

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *true experimental* dengan rancangan *Posttest Only Control Group Design*. Dalam rancangan ini, kelompok penelitian dibagi menjadi dua yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol yang masing-masing dipilih secara random (R). Kelompok eksperimen diberikan perlakuan (X) sementara kelompok yang lain tidak. Kedua kelompok memberikan hasil akhir (O2) sesuai dengan perlakuan yang diberi (Hardani dkk., 2020). Rancangan penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 3.

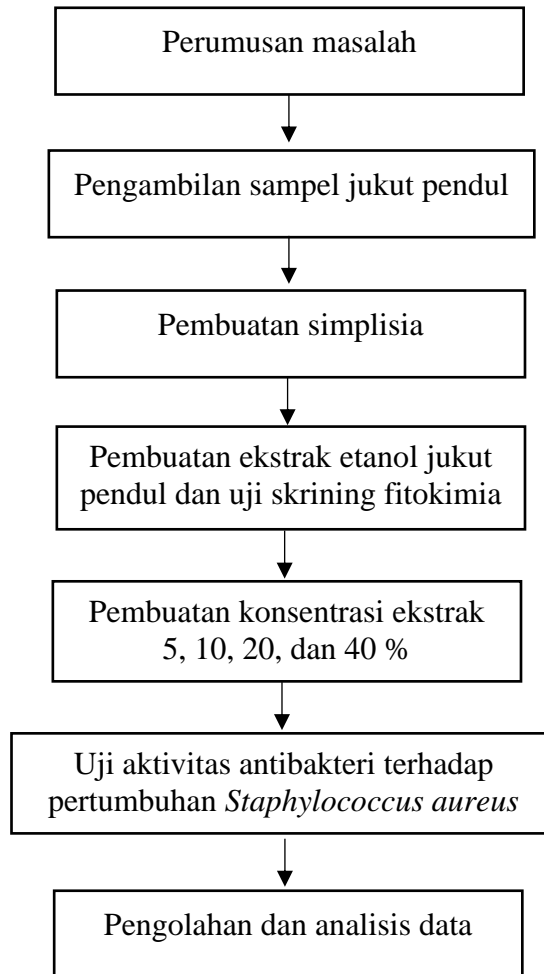
**Tabel 3**  
**Rancangan *Posttest Only Control Group Design***

	<b>Kelompok</b>	<b>Variabel Terikat</b>	<b>Posttest</b>
<b>R1</b>	Eksperimen	X	O2
<b>R2</b>	Kontrol	-	O2

Keterangan:

1. R1 (Random 1): Kelompok ini yang diberi perlakuan ekstrak etanol jukut pendul dengan konsentrasi 5, 10, 20, dan 40%.
2. R2 (Random 2): Kelompok kontrol diberi etanol 96%.
3. X (*Exposure*): Perlakuan.
4. O2 (Observasi): Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

## B. Alur Penelitian



**Gambar 4. Alur penelitian Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Jukut Pendul terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus***

## C. Tempat dan Waktu Penelitian

### 1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Laboratorium Kimia Terapan dan Laboratorium Kimia Dasar Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Denpasar.

### 2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari Bulan Januari hingga Bulan April 2023.

## **D. Sampel Penelitian**

### **1. Unit analisis**

Unit analisis pada penelitian ini yaitu diameter zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* di setiap variasi konsentrasi ekstrak etanol jukut pendul yang meliputi konsentrasi 5, 10, 20, dan 40%.

### **2. Sampel penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dari batang, daun, dan bunga jukut pendul yang diambil dari wilayah Desa Wanasari, Tabanan.

### **3. Jumlah dan besar sampel**

#### **a. Besar sampel**

Untuk menguji aktivitas antibakteri dari tanaman jukut pendul, diperlukan ekstrak pekat yang akan diencerkan dengan etanol 96% dalam perbandingan tertentu menjadi beberapa variasi konsentrasi yaitu 5, 10, 20, dan 40%. Kelompok kontrol pada penelitian ini menggunakan cakram disk yang telah dijenuhkan dengan etanol 96%. Massa ekstrak etanol jukut pendul pekat yang dibutuhkan untuk membuat larutan konsentrasi 5, 10, 20, dan 40% yaitu sebanyak 3,75 gram.

Dalam melakukan percobaan laboratorium, diperlukan suatu pengulangan terhadap pengujian atau percobaan yang dilakukan. Hal ini bertujuan agar percobaan yang dilakukan memiliki ketelitian yang tinggi. Semakin banyak pengulangan, maka akan semakin tinggi juga ketelitian percobaan tersebut. Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam suatu percobaan ditentukan berdasarkan rumus Federer (Federer, 1963 dalam Wahyuningrum dan Probosari, 2012).

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

Keterangan:

t: Jumlah perlakuan

r: Jumlah ulangan

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

$$(5 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$4(r - 1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 15 + 4$$

$$r \geq 19 \div 4$$

$$r \geq 4,75$$

Jumlah perlakuan yang dilakukan pada percobaan ini yaitu sebanyak lima perlakuan, antara lain empat perlakuan pada kelompok eksperimen dan satu perlakuan pada kelompok kontrol. Selanjutnya, dalam persamaan dimasukkan jumlah perlakuan (t) sehingga didapatkan jumlah pengulangan (r) yaitu  $\geq 4,75$ . Berdasarkan perhitungan tersebut, pengulangan yang dilakukan dalam pengujian daya hambat yaitu sebanyak 5 kali sehingga didapatkan 20 data dari kelompok eksperimen dan 5 data dari kelompok kontrol.

#### **4. Kriteria sampel**

Kriteria inklusi jukut pendul dari tumbuhan dengan kondisi batang dan daun hijau segar yang diambil dari pangkal batang hingga pucuk, tidak berlubang dan berumur muda. Kriteria eksklusi yaitu kondisi tumbuhan yang layu, kering, berwarna kuning, dan kondisi fisik tumbuhan rusak.

## **E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data**

### **1. Jenis data**

Data yang diperoleh dari penelitian di laboratorium yaitu berupa data diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai variasi konsentrasi ekstrak etanol jukut pendul yang merupakan jenis data primer.

### **2. Teknik pengumpulan data**

Penelitian ini memakai metode pengumpulan data secara kuantitatif dengan melakukan pengukuran dengan alat ukur melalui eksperimen laboratorium uji daya hambat ekstrak etanol jukut pendul menggunakan metode difusi cara *Kirby Bauer*. Pengukuran dilakukan pada diameter zona hambat dari tiap variasi konsentrasi dengan bantuan alat jangka sorong yang dilaporkan dalam milimeter (mm).

### **3. Alat dan bahan**

#### **a. Alat**

Adapun peralatan yang dipakai dalam pengujian, antara lain blender, nampan plastik, toples kaca, neraca analitik (Radwag), pipet ukur 1 ml dan 10 ml (Iwaki- Pyrex®), mikropipet 1000µl (secorex), ball pipet (b&n ballpipet), gelas ukur 250ml (Iwaki-Pyrex®), evaporator (IKA®RV 10 basic), erlenmeyer 50 ml, 500 ml, 1000 ml (Iwaki- Pyrex®), labu ukur 5 ml, tabung reaksi (Iwaki-Pyrex®), rak tabung reaksi, ose, hotplate, magnetic stirrer, lampu spiritus, *biosafety cabinet*, *Mc Farland* densitometer (Biosan), jangka sorong, inkubator (Esco), oven (Wagtech), pipet tetes, dan *autoclave* (Tomy Sx-500).

b. Bahan

Adapun bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini, antara lain sampel jukut pendul sebanyak 1,5 kg, kertas saring, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC, media *Muller Hinton Agar*, media *Nutrient Agar*, cakram disk kosong, cakram antibiotik *Ciprofloxacin* 5 µg, tabung urine, *petri dish disposable, yellow* dan *blue tip*, lidi kapas steril, etanol 96%, NaCl fisiologis 0,9 %, aquadest steril, aluminium foil, spuit needle 5 cc, asam sulfat, reagen Dragendorff, reagen Mayer Wagner, air panas, serbuk magnesium, H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>, HCl dan alkohol 70%.

**4. Prosedur Kerja**

a. Persiapan sampel

- 1) Tanaman jukut pendul yang digunakan yaitu dari pangkal batang sampai pucuk tanaman. Tanaman yang diambil dipilih sesuai dengan kriteria sampel yang ditentukan sebelumnya oleh peneliti. Banyak sampel yang diperlukan untuk mendapatkan ekstrak yang cukup yaitu 1,5 kg.
- 2) Kemudian, jukut pendul yang didapatkan dibersihkan dengan direndam dalam air bersih, lalu dibilas dan ditiriskan untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada tanaman.
- 3) Tanaman jukut pendul dikeringkan secara manual yaitu dengan bantuan hembusan angin selama beberapa hari. Pengeringan dilakukan dengan meletakkan tanaman diatas nampan yang ditempatkan di ruangan terbuka tanpa adanya paparan sinar matahari secara langsung. Proses pengeringan dilakukan hingga tanaman benar-benar kering, yaitu sekitar 7 hari.
- 4) Apabila bahan telah seluruhnya kering, ditimbang dan dihaluskan hingga didapatkan simplisia yang berupa serbuk halus.

b. Pembuatan ekstrak etanol jukut pendul dengan metode maserasi

Adapun prosedur pembuatan ekstrak etanol jukut pendul yang diadaptasi dari penelitian yang dilakukan oleh Wendersteyt dkk., (2021), yaitu sebagai berikut.

- 1) Sebanyak 200 gram simplisia dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 ml
- 2) Kemudian, sebanyak 1000 ml etanol 96% ditambahkan ke dalam erlenmeyer hingga simplisia terendam sepenuhnya, lalu ditutup dengan aluminium foil.
- 3) Perendaman dilakukan selama 2x24 jam dalam ruangan yang terlindungi dari cahaya matahari dengan pengadukan setiap 24 jam.
- 4) Setelah dua hari, maserat disaring dengan memakai kertas saring, lalu filtrat yang diperoleh dikumpulkan dalam wadah bersih berbahan kaca. Residu penyaringan dimaserasi kembali dengan 1000 ml etanol 96% selama 2x24 jam dalam keadaan tertutup rapat dan terlindung dari cahaya matahari. Setelah 2 hari, maserat disaring dan kembali diremaserasi selama 3 hari sehingga akan diperoleh 3 filtrat.
- 5) Filtrat hasil maserasi kemudian ditempatkan dalam labu penampung pada alat evaporator. Kemudian, labu penampung dipasangkan pada alat evaporator dan diatur suhu proses evaporasi diantara suhu 40-60°C. Proses ini dilakukan untuk memperoleh ekstrak kental.
- 6) Hasil ekstraksi jukut pendul yang diperoleh kemudian ditempatkan dalam wadah bersih dan ditimbang berat bersih ekstrak.

c. Skrining fitokimia ekstrak etanol jukut pendul

Uji skrining fitokimia meliputi pengujian terhadap senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid. Prosedur pengujian ini merupakan modifikasi dari penelitian oleh Cahyaningsih dkk., (2019).

1) Uji alkaloid

Sebanyak 3 ml dicampurkan dengan 3 tetes asam klorida 2 N. Campuran tersebut kemudian dibagi menjadi dua tabung. Tabung pertama ditambahkan 1 ml reagen Dragendroff, sementara tabung kedua ditambahkan 1 ml reagen Mayer Wagner. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga merah pada tabung pertama dan endapan putih pada tabung kedua.

2) Uji flavonoid

Sebanyak 1 ml sampel dicampurkan dengan 0,1 g Mg atau sekitar seujung spatula, lalu ditambahkan reagen HCl pekat sebanyak 10 tetes. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga.

3) Uji tanin

Sebanyak 2 ml sampel dicampurkan dengan 1-2 tetes reagen  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif tanin ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman.

4) Uji saponin

Sebanyak 1 ml sampel dicampurkan dengan 10 ml air panas dan 1 tetes asam klorida 2 N, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Apabila terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit, maka menandakan adanya senyawa saponin.

5) Uji steroid dan terpenoid

Sebanyak 3 ml sampel dicampurkan dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, lalu dikocok. Adanya kandungan steroid dan terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah.



- d. Pembuatan ekstrak etanol jukut pendul konsentrasi 5, 10, 20 dan 40%
- 1) Variasi konsentrasi ekstrak 5, 10, 20 dan 40% dibuat dengan mengencerkan ekstrak pekat dengan pelarut etanol 96% memakai presentase perbandingan konsentrasi % b/v.
  - 2) Banyaknya massa ekstrak pekat yang diperlukan untuk membuat masing-masing konsentrasi ekstrak dengan volume 5 ml disajikan dalam Tabel 4.

**Tabel 4**  
**Variasi Konsentrasi**

Konsentrasi ekstrak (%)	Massa ekstrak etanol jukut pendul 100% (gram)	Volume Etanol 96% (ml)
5	0,25	5
10	0,5	5
20	1,0	5
40	2,0	5
<b>Total</b>	<b>3,75</b>	<b>20</b>

- 3) Kemudian, ekstrak pekat yang telah dicampur dengan etanol dihomogenkan dan disimpan.

e. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

- 1) Untuk membuat 19 media *Muller Hinton Agar* (MHA) dengan ketebalan 4 mm, banyaknya larutan media MHA yang dibutuhkan yaitu 500 ml. Berdasarkan etiket pembuatan media MHA, sebanyak 38,0 g bubuk media dilarutkan ke dalam satu liter aquadest. Dengan begitu, untuk membuat sebanyak 500 ml media, maka memerlukan sebanyak 19 g bubuk media MHA. Bubuk media ditimbang dengan menggunakan neraca analitik dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian, sebanyak 500 ml aquadest ditambahkan ke dalam erlenmeyer.

- 2) Selanjutnya, media dihomogenkan atau dilarutkan dengan cara pemanasan menggunakan *hotplate* selagi diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga benar-benar larut.
- 3) Apabila media telah terlarut dengan sempurna, pH media diukur dengan memakai stick pH (pH optimal berada antara 7,2 dan 7,4 pada suhu ruang).
- 4) Kemudian, media disterilisasi di dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C.
- 5) Setelah disterilisasi, keluarkan media dari *autoclave* dan diamkan selama beberapa menit hingga suhu media turun menjadi ± 40- 45°C.
- 6) Apabila sudah mencapai suhu tersebut, tuangkan media ke dalam cawan petri sebanyak ± 25 ml, lalu tunggu hingga media memadat.

f. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

- 1) Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC yang berusia 24 jam diambil dengan ose secara aseptis dan dihomogenkan ke 10 ml larutan NaCl 0,9% steril.
- 2) Suspensi bakteri yang dibuat diukur kekeruhannya dengan menggunakan Mac Farland densitometer hingga didapatkan konsentrasi suspense bakteri 0,5 Mac Farland yang setara dengan  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml.

g. Uji daya hambat antibakteri

Prosedur pengujian daya hambat antibakteri pada penelitian ini diadaptasi dari standar prosedur menurut CLSI (2012), yaitu sebagai berikut.

- 1) Dalam waktu 15 menit setelah membuat suspensi bakteri, celupkan lidi kapas steril ke dalam suspensi bakteri 0,5 Mac Farland *Staphylococcus aureus* dan ditunggu hingga lidi kapas benar-benar telah terbaluri oleh suspensi bakteri.

- 2) Suspensi bakteri diinokulasikan dengan menggoreskan lidi kapas pada permukaan media MHA secara merata. Putar media dengan sudut 60°, lalu goreskan kembali lidi kapas ke permukaan media. Ulangi tahap ini sebanyak 2 kali untuk memastikan penyebaran suspensi secara merata. Sebagai langkah terakhir, usap tepi agar-agar.
- 3) Biarkan tutupnya terbuka selama tiga hingga lima menit, tetapi tidak lebih dari 15 menit, untuk memungkinkan kelembaban permukaan berlebih diserap sebelum menempatkan cakram disk.
- 4) Kemudian, cakram disk yang telah dijenuhkan oleh ekstrak etanol jukut pendul dengan konsentrasi masing-masing 5, 10, 20, dan 40% ditempelkan pada permukaan media MHA dengan jarak minimal antara cakram 24 mm.
- 5) Cakram disk ditekan-tekan secara perlahan untuk memastikan cakram sepenuhnya kontak dengan media MHA.
- 6) Kontrol kerja menggunakan cakram antibiotik *Ciprofloxacin* 5 µg ditempelkan pada media MHA yang berbeda dari media kelompok eksperimen.
- 7) Media MHA yang telah berisi cakram disk diinkubasi dalam keadaan terbalik pada *incubator* dengan suhu 35±2°C selama 18-24 jam.
- 8) Daya hambat ekstrak etanol jukut pendul dilaporkan dengan pelaporan hasil diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada media MHA. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong yang dihitung dari ujung ke ujung zona hambat.

## **F. Pengolahan dan Analisis Data**

### **1. Teknik pengolahan data**

Data primer dalam penelitian aktivitas antibakteri ekstrak etanol jukut pendul yang berupa diameter zona hambat dalam satuan milimeter (mm) diolah dengan menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating data atau data yang ditampilkan berupa table dan naratif.

### **2. Analisis data**

Dari data yang diperoleh, data dianalisis secara kuantitatif meliputi kegiatan seperti pengolahan dan penyajian data, perhitungan data, dan pengujian hipotesis yang akan dilakukan melalui uji statistik dengan bantuan dari perangkat lunak SPSS. Analisis data melewati beberapa uji statistik yang meliputi uji normalitas, uji homogenitas varians, dan uji statistik inferensial. Dalam penelitian ini, uji normalitas yang akan digunakan adalah uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis berdistribusi normal atau tidak. Data yang berdistribusi normal diuji menggunakan uji statistik *One-way Anova*. Sementara, apabila data berdistribusi tidak normal maka uji yang dapat digunakan adalah uji *Kruskal Wallis*.