

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1. Desain Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif menggunakan metode eksperimental laboratorium. Penelitian ini melihat dan mengukur kemampuan hambat dari ekstrak daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* pada konsentrasi ekstrak yang berbeda, dan dibandingkan dengan kontrol positif serta melihat Konsentrasi Hambat Minimum yang terjadi.

#### **3.2. Waktu dan Tempat Penelitian**

##### **3.2.1. Waktu Penelitian**

Waktu penelitian dimulai pada bulan April sampai dengan Juli 2025.

##### **3.2.2. Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Terpadu dan Mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang.

#### **3.3. Bahan dan Alat**

##### **3.3.1. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, timbangan analitik, oven, gelas ukur, *beaker glass*, pipet tetes, erlenmeyer, mikropipet, batang pengaduk, *rotary evaporator*, cawan petri, *hot plate*, inkubator, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spatula, kapas, kasa, bunsen, spatula Drigalski, corong, *vortex*, labu ukur, karet gelang, kantong plastik, *waterbath*, toples kaca, cawan porselen, sendok tanduk, kaca arloji, jarum ose, *magnetic stirrer*, kertas cakram, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), lemari pendingin, *blue tip*, pinset, ayakan mesh no 40, jangka sorong, dan kertas saring.

### 3.3.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah serbuk daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.), pelarut etanol 70%, bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Nutrien Agar* (NA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Nutrient Broth* (NB), serbuk klindamisin 10% (Albiotin), *aquadest*, NaCl 0,9% serbuk Mg, HCl pekat, reagen *Lieberman-Burchardat*, reagen *Mayer*, FeCl<sub>3</sub> 1%, dan reagen *Dragendorff*.

### 3.4 Populasi dan Sampel

Populasi merupakan wilayah yang terdiri dari obyek atau subyek yang memiliki kualitas dan karakteristik tertentu yang sudah ditetapkan oleh peneliti kemudian dipelajari dan dapat ditarik kesimpulan (Rikomah, 2018). Populasi pada penelitian ini daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) yang diambil di dataran tinggi Desa Pujiharjo, Kecamatan Tirtoyudo, Kabupaten Malang, Provinsi Jawa Timur.

Sampel merupakan sebagian dari jumlah yang dimiliki oleh populasi. Sampel penelitian ini adalah ekstrak daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.). Adapun kriteria sampel yang meliputi kriteria inklusi dan kriteria eksklusi yang dapat digunakan untuk menentukan dapat atau tidaknya sampel digunakan (Rikomah, 2018).

#### a. Kriteria inklusi

Kriteria inklusi merupakan kriteria sampel atau subjek dalam penelitian yang dapat memenuhi syarat sebagai sampel atau tidak.

Kriteria inklusi penelitian ini:

1. Daun segar berwarna hijau
2. Bebas dari hama dan pestisida
3. Tidak mengalami kecacatan seperti pertumbuhan daun tidak normal atau mengkerut
4. Daun utuh
5. Daun dipetik pada pagi hari

b. Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi adalah kriteria yang menyatakan subjek penelitian tidak dapat dipakai atau tidak memenuhi syarat inklusi sebagai sampel.

1. Terkontaminasi hama dan pestisida seperti daun berbintik, terdapat gumpalan putih berbulu (hama)
2. Daun layu dan kering
3. Daun berwarna kuning/coklat, hijau tua/muda
4. Daun berlubang akibat ulat dan serangga
5. Mengalami kecacatan pertumbuhan seperti mengkerut atau pertumbuhan tidak normal

### 3.5. Definisi Operasional Variabel Penelitian

#### 3.5.1. Definisi Operasional

1. Tumbuhan Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) diambil dari bagian daun, yang bebas dari hama dan pestisida, daun berwarna hijau, daun yang utuh tidak mengalami kecacatan seperti mengkerut atau pertumbuhan tidak normal, layu, dan berwarna kekuningan.
2. Bakteri *Staphylococcus epidermidis* merupakan bakteri dari genus yang berbentuk bulat tersebar seperti buah anggur, bersifat anaerob fakultatif,
3. Ekstrak merupakan suatu larutan kental yang diolah melalui proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian ekstrak dipisahkan dengan *rotary evaporator* dan *waterbath* sehingga diperoleh larutan kental/pekat.
4. Uji daya hambat merupakan suatu pengujian untuk melihat kemampuan zat uji yakni ekstrak etanol 70% daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* menggunakan metode difusi cakram, yang dinilai dari zona bening di sekitar media pertumbuhan bakteri.
5. Skrining fitokimia merupakan uji yang dilakukan untuk melihat senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada suatu tumbuhan. Dilakukan

dengan menggunakan pereaksi *Dragendorff*, *Liebermann-Burchard*, dan *Mayer*.

### 3.5.2. Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi dari ekstrak etanol 70% daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) yang diambil pada seri 2000 ppm, 1800 ppm, 1600 ppm, 1400 ppm, 1200 dan 1000 ppm.

### 3.5.3. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini uji daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dari ekstrak etanol 70% daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.).

### 3.5.4. Variabel Terkontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah waktu dari proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, suhu penguapan ekstrak, suhu inkubasi bakteri, dan waktu pengujian antibakteri.

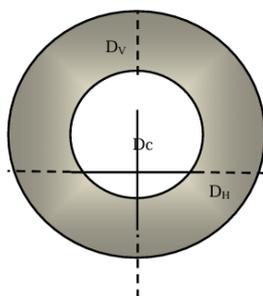
## 3.6. Metode Analisis Data dan Pengujian Hipotesa

### 3.6.1. Metode Analisis Data

#### 1. Zona Hambat dan Perbandingan

Pengamatan zona hambat bakteri dilakukan 1×24 jam masa inkubasi. Daerah bening yang dihasilkan pada media di sekitar cakram merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik dan sampel uji. Hasil tersebut dinyatakan sebagai lebar diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dalam satuan millimeter (mm) menggunakan alat jangka sorong. Diameter zona hambat dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolangan. Pengukuran zona hambat yang terbentuk diukur secara vertikal dan horizontal, diukur dengan menggunakan rumus (Toy *et al.*, 2015) :

$$\frac{(DV - DC) + (DH - DC)}{2}$$



Keterangan :

	: Zona hambat
$D_v$	: Diameter vertikal
$D_h$	: Diameter horisontal
$D_c$	: Diameter cakram

Gambar 3. 1 Pengukuran Zona Hambat

Tabel 3. 1 Kategori Diameter Zona Hambat (Daris *et al.*, 2023)

Diameter	Kekuatan Daya Hambat
< 5 mm	Lemah
6 – 10 mm	Sedang
11 – 20 mm	Kuat
> 21 mm	Sangat kuat

### 3.6.2. Pengujian Hipotesa

#### 1. Determinasi

Determinasi tumbuhan dilakukan untuk mengungkap kebenaran mengenai identitas dari tumbuhan uji, hasil kebenaran identitas tersebut menjadi acuan untuk melihat bahwa tumbuhan benar-benar tumbuhan yang diinginkan untuk dilakukan penelitian atau bukan. Daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) yang digunakan di determinasi di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu.

#### 2. Pengolahan Sampel daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.)

Daun Getih-getihan sebanyak 5 kg melewati proses sortasi basah dengan mencuci daun pada air mengalir untuk membersihkan kotoran dan tanah yang menempel pada daun Getih-getihan, dan ditiriskan. Dilakukan pengeringan daun dengan menggunakan oven pada suhu  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ , tidak terpapar dengan sinar

matahari langsung. Simplisia dihaluskan menggunakan blender, hingga diperoleh serbuk halus. Serbuk diayak dengan ayakan mesh no 40, serbuk disimpan pada wadah kering dan bersih dan diberi *silica gel* agar tidak lembab.

### 3. Ekstraksi daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.)

Pembuatan ekstrak daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) dengan metode maserasi. Sebanyak 500 gram serbuk daun Getih-getihan dimasukkan ke dalam wadah gelas/kaca berukuran 5 L, ditambahkan pelarut etanol sebanyak 2,5 L (1:5 b/v). Rendaman sampel ditutup dan ditunggu selama 3×24 jam diaduk dalam 24 jam sekali. Setelah 3×24 jam, rendaman disaring dan diperoleh maserat beserta residu sampel. Maserat disimpan pada wadah lain, kemudian dilakukan remaserasi dengan menambah 2,5 L pelarut etanol 70% dan dibiarkan selama 3x24 jam diaduk dalam 24 jam sekali. Kemudian rendaman disaring, diperoleh maserat dan residu. Hasil maserat pertama pelarut etanol 70% dijadikan satu dalam satu wadah, dan diperoleh maserat ekstrak etanol 70% daun Getih-getihan.

Maserat dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan tekanan 15- 20 psi dan kecepatan 70 rpm, sehingga diperoleh ekstrak kental daun Getih-getihan. Perlakuan dilanjutkan dengan menguapkan ekstrak pada *waterbath* guna menguapkan sisa pelarut yang masih ada pada ekstrak. Ekstrak akan dihitung % rendemennya dengan rumus berikut:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

### 4. Skrining Fitokimia

#### a. Uji Saponin

Sebanyak 3 gram ekstrak kental daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) dilarutkan dalam air panas 30 mL, larutan diaduk hingga homogen kemudian disaring dengan kertas saring untuk memperoleh larutan yang bebas dari gumpalan ekstrak. Diambil 20 tetes atau setara dengan 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk uji saponin, ditambahkan 5 mL *aquadest* panas di dalam tabung reaksi kemudian dikocok selama 10 detik hingga timbul busa. Tabung reaksi ditempatkan dalam posisi tegak selama 10 menit. Jika busa tidak hilang maka ekstrak mengandung senyawa saponin.

b. Uji Flavonoid

Sebanyak 1 mL larutan ekstrak daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) ditambahkan 3 tetes HCL pekat dan 1 sendok stainless serbuk magnesium, dikocok pelan. Ekstrak mengandung senyawa flavonoid jika terbentuk warna kuning, jingga dan merah.

c. Uji Alkaloid

Sebanyak 1 mL larutan ekstrak daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) dilakukan uji alkaloid dengan menggunakan pereaksi *Dragendorff*, pereaksi *Mayer* dan pereaksi *Lieberman-Bouchardstaphy*, masing-masing pereaksi ditambahkan sebanyak 3 tetes. Ekstrak mengandung senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan merah pada penambahan pereaksi *Dragendorff*, endapan putih pada penambahan pereaksi *Mayer* dan endapan coklat hingga hitam pada penambahan pereaksi *Lieberman-Bouchardat*.

d. Uji Terpenoid/Steroid

Sebanyak 1 mL larutan ekstrak daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) ditambahkan 3 tetes pereaksi *Lieberman-Burchard*. Ekstrak mengandung triterpenoid apabila warna berubah menjadi jingga, jika warna hijau kebiruan maka terdapat kandungan steroid.

e. Uji Tanin/Fenol

Sebanyak 1 mL larutan ekstrak daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) ditambahkan dengan 3 tetes  $\text{FeCl}_3$  1% dalam tabung reaksi. Ekstrak mengandung senyawa tanin/fenol jika ekstrak lebih gelap dari blanko.

5. Sterilisasi alat

Peralatan dicuci bersih sebelum digunakan, dikeringkan kemudian alat seperti cawan petri dibungkus dengan kertas coklat, pinset dilapisi dengan aluminium foil, kertas cakram dimasukkan dalam vial dan diwrap, *blue tip* dimasukkan pada beaker glass kemudian ditutup rapat dengan aluminium foil. Sebelum dimasukkan autoklaf masing-masing alat dibungkus dengan plastik dan di tali dengan karet gelang. Disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Alat yang telah disterilisasi dimasukkan ke dalam oven dengan

suhu 90°C selama 30 menit untuk menghilangkan air yang menempel pada peralatan.

## 6. Pembuatan Media

### a. Media Agar Miring *Nutrient Agar* (oxid)

Ditimbang sebanyak 0,28 gram dilarutkan dalam 10 mL *aquadest* (28g/1000 mL) ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya dihomogenkan dengan *hot plate* hingga mendidih, kemudian NA dituangkan masing-masing sebanyak 5 mL pada 2 tabung reaksi dan ditutup dengan sumbat kapas. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, dibiarkan pada suhu ruang  $\pm$  30 menit hingga media memadat pada kemiringan  $\pm$  30°. Media agar miring digunakan untuk peremajaan bakteri.

### b. Media *Mueller Hinton Agar* (oxid)

Dibuat dengan menimbang serbuk media sebanyak 6,84 gram, dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL (38 g/1000 mL), granul MHA dilarutkan dengan *aquadest* 180 mL dan dipanaskan hingga mendidih kemudian ditutup dengan kasa kapas. Media harus disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Setelah melalui proses sterilisasi media dituangkan sebanyak 18 mL pada masing-masing cawan petri. Media didiamkan hingga membentuk tekstur agar (padat).

### c. Media *Nutrient Broth* (oxid)

Dimasukkan 0,252 gram bubuk NB (14 g/1000 mL) ke dalam erlenmeyer diberi 18 mL *aquadest*. Media dimasukkan pada tabung reaksi masing-masing sebanyak 9 mL dan ditutup dengan sumbat kapas kemudian diwrap, dilakukan sterilisasi dengan autoklaf. NB dibuat untuk reaktivasi kultur bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

### d. Inokulasi bakteri uji

Bakteri diambil dengan jarum ose steril, ditanamkan pada media agar miring dengan cara menggores secara zig-zag. Media diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

e. Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan (Mc Farland 0,5)

Larutan  $H_2SO_4$  1% sebanyak 9,95 mL dicampurkan dengan larutan  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  1,175% sebanyak 0,05 mL dalam erlenmeyer. Kemudian larutan dikocok sampai terbentuk larutan keruh. Larutan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji.

f. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan mengambil biakan dari agar miring menggunakan ose, kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL NaCl 0,9%, hingga diperoleh larutan keruh sesuai dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland.

g. Pembuatan Larutan Kontrol Positif dan Negatif

Kontrol positif menggunakan antibiotik klindamisin 10% (Albiotin) dibuat dengan menimbang 1 gram serbuk klindamisin dan dilarutkan dengan 10 mL *aquadest*. Sementara kontrol negatif menggunakan *aquadest* steril.

h. Pembuatan Larutan Sampel

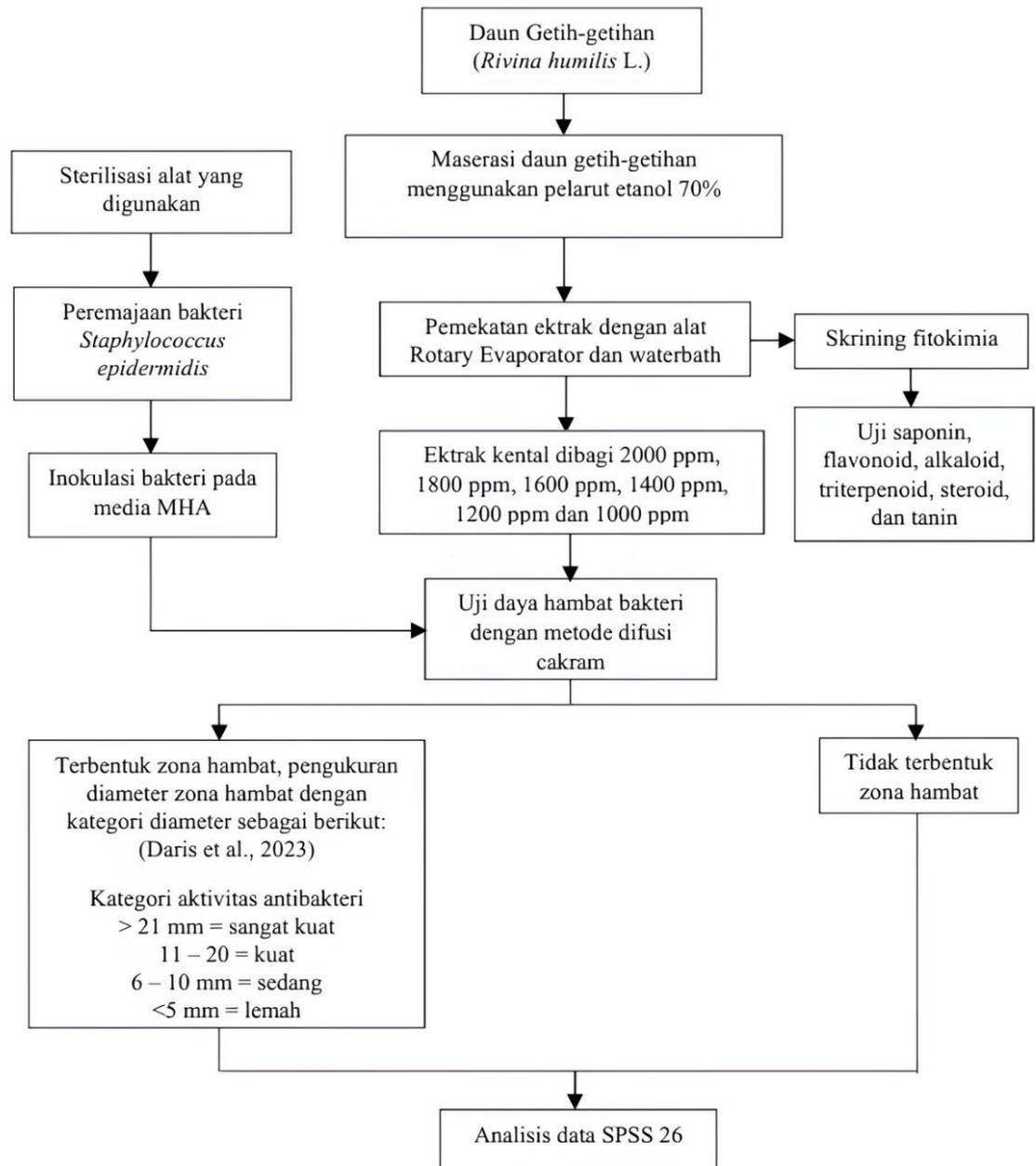
Pembuatan larutan ekstrak daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) dengan membuat larutan induk pada 2000 ppm, dengan hasil perhitungan 100 mg ekstrak sampel dilarutkan pada 50 mL *aquadest*. Kemudian untuk seri 1800 ppm dengan mengambil 45 mL larutan induk dan ditambahkan 5 mL *aquadest*. Pada seri 1600 ppm diambil dari larutan 1800 ppm sebanyak 40 mL dan ditambah *aquadest* 10 mL. Seri 1400 ppm mengambil dari larutan 1600 ppm, diambil larutan sebanyak 35 mL kemudian ditambah *aquadest* sebanyak 15 mL. Untuk seri 1200 ppm yang mengambil 30 mL larutan dari 1400 ppm dan ditambahkan dengan *aquadest* 20 mL. Pengenceran seri terakhir 1000 ppm diambil dari larutan 1200 ppm sebanyak 25 mL ditambah dengan *aquadest* 25 mL.

i. Uji Daya Hambat

Uji daya hambat ekstrak daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan metode Kirby-Bauer menggunakan kertas cakram. Penggunaan metode ini mempertimbangkan sifat dari bakteri yaitu anaerob fakultatif. Kertas cakram direndam ke dalam masing-masing seri pengenceran ekstrak daun Getih-getihan, dengan tiga cakram untuk

setiap seri. Cakram didiamkan selama 5 menit agar ekstrak terserap secara optimal. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah memadat diinokulasi dengan suspensi bakteri sebanyak 0,1 mL (100  $\mu$ L), kemudian diratakan menggunakan metode *spreading* dengan alat spatula Drigalski secara merata di seluruh permukaan media. Setiap cawan petri berisi tiga cakram (tiga kali replikasi) dari satu seri konsentrasi ekstrak daun Getih-getihan (*Rivina humilis* L.), sehingga total yang digunakan enam cawan petri untuk seluruh seri ekstrak. Kontrol positif menggunakan satu cakram antibiotik dalam satu cawan petri, dengan tiga kali replikasi untuk menjaga akurasi pengukuran. Kontrol negatif menggunakan satu cawan petri dengan replikasi sebanyak tiga kali. Seluruh media diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1×24 jam. Prinsip dari metode cakram, terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram yang merupakan petunjuk kepekaan sampel uji dengan bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Pengukuran diameter zona hambat diukur secara vertikal dan horizontal dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm).

### 3.7. Kerangka Operasional



Gambar 3. 2 Kerangka Operasional

### 3.8. Analisis Data

Uji *Kruskal-Wallis* merupakan salah satu metode statistik non-parametrik yang digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan nilai median di antara tiga atau lebih kelompok sampel yang independen satu sama lain. Uji ini umumnya diterapkan dalam penelitian dengan rancangan komparatif atau perbandingan antar kelompok. Pengujian hipotesis dengan metode *Kruskal-Wallis* merupakan bentuk pengembangan dari analisis varians satu arah (*one-way ANOVA*), yang digunakan ketika sejumlah asumsi analisis parametrik tidak terpenuhi. Beberapa syarat yang biasanya harus dipenuhi dalam uji parametrik, seperti data berdistribusi normal, kesamaan varians antar populasi, serta sampel yang dipilih secara acak dan bersifat independen, dapat dilonggarkan pada uji non-parametrik ini (Indrasetyaningsih *et al.*, 2024; Rozi & Maulidiya, 2022).