

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **1. Tempat penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia, dan Laboratorium Mikrobiologi di Program Studi D-III Farmasi, Poltekkes Kemenkes Kupang.

##### **2. Waktu penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan April Tahun 2026.

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Daun sirih (*Piper betle* L.) yang diambil dari Kelurahan Liliba, Kecamatan Oebobo, Nusa Tenggara Timur.

##### **2. Sampel dan teknik sampling**

###### **a. Sampel**

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini daun sirih (*Piper betle* L.) dimana daun tersebut diambil dari Kelurahan Liliba, Kecamatan Oebobo, Nusa Tenggara Timur.

b. Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah purposive sampling, dengan kriteria daun sirih (*Piper betle* L.) yang hijau tua dan segar.

## D. Variabel Penelitian

### 1. Variabel bebas

Infusa daun sirih (*Piper betle* L.) dengan konsentrasi larutan uji 25%, 50%, 75%, 100%.

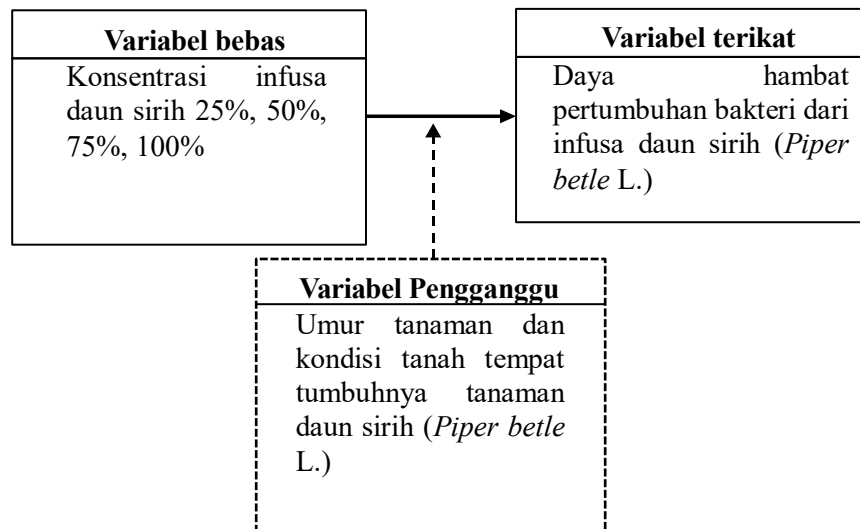
### 2. Variabel terikat

Daya hambat pertumbuhan bakteri dari infusa daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

### 3. Variabel pengganggu

Kondisi umur tanaman dan kondisi tanah tempat tumbuhnya daun sirih (*Piper betle* L.).

## A. Kerangka Konsep



Keterangan : — : Yang diteliti

- - - : Tidak diteliti

**Gambar 3. Hubungan antar variabel**

## B. Definisi Operasional

**Tabel 1. Definisi Operasional**

| No | Indikator Utama              | Definisi Operasional                                                                                              | Alat Ukur     | Skala   |
|----|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------|
| 1  | Aktivitas Antibakteri        | Kemampuan daun sirih dalam menghambat pertumbuhan bakteri <i>staphylococcus aureus</i>                            | Jangka Sorong | Rasio   |
| 2  | Infusa daun sirih            | Infusa yang diperoleh dengan cairan direbus pada suhu 90° C selama 15 menit dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% 100% | -             | Ordinal |
| 3  | <i>Staphylococcus aureus</i> | Bakteri uji yang digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri yang diperoleh jurusan TLM                      | -             | Nominal |
| 4  | Diameter zona hambat         | Daerah bening yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri disekitar lubang sumuran                                | Silinder cap  | Rasio   |

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan elektrik, erlenmeyer (pyrex), inkubator suhu 37° C, mikropipet 20 ml dan 100 ml, pipet ukur, pipet volume, cawan petri, panci, autoklaf, jarum ose, jangka sorong, tabung rekasi, rak tabung, cawan porselin, kapas, kasa, tissue, kertas saring dan aluminium foil, *cork borer*, *water bath*, pembakar bunsen.

### 2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel infusa daun sirih, *nutrien agar*, *nutrien broth*, *aquades steril*, (control positif) isolate

*staphylococcus aureus*, (control negatif), ciprofloxacin, serbuk magnesium, asam klorida, pereaksi besi (III) 1%, alkohol dan 70 % NaCl 0,9%.

#### **D. Prosedur Penelitian**

##### **1. Tahap persiapan**

Sebelum melakukan penelitian dan pengumpulan data terlebih dahulu dipersiapkan beberapa kelengkapan penelitian yaitu persiapan alat dan bahan yang digunakan dan sterilisasi alat dan bahan.

##### **2. Pembuatan simplisia daun sirih (*Piper betle* L.)**

Pengambilan daun sirih dilakukan pukul 07.00 pagi dan tidak setelah hujan, dipetik sejumlah sampel disimpan dalam wadah kantong plastik hitam, kemudian daun sirih ditimbang, dilakukan sortasi basah dengan memisahkan batang dan daun yang rusak, Langkah selanjutnya yakni pencucian, setelah pencucian dilakukan perajangan, Langkah selanjutnya yakni pengeringan dilakukan selama rentang 6-10 hari dibawa sinar matahari dan ditutup dengan kain hitam, Langkah selanjutnya yakni dilakukan sortasi kering. Tahap pembuatan simplisia dengan menghalus daun sirih dengan blender, kemudian hasil blender disimpan dalam wadah kaca sementara, mesh kan simplisia sirih dengan mesh 60, simpan simplisia dalam wadah kaca yang kemudian ditutup dengan wrapping dan alumunium foil agar tidak terlindung dari cahaya dan udara (Paskalis, 2023).

##### **3. Pembuatan infusa daun sirih (*Piper betle* L.)**

Infusa daun sirih masing-masing dibuat dengan konsentrasi 75%, 50% dan 25%. Daun sirih (*Piper betle* L.) terlebih dahulu dicuci dan dibersihkan

dengan air mengalir, lalu dirajang kemudian ditimbang sebanyak, 75g, 50g, dan 25g. Masing-masing daun sirih (*Piper betle* L.) yang telah ditimbang dimasukkan kedalam panci infusa ditambahkan aquadest steril sebanyak 100 ml. Masing- masing daun sirih (*Piper betle* L.) yang telah ditambahkan aquadest steril dipanaskan menggunakan pemanas air selama 15 menit terhitung setelah suhu dalam panci mencapai 90° C sambil sesekali diaduk. Disaring selagi panas dengan menggunakan kertas saring steril. Jika volumenya kurang dapat, ditambahkan aquadest steril panas yang dilewatkan pada ampas daun sirih hingga diperoleh volume infusa daun sirih 100 ml. (Mariadi, 2024).

#### 4. Penentuan konsentrasi infusa daun sirih (*Piper betle* L.)

$$V1.N1 = V2.N2$$

Keterangan :

V1 = Volume yang dicari

N1 = Konsentrasi awal

V2 = Volume yang diinginkan

N2 = Konsentrasi yang diinginkan

#### 5. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakan media NA 5 mL kemudian diambil sebanyak 1 ose. Dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi NaCl 0,9% sebanyak 10 ml Kemudian diambil masing- masing 1 ml secara aseptis. Di inkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C selama 24 jam e. Dikocok hingga homogen kemudian di sesuaikan dengan McFarland 0,5 (Afriliana, 2025).

## 6. Pembuatan media

Timbang 3,6 g Nutrient Agar (NA) ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 180 mL aquadest di dalam Erlenmeyer 250 mL. Media dipanaskan sambil diaduk hingga larut sempurna dan mendidih. Selanjutnya media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, media dididihkan hingga memadat, kemudian dituangkan secara aseptik sebanyak 20 mL ke dalam masing-masing cawan petri steril dan dibiarkan memadat sehingga membentuk lapisan dasar.

Timbang 0,4 g Nutrient Agara (NA) dilarutkan dalam 20 mL aquadest, kemudian dipanaskan hingga larut sempurna dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah media didinginkan hingga suhu 45–50°C, ditambahkan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah disesuaikan dengan kekeruhan 0,5 McFarland, kemudian dihomogenkan secara perlahan. Campuran tersebut segera dituangkan di atas base layer yang telah memadat secara aseptik hingga membentuk lapisan tipis (seed layer), kemudian dibiarkan memadat sebelum dilakukan pembuatan sumuran dan pengujian antibakteri

## 7. Pembuatan media pengujian

Masing-masing 20 ml Nutrien agar (NA) dituangkan kedalam 9 cawan petri sebagai media dasar, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi, cawan petri dilubangi secara aseptik menggunakan cork borer berdiameter 5 mm sehingga terbentuk sumur-sumur untuk uji antibakteri.

## 8. Pembuatan larutan kontrol

Larutan kontrol positif dibuat dari sediaan obat tablet ciprofloxacin 500 mg. Tablet ciprofloxacin digerus, kemudian ditimbang dan disetarakan dengan

500 mg. Serbut halus ciprofloxacin dilarutkan dalam aquades untuk memperoleh larutan ciprofloxacin 5 $\mu$ /50 $\mu$ l (Yolandari et al., 2022).

## 9. Skrining fitokimia

### a. Flavonoid

Infusa sebanyak 1 ml dimasukan kedalam tabung reaksi, ditambahkan dengan serbuk magnesium sebanyak 1 g dalam 1 ml larutan asam klorida pekat. Perubahan warna larutan menjadi warna kuning menandakan adanya flavonoid (Yohanes, 2015).

### b. Saponin

Infusa sebanyak 2 ml dimasukan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air, setelah itu dikocok dengan kuat selama 10 menit lalu dibiarkan selama 10 menit menunjukkan adanya saponin (Yohanes, 2015).

### c. Polifenol

Infusa sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan tiga tetes air panas dan tiga tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Perubahan warna larutan menjadi warna hijau, biru atau ungu menunjukkan adanya senyawa fenol (Yohanes, 2015).

## 10. pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Sebanyak 50 infusa daun sirih yang telah dibuat menjadi beberapa seri konsentrasi (25%, 50%, 75%, dan 100%) diambil dan ditempatkan pada lubang sumuran dicawan petri, Selanjutnya, cawan petri. Selanjutnya, cawan yang telah berisi infusa daun sirih ini diinkubasi selama 24 jam pada

inkubator. Setelah proses inkubasi telah sesuai, pengamatan diameter zona hambat dilakukan menggunakan jangka sorong. Peralakuan yang sama juga diterapkan untuk ciprofloxacin dan akuadest yang berperan sebagai kontrol positif dan negatif. Pengamatan zona hambat dilakukan dari satu tepi (breakpoint) ke tepi yang berlawanan, melalui titik pusat lubang sumuran. Jika tidak terdapat zona hambat di sekitar lubang sumuran, maka diameter zona hambat tersebut dianggap tidak memiliki zona hambat. Selanjutnya, diameter zona hambat tersebut dikategorikan berdasarkan tingkat kekuatan daya antibakterinya sesuai dengan penggolongan yang telah ditetapkan.

#### **I. Analisis Data**

Data hasil penelitian yang telah diperoleh ukuran daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan jangka sorong diamati secara deskriptif.