) Ekstrak pekat kental disimpan dalam wadah tertutup sebelum digunakan untuk pengujian dan disimpan di *refrigerator*.
- 3) Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA) mengacu pada penelitian (Haryati dkk., 2023)
- a) Berat bubuk media yang diperlukan diperoleh dari perhitungan pembuatan media NA yaitu 28,0 gram media NA per 1000 mL akuades, sehingga bubuk media NA yang ditimbang sebanyak 1,4gram kemudian dilarutkan dengan 50mL akuades.
 - b) Pemanasan media dilakukan menggunakan hotplate sambil diaduk dengan magnetic stirrer hingga larut sempurna.
 - c) Kemudian erlenmeyer ditutup menggunakan kapas lemak dan aluminium foil lalu disterilisasi pada autoklaf.
 - d) Setelah proses sterilisasi selesai, media NA dibiarkan terlebih dahulu, jika sudah dirasa tidak begitu panas, media dituang ke cawan petri steril dengan volume ± 25 mL. Media ditunggu hingga membeku, jika media tidak langsung digunakan, media disimpan di *refrigerator*.
- 4) Pembuatan media *Mueller Hinton Broth* (MHB) mengacu pada pedoman (CLSI, 2018)
- a) Pembuatan media dilakukan dengan perhitungan penimbangan media MHB yaitu 21 gram untuk 1 liter akuades. Dibutuhkan 144 ml media MHB, sehingga media *Mueller Hinton Broth* (MHB) ditimbang sebanyak 4 gram menggunakan neraca analitik, kemudian bubuk media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan

ditambahkan dengan 190, 5 mL akuades menggunakan gelas ukur.

- b) Media kemudian dilarutkan menggunakan magnetic stirrer hingga larut seluruhnya. Penggunaan *hotplate optional* dikarenakan media cair
 - c) Pastikan media dalam keadaan tidak panas lalu diukur pH media MHB dengan stik pH untuk memastikan berada dalam rentang $7,3 \pm 0,1$.
 - d) Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan kapas lemak dan aluminium foil lalu disterilisasi dengan autoklaf.
 - e) Setelah proses sterilisasi selesai, media MHB yang sudah steril jika tidak langsung digunakan, media disimpan terlebih dahulu didalam *refrigerator*.
- 5) Sterilisasi alat dan bahan
- a) Semua bahan (media NA, media MHB, NaCl untuk suspensi) maupun alat bersih dan kering pastikan ditutup dengan kapas lemak dan aluminium foil.
 - b) Pipet ukur 5 ml dan pipet ukur 10 ml di bungkus dengan aluminium foil, cawan petri dibungkus dengan kertas, tabung centrifuge, tip biru dan tip putih dimasukkan kedalam plastik pp dan diikat dengan karet.
 - c) Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit terhitung dari suhu tersebut tercapai.
- 6) Penggoresan kultur bakteri *Staphylococcus aureus* mengacu pada penelitian (Assauqi dkk., 2023)
- a) Diambil beberapa koloni murni dari bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 dan digores menggunakan ose *disposable* ke media NA .
 - b) Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama $\pm 18-24$ jam hingga kultur murni tersebut siap digunakan untuk pembuatan suspensi.

- b. Tahap pelaksanaan (analitik)
 - 1) Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* mengacu pada (EUCAST, 2022)
 - a) Disiapkan 3 tabung reaksi dan 1 erlenmeyer 250 ml. Masukkan NaCl sebanyak 5 ml kedalam tabung reaksi dan 148,5ml NaCl kedalam erlenmeyer
 - b) Koloni *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 yang sudah diinkubasi, diambil dari biakan murni menggunakan ose steril dan dimasukkan ke dalam tabung larutan NaCl 0,9% steril dan dihomogenkan menggunakan vortex hingga mencapai tingkat kekeruhan setara 0,5 McFarland (1×10^8 CFU/ml) yang diukur menggunakan densitometer
 - c) Jika sudah mencapai 0,5 McF, kemudian suspensi tersebut diencerkan dengan mengambil 1,5 ml suspensi 0,5 McFarland pada tabung menggunakan pipet ukur dan dimasukkan kedalam erlenmeyer yang berisi 148,5 ml NaCl 0,9% steril untuk memperoleh suspensi dengan konsentrasi 1×10^6 CFU/ml
 - d) Mengencerkan suspensi 0,5 McFarland sebesar 1:150, sehingga dihasilkan suspensi dalam tabung dengan konsentrasi sekitar 1×10^6 CFU/ml.
 - e) Penggunaan suspensi tidak lebih dari 1 jam.
 - 2) Metode dilusi cair mengacu pada (CLSI, 2018)
 - a) Dilakukan rangkaian satu seri pengenceran, dimana pengulangan uji dilakukan sebanyak tiga kali. Kemudian disiapkan 36 tabung yang sudah disterilkan, kemudian diberi label untuk tabung perlakuan yaitu tabung 1-9, tabung 10 sebagai kontrol positif, tabung 11 sebagai kontrol negatif, dan tabung 12 sebagai kontrol media dan tanda replikasi pertama hingga ketiga.

- b) Uji dimulai dengan memasukkan media MHB ke dalam tabung 2 sampai 9, dan tabung 11 sebanyak 4ml menggunakan pipet ukur. Kemudian Tabung 12 sebagai kontrol media dimasukkan media MHB sebanyak 8ml.
- c) Pembuatan kontrol positif yaitu dimasukkan media MHB sebanyak 3,995 ml menggunakan pipet ukur dan tip biru 995 ul kemudian dimasukkan antibiotik gentamicin 80mg/2ml dengan perhitungan yang sudah ditentukan terlebih dahulu dengan $m_1 \times v_1 = m_2 \times v_2$, sehingga didapat hasil pengenceran antibiotik gentamicin, lalu ditambahkan sebanyak 0,005 ml atau 5 ul kedalam tabung 10 menggunakan tip putih.
- d) Kemudian dilanjutkan dengan memasukkan 4 ml ekstrak kental buah legundi kedalam tabung 1 dan 2, yang dimana tabung 1 yaitu sebagai stok 100%, dan tabung 2 sebagai perlakuan konsentrasi 50%. Pada tabung 2 yang sudah berisi media MHB dan ekstrak buah legundi kemudian dihomogenkan.
- e) Pengenceran bertingkat dilakukan dengan mengambil 4 mL campuran dari tabung 2 dan ditambahkan ke tabung berikutnya (tabung 3 sampai 9 yang sudah berisi 4 ml MHB) menggunakan pipet ukur hingga diperoleh konsentrasi berturut-turut: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39% pada tabung 2 sampai 9.
- f) Tabung 1 sampai 11 uji dilusi tersebut kemudian ditambahkan masing-masing 4 ml suspensi bakteri menggunakan pipet ukur 5ml sehingga volume akhir tiap tabung menjadi 8 ml.
- g) Tabung-tabung tersebut kemudian diukur nilai *optical density* (OD) dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 600 nm untuk nilai

absorbansi awal sebelum dilakukan inkubasi.

- h) Tabung terlebih dahulu di homogenkan menggunakan vortex kemudian pipet menggunakan mikropipet tip biru sebanyak 3 ml kedalam kuvet di dekat bunsen
- i) Setelah pengukuran, semua tabung dimasukkan ke dalam inkubator dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- j) Setelah diinkubasi selama 24 jam, diukur kembali nilai absorbansinya yang sudah dihomogenkan terlebih dahulu menggunakan *vortex* lalu dilakukan pengukuran nilai absorbansi akhir untuk melihat selisih nilai OD (ΔOD) lalu catat hasil.

c. Tahap akhir (post-analitik)

- 1) Bandingkan nilai absorbansi sebelum dan setelah inkubasi dengan perhitungan:
Nilai ΔOD = Selisih nilai absorbansi setelah inkubasi – nilai absorbansi sebelum inkubasi
- 2) Jika nilai ΔOD positif, maka disimpulkan bahwa masih terjadi pertumbuhan bakteri namun jika nilai ΔOD negatif, maka disimpulkan bahwa pertumbuhan bakteri telah dihambat. Konsentrasi hambat minimum ditentukan dengan melihat konsentrasi ekstrak terkecil pada tabung perlakuan dengan nilai $\Delta OD \leq 0$.
- 3) Setelah dilakukan pengujian meja kerja serta alat-alat disterilkan dengan bersih menggunakan alkohol 70% dan dicuci hingga bersih, sisa-sisa sampel pengujian dilakukan proses destruksi pada alat autoklaf.

- 4) Segala alat dan bahan yang bersentuhan atau digunakan dalam penelitian dengan bakteri di sterilisasi kembali pada autoklaf sebelum dibuang maupun di cuci.

E. Jenis, Teknik, dan Instrumen Pengumpulan Data

1. Jenis data

Data primer yang diperoleh dalam penelitian ini adalah selisih nilai absorbansi sebelum dan setelah inkubasi pada berbagai konsentrasi ekstrak yang diuji. Data tersebut digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* melalui metode dilusi cair.

2. Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan melalui percobaan di laboratorium dengan mengukur nilai absorbansi sebelum dan sesudah proses inkubasi menggunakan alat Spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran ini bertujuan untuk melihat perbedaan nilai absorbansi pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol buah legundi, yang dianalisis menggunakan metode dilusi cair.

3. Instrument pengumpulan data

Pada penelitian ini, perangkat yang dimanfaatkan untuk pengumpulan data meliputi APD, spektrofotometri Uv-Vis, alat tulis dan kamera.

F. Teknik Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diperoleh dari pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk melihat selisih nilai *optical density* OD (ΔOD). Konsentrasi hambat minimum ditentukan dengan melihat konsentrasi ekstrak terkecil pada tabung perlakuan dengan nilai $\Delta OD \leq 0$ yang masih mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Data selanjutnya dianalisis menggunakan metode tabulasi, yakni dengan penyajian bentuk tabel serta uraian naratif untuk menggambarkan nilai absorbansi pada setiap konsentrasi perlakuan.

2. Analisis data

Penelitian ini menggunakan analisis data deskriptif kuantitatif untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri ekstrak buah legundi terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum dilakukan berdasarkan konsentrasi terendah yang ditandai dengan selisih nilai absorbansi mendekati $\Delta OD \leq 0$.

G. Etika Penelitian

Dalam penelitian ini, prinsip etika yang diterapkan meliputi *beneficence*, yaitu prinsip yang mana memaksimalkan manfaat penelitian. Selain itu, diterapkan juga prinsip *non maleficence*, yaitu prinsip yang mana mempertimbangkan risiko yang akan terjadi selama penelitian untuk tidak merugikan, yang memastikan subjek penelitian tidak hanya dijadikan sebagai alat dan dilindungi dari tindakan penyalahgunaan (Masturoh dan Anggita, 2018).