

### BAB III

#### METODE PENELITIAN

##### A. Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro* dengan perlakuan berupa pemberian berbagai konsentrasi ekstrak Kamandin Saebo (*Glossocardia leschenaultii*) terhadap *Staphylococcus aureus* (Sugiyono, 2013). Tujuan utama adalah mengetahui daya antibakteri ekstrak Kamandin Saebo (*Glossocardia leschenaultii*) terhadap *Staphylococcus aureus* *in vitro*

##### B. Desain Penelitian

Desain Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap ) yang terdiri atas enam kelompok, yaitu empat kelompok perlakuan (P1, P2, P3, dan P4), satu kelompok kontrol positif (P5), dan satu kelompok kontrol negatif (P5).

| Pengulangan | Perlakuan       |                 |                 |                 |                 |                 |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|             | P1              | P2              | P3              | P4              | P5              | P6              |
| 1           | P1 <sub>1</sub> | P2 <sub>1</sub> | P3 <sub>1</sub> | P4 <sub>1</sub> | P5 <sub>1</sub> | P6 <sub>1</sub> |
| 2           | P1 <sub>2</sub> | P2 <sub>2</sub> | P3 <sub>2</sub> | P4 <sub>2</sub> | P5 <sub>2</sub> | P6 <sub>2</sub> |
| 3           | P1 <sub>3</sub> | P2 <sub>3</sub> | P3 <sub>3</sub> | P4 <sub>3</sub> | P5 <sub>3</sub> | P6 <sub>3</sub> |

**Gambar 3. 1 Rancangan Acak Lengkap**

Sumber : Sugiyono, 2013

##### Keterangan:

P1 = Ekstrak Kamandin Saebo konsentrasi 100%

P2 = Ekstrak Kamandin Saebo konsentrasi 75%

P3 = Ekstrak Kamandin Saebo konsentrasi 50%

P4 = Ekstrak Kamandin Saebo konsentrasi 25%

P5 = Kontrol negatif 0% (DMSO)

P6 = Kontrol positif Antibiotik Cotrimoxazole

Angka 1–3 = Pengulangan ke-1 sampai ke-3

##### C. Tempat dan Waktu Penelitian

###### 1. Tempat Penelitian

Penelitian Daya Antibakteri *Staphylococcus aureus* serta pembuatan ekstrak Kamandin Saebo (*Glossocardia leschenaultii*) ini akan dilaksanakan di Laboratorium Biome Universitas Airlangga.

## 2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada September 2025 - Mei 2026 untuk pembuatan ekstrak Kamandin Saebo dan uji Antibakteri ekstrak Kamandin Saebo terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

## D. Populasi dan Sampel Penelitian

### 1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini mencakup strain bakteri *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 yang ditanam dalam Media Muler Hinton Agar, serta Kamandin Saebo (*Glossocardia leschenaultii*) yang diperoleh dari Desa Plalang, Pakong, Pamekasan, Jawa Timur.

### 2. Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah kultur *Staphylococcus aureus* strain ATCC 25923 yang diberi perlakuan ekstrak Kamandin Saebo (*Glossocardia leschenaultii*) pada empat variasi konsentrasi, yaitu 100%, 75%, 50%, dan 25%, serta satu kelompok kontrol positif dan satu kelompok kontrol negatif. Setiap kelompok perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan berdasarkan Standar Operasional Prosedur (SOP) Laboratorium Biome Universitas Airlangga sehingga diperoleh 18 unit percobaan. Pengalokasian setiap unit percobaan ke dalam kelompok perlakuan dilakukan secara acak menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Denah pengacakan unit percobaan disajikan pada Gambar 3.3.

| Plat 1<br>(Ekstrak) | Plat 2<br>(Ekstrak) | Plat 3<br>(Ekstrak) | Plat 4<br>(K-)  | Plat 5<br>(K+)  | Plat 6<br>(K+)  | Plat 7<br>(K+)  |
|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| P2 <sub>2</sub>     | P4 <sub>1</sub>     | P1 <sub>3</sub>     | P5 <sub>1</sub> | P6 <sub>1</sub> | P6 <sub>2</sub> | P6 <sub>3</sub> |
| P3 <sub>1</sub>     | P1 <sub>2</sub>     | P4 <sub>3</sub>     | P5 <sub>2</sub> |                 |                 |                 |
| P1 <sub>1</sub>     | P2 <sub>3</sub>     | P3 <sub>2</sub>     | P5 <sub>3</sub> |                 |                 |                 |
| P4 <sub>2</sub>     | P3 <sub>3</sub>     | P2 <sub>1</sub>     |                 |                 |                 |                 |

**Gambar 3. 2 Denah Pengacakan Sampel pada Petridish**

**Keterangan:**

Plat 1–3 : Berisi seluruh kelompok perlakuan ekstrak yang telah diacak (12

unit percobaan).

Plat 4 : Berisi tiga ulangan kontrol negatif (P<sub>51</sub>, P<sub>52</sub>, P<sub>53</sub>).

Plat 5–7 : Masing-masing berisi satu ulangan kontrol positif (P<sub>61</sub>, P<sub>62</sub>, P<sub>63</sub>)

karena diameter zona hambat antibiotik diperkirakan sangat besar sehingga setiap ulangan ditempatkan pada plat terpisah untuk mencegah tumpang tindih zona hambat dan memudahkan pengukuran.

**E. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional****1. Variabel Penelitian**

- a. Variabel Bebas : Variasi konsentrasi ekstrak Kamandin Saebo yang diberikan pada cakram kertas, yaitu 100%, 75%, 50%, 25%, 0% (DMSO) dan kontrol positif cotrimoxazole
- b. Variabel Terikat : Daya Antibakteri (diameter zona hambat (mm)).
- c. Variabel Kontrol : Volume suspensi bakteri, kepadatan suspensi bakteri setara 0,5 McFarland, strain bakteri *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, umur biakan bakteri, jenis media pertumbuhan (Mueller Hinton Agar), volume ekstrak yang diberikan pada cakram kertas, diameter cakram kertas, suhu, waktu inkubasi dan jangka waktu pengamatan.

**2. Definisi Operasional Variabel**

**Definisi Operasional Variabel dalam penelitian ini adalah :**

- a. Ekstrak Kamandin Saebo (*Glossocardia leschenaultii*) dioperasikan sebagai larutan yang diperoleh dari proses ekstraksi tanaman yang telah dikeringkan dan dihaluskan, menggunakan metode maserasi, ekstrak berbentuk pasta.
- b. Konsentrasi ekstrak didefinisikan sebagai persentase volume ekstrak murni yang dicampur dengan pelarut netral (DMSO) untuk menghasilkan variasi. Karena ekstrak

berbentuk pasta (kental) maka untuk konsentrasi ekstrak 100% dilarutkan pada pelarut DMSO dengan perbandingan 1:1 yaitu 100gr ekstrak dilarutkan pada 100ml DMSO, konsentrasi 75% diperoleh dari 75ml ekstrak 100% + 25 ml DMSO, konsentrasi 50% diperoleh dari 50ml ekstrak 100% + 50 ml DMSO dan konsentrasi 25% diperoleh dari 75% ekstrak 100% + 25ml DMSO sebagai Data Ordinal.

- c. Daya Antibakteri dioperasionalkan sebagai penghambatan pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan indikator diameter zona bening (zona hambat) yang terbentuk di sekitar cakram kertas pada media agar yang ditanami bakteri *Staphylococcus aureus*. Diameter zona hambat diukur mulai tepi cakram kertas sampai batas terjauh pertumbuhan bakteri dengan menggunakan jangka sorong elektrik dalam satuan mm, yang diamati setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Davis & Stout, 1971). Hasil pengukuran Diameter zona hambat merupakan Data Rasio.
- d. *E-booklet* merupakan buku saku berbasis elektronik yang menyajikan materi secara ringkasan dan dilengkapi dengan gambar atau ilustrasi yang menarik, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber belajar oleh berbagai kalangan yang mudah diakses secara *Online* melalui *Website flipbook Heyzine*.

## **F. Prosedur Penelitian**

### **1. Persiapan**

#### **a. Menyiapkan Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan meliputi autoklaf, inkubator 37°C, tabung reaksi, pipet tetes, mikropipet dan tip steril, cawan petri steril, cakram kertas steril 5 mm, jangka sorong digital, tabung reaksi, botol reagen, corong, rotary evaporator, gelas ukur, aluminium foil, neraca analitik, kertas saring, serta mortar atau grinder. Bahan yang digunakan adalah daun Kamandin Saebo kering, etanol 70%, aquades steril, antibiotik Cotrimoxazole, kultur *Staphylococcus aureus* standar dan Mueller Hinton Agar

#### **b. Pembuatan Ekstrak Kamandin Saebo**

**1) Prosedur kerja dalam pembuatan serbuk/simplisia**

- a) Pilih daun Kamandin Saebo segar yang sehat sebanyak 2 kg.
- b) Cuci bersih daun di bawah air mengalir, lalu tiriskan dan keringkan daun di tempat teduh selama 3–4 hari hingga kadar air rendah (berwarna hijau kecoklatan)
- c) Giling daun kering menjadi serbuk halus menggunakan mortar & pestle atau grinder. Serbuk ini disebut simplisia.
- d) Simpan serbuk dalam wadah tertutup pada suhu ruang untuk digunakan sebagai bahan ekstraksi.

**2) Prosedur kerja dalam pembuatan ekstrak Kamandin Saebo (*Glossocardia leschenaultii*) dengan menggunakan metode maserasi**

- a) Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 400 gram menggunakan timbangan analitik dan dimasukkan kedalam toples kaca.
- b) Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%, 400 gram serbuk simplisia dilarutkan dalam 4000 mL etanol 70%. Serbuk ditempatkan ke dalam wadah kaca berwarna gelap, kemudian ditambahkan pelarut hingga seluruh bahan terendam sempurna.
- c) Wadah ditutup rapat dan disimpan pada suhu ruang ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) selama 24 jam. Setelah itu, campuran disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 1 untuk menghasilkan filtrat pertama. Ampas yang diperoleh kemudian dimaserasi ulang dua kali dengan pelarut baru masing-masing selama 24 jam menggunakan prosedur yang sama untuk memastikan semua senyawa aktif terekstrak sempurna.
- d) Semua filtrat hasil penyaringan digabungkan dan diaduk hingga homogen.

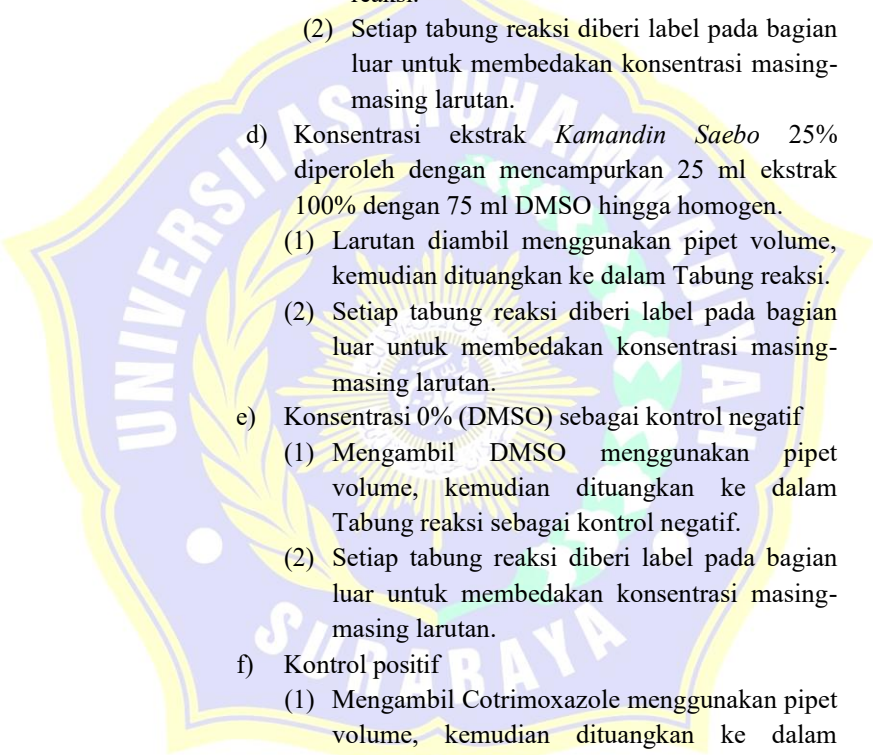
- e) Filtrat yang telah digabung diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40–50°C hingga didapatkan ekstrak kental.
- f) Ekstrak kental hasil pemekatan disimpan dalam botol kaca gelap tertutup rapat dan ditempatkan dalam suhu rendah ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) sampai digunakan untuk pengujian antibakteri (Wahyuningsih dkk., 2024).  
Perhitungan:

Sebanyak 400 gram simplisa direndam dalam 1.800 ml etanol 70%, menghasilkan  $\pm 40$  ml ekstrak Kamandin Saebo. Ekstrak yang terkonsentrasi kemudian dipindahkan ke wadah kaca bersih dan diberi label dengan benar.

### 3) Pembuatan berbagai konsentrasi ekstrak Kamandin Saebo

Pengenceran dilakukan untuk membuat seri pengenceran ekstrak Kamandin Saebo agar diperoleh konsentrasi terendah yang efektif menghambat pertumbuhan bakteri yang diuji (Ramadheni dkk., 2018).

- a) Konsentrasi ekstrak *Kamandin Saebo* 100% diperoleh dengan mencampurkan 100gr ekstrak 100% dengan 100ml DMSO hingga homogen.
  - (1) Larutan diambil menggunakan pipet volume, kemudian dituangkan ke dalam Tabung reaksi.
  - (2) Setiap tabung reaksi diberi label pada bagian luar untuk membedakan konsentrasi masing-masing larutan.
- b) Konsentrasi ekstrak *Kamandin Saebo* 75% diperoleh dengan mencampurkan 75ml ekstrak 100% dengan 25 ml DMSO hingga homogen.
  - (1) Larutan diambil menggunakan pipet volume, kemudian dituangkan ke dalam Tabung reaksi.

- 
- (2) Setiap tabung reaksi diberi label pada bagian luar untuk membedakan konsentrasi masing-masing larutan.
- c) Konsentrasi ekstrak *Kamandin Saebo* 50% diperoleh dengan mencampurkan 50 ml ekstrak 100% dengan 50 ml DMSO hingga homogen.
- (1) Larutan diambil menggunakan pipet volume, kemudian dituangkan ke dalam Tabung reaksi.
- (2) Setiap tabung reaksi diberi label pada bagian luar untuk membedakan konsentrasi masing-masing larutan.
- d) Konsentrasi ekstrak *Kamandin Saebo* 25% diperoleh dengan mencampurkan 25 ml ekstrak 100% dengan 75 ml DMSO hingga homogen.
- (1) Larutan diambil menggunakan pipet volume, kemudian dituangkan ke dalam Tabung reaksi.
- (2) Setiap tabung reaksi diberi label pada bagian luar untuk membedakan konsentrasi masing-masing larutan.
- e) Konsentrasi 0% (DMSO) sebagai kontrol negatif
- (1) Mengambil DMSO menggunakan pipet volume, kemudian dituangkan ke dalam Tabung reaksi sebagai kontrol negatif.
- (2) Setiap tabung reaksi diberi label pada bagian luar untuk membedakan konsentrasi masing-masing larutan.
- f) Kontrol positif
- (1) Mengambil Cotrimoxazole menggunakan pipet volume, kemudian dituangkan ke dalam Tabung reaksi sebagai kontrol negatif.
- (2) Setiap tabung reaksi diberi label pada bagian luar untuk membedakan konsentrasi masing-masing larutan.

c. **Pembuatan Media Muller Hinton Agar**

- 1) Menimbang 19 gram serbuk Mueller Hinton Agar kedalam panci dan menambahkan 500 mL aquades.
- 2) Memanaskan sampai mendidih dengan pengadukan perlahan diatas api kecil.
- 3) Masukkan media ke dalam erlenmeyer.
- 4) Menutup mulut erlenmeyer menggunakan kain kasa yang diisi kapas.
- 5) Mensterilkan media di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 6) Setelah sterilisasi selesai, mengeluarkan erlenmeyer dari autoklaf dan mendinginkan media hingga suhu  $\pm 50^{\circ}\text{C}$  (hangat).
- 7) Menuangkan media MHA ke dalam petridish sekitar 60 mL atau ketinggian suspensi 15 cm.
- 8) Membiarkan media di cawan petri hingga membeku sempurna.
- 9) Memberikan label pada setiap cawan petri sesuai dengan kelompok perlakuan.
- 10) Menyimpan media kedalam inkubator.

d. **Pembuatan biakan dan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus***

- 4) Mengambil kultur *Staphylococcus aureus* standar dari Laboratorium.
- 5) Menginokulasi bakteri media Mueller Hinton Agar (MHA) dalam cawan petri secara aseptik.
- 6) Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk memperoleh koloni aktif.
- 7) Memindahkan beberapa koloni *Staphylococcus aureus* dari media padat ke dalam tabung berisi 5 mL aquades steril.
- 8) Menghomogenkan suspensi hingga seragam menggunakan stirrer atau vortex.
- 9) Menyesuaikan kekeruhan suspensi bakteri dengan McFarland 0,5 ( $\pm 1,5 \times 10^8$  CFU/mL).

### c. Pengujian Bakteri *Staphylococcus aureus*

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram dengan metode cakram dengan prosedur sebagai berikut:

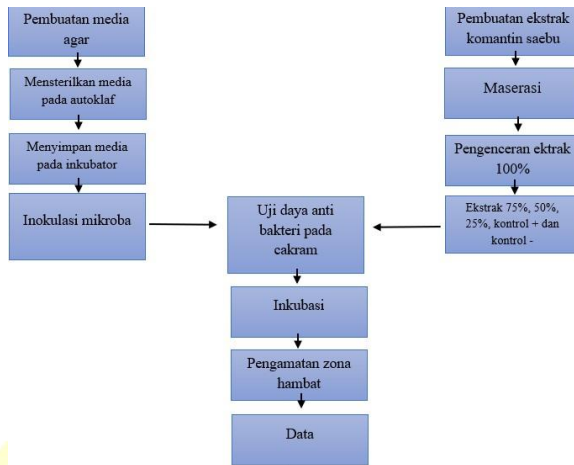
#### 10) Menyiapkan Alat dan Bahan

Menyiapkan Alat yaitu Cawan petri yang sudah berisi Mueller Hinton Agar (MHA), cakram kertas steril 6 mm, jangka sorong digital, inkubator 37°C, dan mikropipet dan Bahan Suspensi *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 yang sudah disiapkan, ekstrak Kamandin Saebo dengan konsentrasi berbeda (100%, 75%, 50%, 25%), kontrol positif (Cotrimoxazole), kontrol negatif (aquades steril), dan MHA.

#### 11) Prosedur

- a) Inokulasi suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan merata pada permukaan media MHA dengan teknik swab steril.
- b) Menempatkan cakram kertas steril diameter 5 mm pada permukaan media.
- c) Meneteskan 20 µL ekstrak Kamandin Saebo sesuai konsentrasi pada setiap cakram kertas.
- d) Perlakuan kontrol positif menggunakan antibiotik Cotrimoxazole yang diteteskan pada cakram.
- e) Perlakuan 0% menggunakan DMSO yang diteteskan pada cakram. sebagai kontrol negatif
- f) Menginkubasi cawan petri pada suhu 37°C selama 24 jam.
- g) Diameter zona hambat diamati dan diukur diameter menggunakan jangka sorong digital dari dua arah saling tegak lurus.
- h) Mencatat hasil pengamatan dan menghitung rata-rata diameter zona hambat pada setiap konsentrasi.

Uraian prosedur penelitian diringkas dalam bentuk gambar ditunjukkan pada Gambar 3.2.



**Gambar 3. 3 Prosedur Penelitian**

### G. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data dalam penelitian ini melibatkan pengamatan langsung dan pengukuran kuantitatif zona hambat pada hasil uji antibakteri. Data utama dikumpulkan dengan mengukur diameter zona hambat setelah inkubasi menggunakan jangka sorong digital, sesuai dengan prosedur Pengujian Bakteri *Staphylococcus aureus*. Diorganisasikan dalam bentuk tabel berdasarkan batas zona bening yang terbentuk. Bentuk tabel hasil pengamatan disajikan pada Tabel 3.1.

**Tabel 3. 1 Pengamatan zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* yang terbentuk pada berbagai perlakuan**

| Pengulangan | Random |    |    |    |    |    |
|-------------|--------|----|----|----|----|----|
|             | P1     | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
| 1.          |        |    |    |    |    |    |
| 2.          |        |    |    |    |    |    |
| 3.          |        |    |    |    |    |    |
| Jumlah      |        |    |    |    |    |    |
| Rata-rata   |        |    |    |    |    |    |

**Keterangan:**

**P1 : Konsentrasi 100%**

**P2 : Konsentrasi 75%**

**P3 : Konsentrasi 50%**

**P4 : Konsentrasi 25%**

**P5 : Konsentrasi 0% sebagai Kontrol negatif**

**P6 : Kontrol Positif Cotrimoxazole**

**H. Teknik Analisis Data**

Dalam penelitian ini, analisis data dalam dilakukan secara berurutan, dimulai dengan analisis deskriptif untuk menghitung rata-rata, diameter zona hambat pada setiap konsentrasi ekstrak Kamandin Saebo. Analisis data dilakukan menggunakan aplikasi SPSS. Data terlebih dahulu diuji normalitasnya dengan uji Shapiro-Wilk. Jika data berdistribusi normal dan homogen, maka analisis dilanjutkan dengan *One-Away* ANOVA, Jika hasil ANOVA satu arah menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ), maka dilakukan uji lanjut (post hoc) Tukey HSD untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan yang signifikan. Apabila data terdistribusi normal tetapi tidak homogen, maka digunakan ANOVA *Welch*. Jika hasil ANOVA *Welch* menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ), maka uji Games-Howell akan dilanjutkan sebagai uji lanjutan untuk menentukan perbedaan antar kelompok perlakuan. Sementara itu, apabila data tidak berdistribusi normal analisis digunakan menggunakan uji non-parametrik Kruskal-Wallis dengan taraf signifikansi  $\alpha$  0,05. Jika hasil uji menunjukkan ada perbedaan, analisis selanjutnya dilakukan dengan uji Mann Whitney untuk mengetahui perbedaan pengaruh daya antibakteria pemberian ekstrak Kamandin Saebo terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasilnya diinterpretasikan berdasarkan kategori daya antibakteri ( $\leq 5$  mm lemah, 5–10 mm sedang, 10–20 mm kuat,  $\geq 20$  mm sangat kuat).