

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian dengan metode eksperimental murni (*True-Experimental Reserach*) menggunakan desain *Post-test Only Control Group*. Desain ini adalah penelitian eksperimen yang hanya melakukan pengukuran pada kelompok eksperimen dan kelompok kontrol setelah perlakuan. Penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran untuk mengetahui aktivitas antibakteri pada ekstrak kombinasi daun awar-awar (*Ficus septica* Burm.F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan April 2025 – Juli 2025.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Terpadu dan Mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang pada bulan April 2025 – Juli 2025.

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi : ekstrak daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.), ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.), etanol 70%, kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 33591D-5, serbuk klindamisin, media agar *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB) *aquadest*, NaCl fisiologi 0,9%, Mc Farland 0,5.

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan penelitian meliputi : timbangan analitik, erlenmeyer, toples kaca, spatula kayu, *rotary evaporator*, cawan porselen, pipet, blender, gelas ukur, batang pengaduk, kaca arloji, corong kaca, *water bath*, rak tabung reaksi, vial, oven, autoklaf, inkubator, mikropipet, lemari pendingin, *blue tip*, *hot plate*, bunsen,

magnetic stirrer, *colony counter*, ose bulat, *cork borer*, ayakan mesh no 42, sendok *stainlees*, sendok tanduk.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi

Populasi sampel penelitian merupakan keseluruhan pada objek ataupun subjek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang diperoleh dari Desa Peniwen, Kromengan, Kabupaten Malang yang tumbuh liar dan budidaya untuk daun sirih hijau (*Piper betle* L.). Populasi kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 33591D-5 yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang di kota Malang.

3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah bagian dari populasi yang dipilih mewakili karakteristik suatu populasi secara menyeluruh. Penelitian ini menggunakan ekstrak daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dan bakteri uji yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 33591D-5

1. Daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.)

Kriteria inklusi : memiliki daun berbentuk oval atau oval bulat telur dengan pangkal yang membulat dan ujung yang menyempit memiliki tepi rata 9-30 cm kali 9-16 cm, daun berwarna hijau tua yang mengkilat disertai bitnik yang pucat dari bawah daun berwarna hijau muda, dengan waktu pemanenan dilakukan pagi hari.

Kriteria eksklusi : daun yang kering, berwarna kuning, terdapat hama atau bekas hama

2. Daun sirih hijau (*Piper betle* L.)

Kriteria inklusi : Pemetikan daun sirih dilakukan ketika tanaman berumur 2-4 minggu, dengan memetik daun dewasa yang terletak pada cabang samping, daun memiliki panjang 5-15 cm dan lebar 4-10 cm, daun yang sudah tua dengan warna hijau tua, dengan waktu pemanenan dilakukan pagi hari.

Kriteria eksklusi : daun yang kering, berwarna kuning, terdapat hama atau bekas hama, bercak hitam atau kecoklatan

3.5 Identifikasi Variabel

3.5.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Penelitian ini menggunakan variabel bebas yaitu ekstrak etanol 70% dari kombinasi daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang akan diujikan pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi sumuran.

3.5.2 Variabel Terikat (*Dependent*)

Penelitian ini menggunakan variabel dependent yaitu zona hambat dan luas zona hambat yang terbentuk dari perlakuan kombinasi ekstrak daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.5.3 Variabel Terkontrol

Penelitian ini menggunakan variabel terkontrol, yaitu melakukan maserasi dengan pelarut etanol 70%, media pertumbuhan bakteri yaitu *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan waktu inkubasi bakteri selama 1x24 jam dengan suhu inkubator 37°C.

3.6 Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak merupakan sediaan kental berasal dari simplisia nabati yang diperoleh dari ekstraksi melalui metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* menggunakan suhu 50°C dengan kecepatan 70 rpm. Hasil dari ekstraksi dipekatkan kembali di atas *water bath* untuk memperoleh hasil ekstrak yang lebih kental.
2. Maserasi merupakan ekstraksi yang dilakukan dengan cara perendaman sampel menggunakan pelarut organik etanol 70% dengan suhu ruang dan wadah tertutup selama 3x24 jam.
3. Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang bersifat fakultatif anaerob, bakteri ini memiliki permukaan yang halus, berkilau,

menonjol, berwarna abu-abu dalam media padat, media selektif pertumbuhan dari *Staphylococcus aureus* adalah *Mannitol Salt Agar* (MSA).

4. Zona hambat merupakan daerah jernih yang terbentuk disekitar media pertumbuhan bakteri, menandakan adanya pengaruh dari ekstrak kombinasi daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.
5. Daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) berbentuk oval atau oval bulat telur dengan pangkal yang membulat dan ujung yang menyempit memiliki tepi rata 9-30 kali 9-16 cm, daun berwarna hijau tua yang mengkilat disertai bintik yang pucat dari bawah daun berwarna hijau muda.
6. Daun sirih (*Piper betle* L.) dipetik ketika tanaman berumur 2-4 minggu, dengan memetik daun dewasa yang terletak pada cabang samping, daun memiliki panjang 5-15 cm dan lebar 4-10 cm, daun tua.

3.7 Metode Analisis Data dan Pengujian Hipotesa

3.7.1 Metode Analisis

1. Zona hambat dan perbandingan

Pengukuran zona hambat dilakukan setelah 1x24 jam menggunakan mistar berskala. Diameter dapat dihitung dari tepi (*breakpoint*) ke tepi yang bersebrangan melewati pusat dari lubang sumuran. Apabila disekitar lubang sumuran tidak terdapat zona hambat maka dinyatakan bahwa diameter zona hambatnya adalah 0 mm (Alouw & Lebang, 2022). Menurut Datta *et al.*, 2019 aktivitas zona hambat pada antibakteri dikelompokkan menjadi 4 kategori sebagai berikut :

Tabel 3.1 Kategori Zona Hambat Menurut Datta *et al.*, 2019

Kategori	Diameter
Sangat Kuat	>20-30 mm
Kuat	>10-20 mm
Sedang	5-10 mm
Lemah	<5 mm

3.7.2 Pengujian Hipotesa

1. Determinasi Sampel

Penelitian ini diawali dengan melakukan uji determinasi daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.). Pengujian ini merupakan proses dari menentukan nama atau jenis tumbuhan secara spesifik. Uji determinasi dilaksanakan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medika Batu.

2. Pembuatan Serbuk Simplisia

Masing-masing sampel daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) terlebih dahulu dilakukan sortasi basah yaitu memisahkan daun dari batang dan buahnya kemudian di cuci bersih dan dilanjutkan dengan penimbangan bobot sampel basah, dan dilakukan pengeringan menggunakan oven pada suhu 50°C hingga kering selama 3x24 jam. Proses penyerbukan dilakukan setelah proses pengeringan selesai, penyerbukan menggunakan blender kemudian dilakukan pengayakan dengan ayakan *mesh* 42 yang bertujuan untuk memperoleh besaran partikel yang sama untuk memaksimalkan dalam proses ekstraksi.

3. Ekstraksi Daun Awar-Awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.)

Ekstraksi daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) sama-sama dilakukan dengan cara maserasi yaitu ekstraksi dingin. Sampel ditimbang sebanyak 300 g serbuk dan dimasukkan kedalam toples kaca. Serbuk sampel masing-masing ditambahkan dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:5 (b/v) yaitu 300 g serbuk sampel dilarutkan dalam 1,5 L pelarut etanol 70%. Sampel yang telah direndam dengan pelarut dalam toples kaca, ditutup dan ditunggu selama 3 kali 24 jam dengan suhu kamar dan tempat yang tidak terpapar sinar matahari, sambil sesekali dilakukan pengadukan, setelah itu, sampel disaring dan dipisahkan antara ampas dan filtrat, selanjutnya ampas diremaserasi kembali menggunakan etanol 70% sebanyak 2 kali. Hasil dari masing-masing filtrat dicampur yaitu sejumlah 3 filtrat. Filtrat atau bisa disebut dengan maserat dapat dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 70 rpm hingga menyisakan ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh dipekatkan

kembali dalam *water bath* dengan suhu 50°C hingga ekstrak menjadi sangat kental yang memiliki tekstur seperti pasta dan memiliki nilai rendemen tidak kurang 10% (Riyanto & Haryanto, 2023; Badriyah *et al.*, 2022). Setelah memperoleh ekstrak kental dilakukan penimbangan kemudian di hitung nilai rendemen dengan rumus sebagai berikut (Kusuma & Aprileili, 2022):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{bobot awal simplisia}} \times 100\%$$

4. Skrining Fitokimia

a) Uji Alkaloid

Uji dilakukan dengan memasukkan masing-masing larutan ekstrak daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) kedalam tabung reaksi larutan terbagi menjadi 3, tabung pertama ditetesi pereaksi mayer, tabung kedua ditetesi *dragendorff*, tabung ketiga *bouchardat*, pereaksi dapat ditambahkan 3-4 tetes, hasil dinyatakan positif jika terdapat endapan (FHI, 2017).

b) Uji Flavonoid

Uji dilakukan dengan memasukkan masing-masing larutan ekstrak daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) kedalam tabung reaksi yang berbeda sebanyak 1 mL kemudian di ditetesi 3-4 tetes HCl pekat dan diberi serbuk Mg sebanyak 1 spatula. Hasil yang akan diperoleh dinyatakan positif flavonoid jika warna berubah menjadi merah atau kuning (FHI, 2017).

c) Uji Tanin/Fenol

Uji dilakukan dengan memasukkan masing-masing larutan ekstrak daun awar-awar (*Ficus septica* Burm.F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) kedalam tabung reaksi yang berbeda sebanyak 1 mL kemudian di ditetesi 3-4 tetes FeCl₃ 1%. Hasil dinyatakan positif dengan ditunjukkan timbulnya warna lebih gelap dari blanko (FHI, 2017).

d) Uji Saponin

Uji dilakukan dengan memasukkan masing-masing larutan ekstrak daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) kedalam tabung reaksi yang berbeda sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan air panas dan

dikocok dengan kuat. Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk buih permanen selama 30 detik (FHI, 2017).

e) Uji Terpenoid

Uji dilakukan dengan memasukkan masing-masing larutan ekstrak daun awar-awar (*Ficus septica* Burm.F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) kedalam tabung reaksi yang berbeda sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan larutan reagen *Bouchardat* sebanyak 3-4 tetes. Hasil dinyatakan positif steroid apabila terjadi perubahan warna menjadi hijau kebiruan dan berubah menjadi jingga apabila mengandung terpenoid (FHI, 2017).

5. Steriliasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dilakukan dengan mencuci dan mengeringkan alat yang akan digunakan dalam penelitian. Alat dibungkus dengan kertas *samson* atau *aluminium foil*. Dipastikan semua alat berada pada posisi dan kondisi yang aman. Peralatan seperti pinset yang akan digunakan dibakar terlebih dahulu diatas api bunsen kemudian media disterilkan, dilanjutkan dengan memasukkan alat dan bahan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm, sedangkan alat yang tidak tahan panas dapat disterilisasi dengan alkohol 70% (Katili *et al.*, 2020; Lestari *et al.*, 2016).

6. Pembuatan Media

a) Media Nutrient Agar

Nutrient agar (NA) oxoid (28gram/1000mL) ditimbang sebanyak 1,4 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 50 mL *aquadest*, campuran tersebut dilakukan pemanasan diatas *hot plate* hingga mendidih dan larut secara sempurna, ditandai dengan larutan menjadi jernih. Larutan NA yang telah jernih dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL lalu di sumbat menggunakan kapas steril dilapisi kasa steril dan plastik *warp*, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dalam waktu 15 menit. Setelah proses sterilisasi tabung reaksi segera dimiringkan pada sudut 45° untuk membuat agar miring dan dibiarkan hingga media memadat.

b) Media *Mueller Hinton Agar*

Mueller Hinton Agar (MHA) oxoid (38gram/1000mL) ditimbang sebanyak 13,3 gram dilarutkan dalam 350 mL *aquadest* dan dimasukkan kedalam erlenmeyer, dilakukan pemanasan diatas *hot plate* hingga mendidih, kemudian larutan MHA disterilisasi terlebih dahulu dalam autoklaf pada suhu 121°C dalam waktu 15 menit. Setelah sterilisasi larutan MHA di tuangkan dalam cawan petri steril masing-masing sebanyak ± 18 mL. Cawan petri berisi MHA dibiarkan hingga memadat, selanjutnya melapisi cawan petri dengan plastik *warp* untuk menghindari kontaminasi lalu media dimasukkan kedalam inkubator.

c) Media *Nutrient Broth*

Nutrient Broth (NB) oxoid (14 gram/1000mL) ditimbang sebanyak 0,28 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 20 mL *aquadest*. Pembuatan *Nutrient Broth* tanpa melakukan pemanasan, melainkan cukup diaduk hingga homogen dan larut sempurna, kemudian larutan NB dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 5 mL ditutup dengan kapas yang dilapisi kasa steril dan plastik *warp* untuk dilakukan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dalam waktu 15 menit (Jungjunan *et al.*, 2023).

7. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan mengambil satu ose pada biakan murni selanjutnya digoreskan pada media agar dengan permukaan miring, kemudian dilakukan inkubasi dengan suhu 37°C dalam kurun waktu 24 jam.

8. Pembuatan Larutan Kontrol

Pada penelitian ini kontrol positif berjumlah 3 kontrol positif yaitu antibiotik klindamisin dan ekstrak tunggal dari masing-masing sampel. Kontrol negatif untuk penelitian ini menggunakan *aquadest*. Antibiotik Klindamisin dibuat dengan konsentrasi 10% (b/v) ditimbang sebanyak 1 g serbuk dilarutkan dalam labu ukur 10mL *aquadest*. Kontrol positif untuk daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dibuat sesuai dengan KHM yang terpilih untuk uji aktivitas antibakteri.

9. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) adalah menggunakan empat variasi konsentrasi yaitu 20%, 25%, 30% dan 35%. Masing-masing ekstrak, baik daun awar-awar maupun daun sirih hijau ditimbang secara terpisah sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan kemudian dilarutkan dalam 10 mL *aquadest*. Pada konsentrasi 20% dilakukan penimbangan sebanyak 2 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 mL *aquadest*. Konsentrasi 25% dilakukan penimbangan sebanyak 2,5 gram ekstrak dalam 10 mL *aquadest*. Konsentrasi 30% dilakukan penimbangan sebanyak 3,5 gram dalam 10 mL *aquadest*. Konsentrasi 35% dilakukan penimbangan sebanyak 3,5 gram dalam 10 mL *aquadest*, selanjutnya keempat larutan ekstrak tersebut dilakukan pengujian. Konsentrasi yang telah terpilih pada kategori yang sama dalam penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) maka akan dilanjutkan dengan formulasi kombinasi kedua ekstrak.

10. Formulasi Kombinasi Daun Awar-Awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.)

Formulasi kombinasi ekstrak daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dibuat dengan perbandingan 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1 masing-masing perbandingan memiliki volume total 5 mL.

Tabel 3. 2 Perbandingan Kombinasi Ekstrak

Perbandingan daun sirih hijau (<i>Piper betle</i> L.) dan daun awar-awar (<i>Ficus septica</i> Burm. F.)		
Daun Sirih Hijau	:	Daun Awar-awar
1	:	1
1	:	2
2	:	1
1	:	3

3 : 1

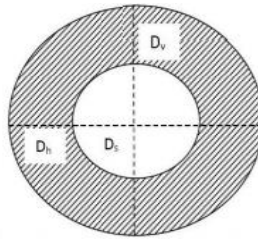
Keterangan : perbandingan pengambilan volume pada kombinasi daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dan daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) 10 mL:10 mL (1:1), 6,6 mL:13,3 mL (1:2), 13,3 mL:6,6 mL (2:1), 5 mL:15 mL (1:3), 15 mL:5 mL (3:1).

11. Pembuatan Suspensi

Suspensi bakteri dibuat dengan cara mengambil 1 ose bakteri dari biakan murni pada *Nutrient Agar* (NA), kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi yang sudah berisi 9 ml larutan NaCl fisiologi 0,9% steril dan dihomogenkan dengan cara di *vortex*, kemudian kekeruhan suspensi bakteri disamakan dengan standar Mc Farland 0,5 (Rizki *et al.*, 2021).

12. Pengujian Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran dengan teknik *pour plate* dimana dilakukan penuangan suspensi bakteri yang telah di suspensikan dalam NaCl fisiologi 0,9% kedalam cawan petri steril sebanyak 1 ml atau setara dengan 1000 μ L kemudian, setelah penambahan biakan ditambahkan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebanyak 18mL dihomogenkan dengan menggerakkan cawan petri membentuk angka delapan dan ditunggu hingga agar memadat. Setelah media memadat dengan sempurna, dilakukan pelubangan menggunakan *cork borer* yang memiliki diameter 6 mm untuk membentuk sumuran. Setiap cawan petri dibuat tiga sumuran sebagai replikasi uji, kecuali pada kontrol positif (klindamisin) yang hanya dibuat satu sumuran per cawan petri. Cawan petri yang berisi agar dan biakan bakteri dibuat menjadi 11 kelompok uji, terdiri dari 5 kelompok formulasi kombinasi yaitu 1:1, 1:2, 2:1, 1:3 dan 3:1, 2 kelompok kontrol ekstrak yaitu sirih hijau dan awar awar, 1 kelompok kontrol negatif yaitu aquadest dan 3 kelompok kontrol positif yaitu klindamisin dan pengambilan dari larutan uji sebanyak 1-2 tetes kedalam sumuran, kemudian cawan petri di lapisi dengan plastik *wrap* dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam waktu 24 jam. Setelah diinkubasi diamati luas zona hambat dan hitung diameter dalam satuan milimeter dengan rumus sebagai berikut (Kipimbob *et al.*, 2019) :



Gambar 3.1 Rumus Diameter Luas Zona Hambat

$$\text{Diameter zona hambat} = \frac{(Dv - Ds) + (Dh - Ds)}{2}$$

Keterangan :

Dv = Diameter vertikal

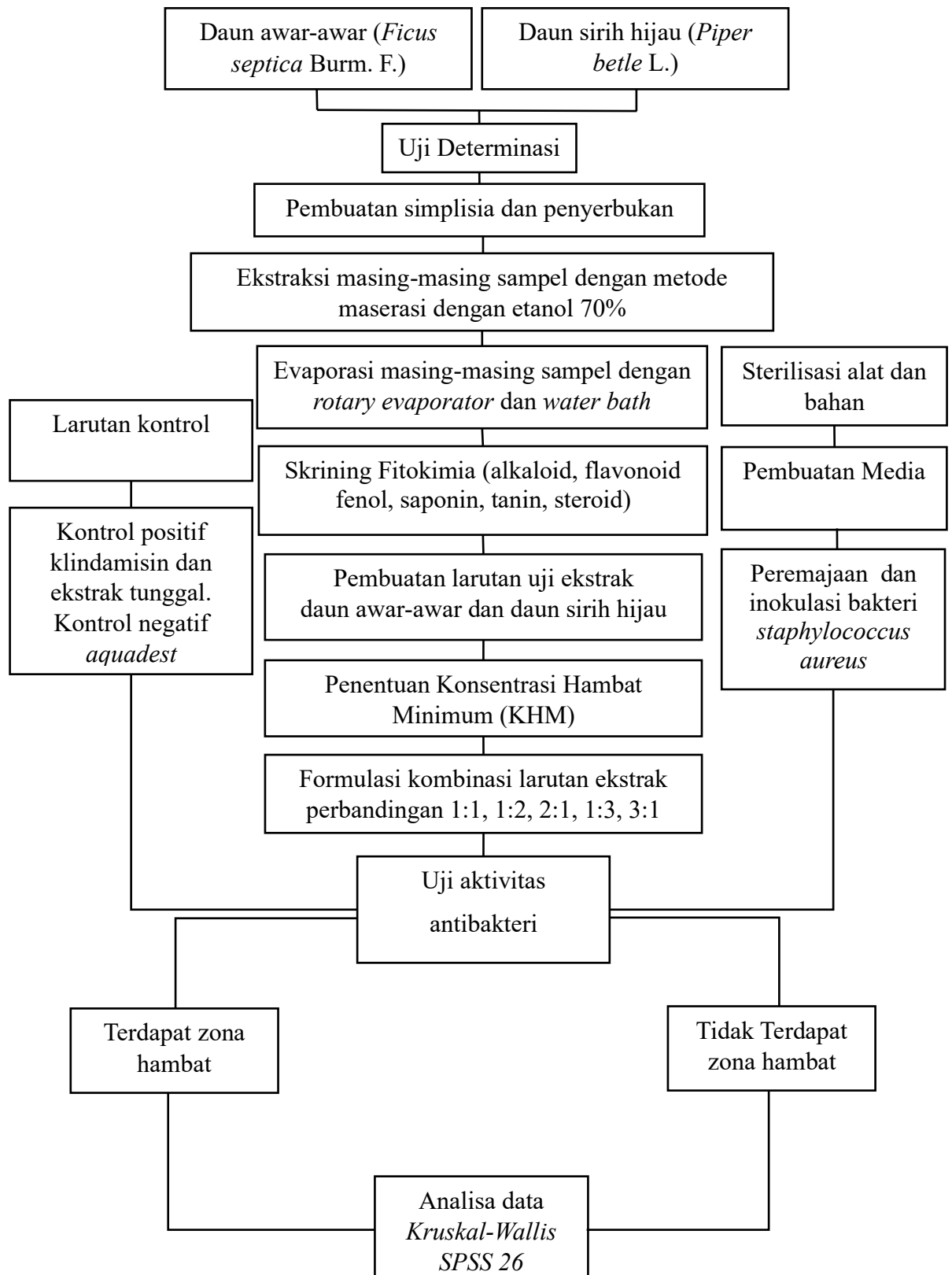
Dh = Diameter horizontal

Ds = Diameter sumuran

13. Analisis Data

Uji statistik nonparametrik adalah jenis statistik yang tidak membutuhkan sebuah asumsi mengenai distribusi data populasi. Berbeda dengan statistik parametrik, metode ini tidak mengharuskan data memiliki sebaran normal. Uji nonparametrik cocok digunakan untuk menganalisis data dalam skala nominal maupun ordinal, karena jenis data tersebut umumnya tidak mengikuti distribusi normal. Pada penelitian ini data zona hambat yang diperoleh untuk aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak daun awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi sumuran akan dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* menggunakan *software SPSS 26*. Uji *Kruskal-Wallis* merupakan salah satu metode nonparametrik yang sering digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan antara kelompok variabel independent terhadap variable dependen (Rozi *et al.*, 2022).

3.8 Kerangka Operasional



Gambar 3.2 Kerangka Operasional