

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan penelitian *true eksperimental* dengan rancangan penelitian *posttest only control group design*. Dalam desain *true experimental* peneliti bisa mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen (Sugiyono., 2019). Notoatmodjo, (2015) memaparkan bahwa gambar dari rancangan ini seperti:

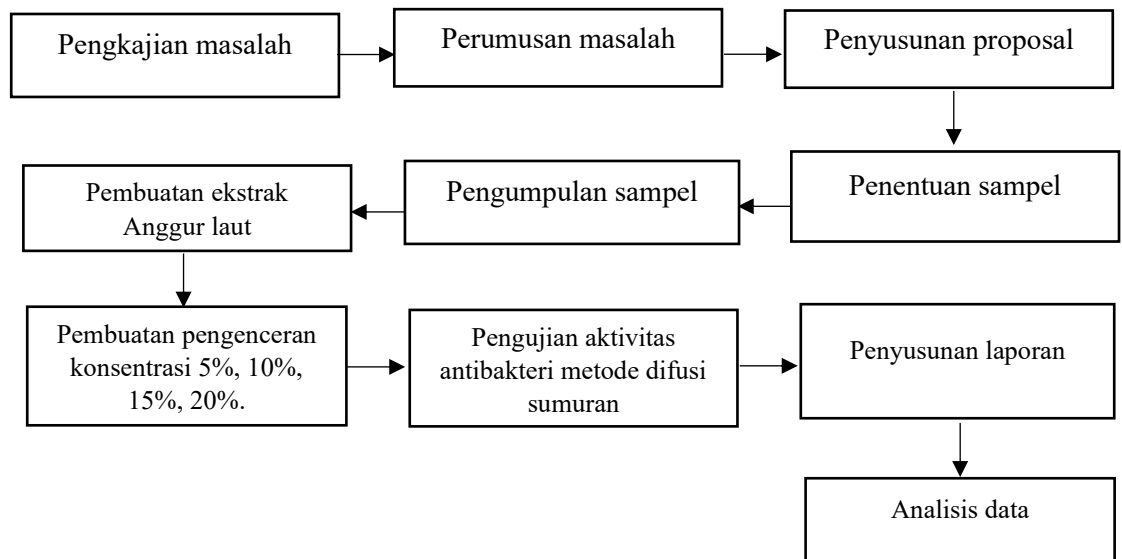
	Perlakuan	Posstest
R1 (Kelompok Eksperimen)	X	02
R2 (Kelompok Kontrol)	-	02

Gambar 5. Desain Penelitian *Posttest Only Control Group Design*

Keterangan

- R1 : Kelompok eksperimen, dalam penelitian ini yaitu sejumlah konsentrasi dari ekstrak etanol Anggur laut.
- R2 : Kelompok kontrol dalam penelitian yaitu kontrol negatif adalah etanol 96% dan kontrol positif dalam penelitian ini adalah antibiotik ampicillin.
- X : Perlakuan konsentrasi ekstrak etanol Anggur laut 5%, 10%, 15%, 20%.
- 02 : Diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus sp.*

B. Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar di Jl. Pulau Moyo No.33 A, Pedungan, Denpasar Selatan, Kota Denpasar, Bali 80222 dan Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO) di Jl. Raya Besakih, Menanga, Kec. Rendang, Kab.Karangasem, Bali.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan bulan Februari – April 2025.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah Anggur laut (*Caulerpa sp*) yang didapat dari Desa. Sumberkima, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng, Provinsi Bali.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak Anggur laut (*Caulerpa sp*) dibedakan menjadi 4 kelompok berdasarkan perbedaan konsentrasi perlakuan pemberian ekstrak Anggur laut konsentrasi 5%, 10% 15%, 20%, di lain sisi juga ditambahkan kontrol negatif dan positif. Pada kontrol positif yaitu bakteri *Streptococcus sp* yang dilakukan induksi dengan antibiotik ampicillin, di sisi lain dalam golongan kontrol negatif dilakukan induksi dengan pelarut etanol 96% (Kawengian, Wuisan, dan Leman., 2017).

a. Unit analisis

Unit analisis dari penelitian ini yaitu diameter zona hambat yang dihasilkan dari berbagi konsentrasi ekstrak etanol Anggur laut adalah konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus sp*.

b. Besar sampel

Pada proses ekstraksi ekstrak etanol Anggur laut didapatkan konsentrasi 100% dijadikan sebagai stok sampel. Ekstrak Anggur laut dibuat 4 konsentrasi yaitu 5%, 10%, 15%, 20% dengan mengencerkan stok sampel menggunakan pelarut etanol 96% sehingga besar sampel yang dibutuhkan adalah 300 gram. Pada penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran. Pada masing-masing perlakuan itu dilakukan pengulangan. Pengulangan masing-masing seri konsentrasi dalam penelitian ini bisa ditentukan dengan persamaan Federer sebagai berikut:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

$$(p-1)(n-1) \geq 15$$

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan persamaan Federer diatas bisa dijelaskan bahwa dalam penelitian ini memerlukan pengulangan sejumlah 4 kali, sehingga total sampel yang diperlukan dalam penelitian ini sejumlah 24 sampel.

c. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini yaitu *purposive sampling*. *Purposive sampling* yaitu teknik dengan sampel yang relevan pada tujuan penelitian dan memiliki ciri-ciri khusus. Ciri khusus itu ditentukan oleh keputusan peneliti (Asrulla dkk, 2023).

1) Kriteria inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini yaitu jenis sampel Anggur laut yang akan digunakan yaitu *Caulerpa sp*, Anggur laut dalam kondisi segar berwarna hijau, bagian yang digunakan yaitu batang (stolon) dan ramuli (berbentuk bulat atau lonjong), Anggur laut yang diambil di daerah Desa. Sumberkima, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng, Provinsi Bali.

2) Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi pada penelitian ini yaitu sampel Anggur laut yang tidak segar yang berwarna kuning atau kecokelatan, rusak, membusuk dan layu.

d. Alat dan bahan

1) Alat uji fitokimia

tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikropipet dan tip, pipet tetes.

2) Alat metode difusi sumuran

Alat yang dipergunakan adalah *autoclave*, api bunsen, corong, *beaker glass*, rak tabung, tabung reaksi, pipet biasa, stirer pengaduk, gelas ukur, sendok kecil, cawan petri, erlenmeyer, penangas/kompor pipet pasteur, pinset inkubator, *spreader glass (L shape)*, mikroskop, *vortex*, *laminar airflow*, tabung sentrifuge, kawat ose, *cotton swab*, plastik wrap, label, penggaris, *hand gloves*, masker, neraca analitik, jangka sorong, spiritus, ose, aluminium foil.

3) Alat metode dilusi

Neraca analitik, pipet ukur, mikropipet, gelas ukur, *rotary evaporator*, gelas beaker, tabung reaksi, rak tabung reaksi, ose bulat, pinset, *hotplate*, *magnetic stirrer*, bunsen spritus, McFarland densitometer, inkubator, autoklaf, labu Erlenmeyer, anaerobic jar.

1) Bahan uji fitokimia

Ekstrak kental 100%, HCl, pereaksi

2) Bahan metode difusi sumuran

Bahan yang dipergunakan adalah pelarut etanol 96%, ekstrak Anggur laut, bakteri *Streptococcus sp*, media (*Muller Hinton Agar*) MHA, antibiotik ampicillin.

3) Bahan metode dilusi

Ekstrak Anggur laut, aquadest steril, etanol 96%, biakan bakteri *Streptococcus sp*, media *Mueller Hinton Broth* (MHB), McFarland, NaCl 0,9%, *yellow tip*, *blue tip*, *aluminium foil*, kapas steril, *tissue*, benang, dan alkohol 70%.

4) Prosedur kerja Metode Difusi Sumuran

a) Pra analitik

1) Persiapan sampel

Persiapkan Anggur laut (*Caulerpa sp*) dipilih sesuai kriteria inklusi sebanyak 10 kg lalu dicuci bersih menggunakan air mengalir hingga bersih.

b) Analitik

1) Pembuatan serbuk simplisia

Sampel Anggur laut sebanyak 10 kg dipotong kemudian dikeringkan di rumah hybrid selama 5 hari lalu di oven dengan suhu 40 °C selama 2 jam. Lalu sampel Anggur laut (*Caulerpa sp*) dihaluskan menggunakan blender hingga diperoleh serbuk simplisia kering.

2) Pembuatan ekstrak Anggur laut

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 300 gram ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 1500 ml lalu dimasukkan dalam wadah, ditutup dan diekstraksi secara maserasi selama 3 x 24 jam sambil sesekali diaduk, kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan ampas. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 45-50°C sampai diperoleh ekstrak kental dan disimpan dalam wadah tertutup (Alice, Amelia, dan Sari., 2022).

3) Uji Fitokimia

1. Uji Alkaloid

Uji dilakukan dengan menambahkan 1 ml ekstrak ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 ml larutan HCl. Selanjutnya, ditambahkan 1 ml pereaksi Dragendorff. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna jingga atau merah, yang mengindikasikan keberadaan senyawa alkaloid.

2. Uji Flavonoid

Sebanyak 1 ml ekstrak dicampurkan dengan 100 ml air panas, kemudian campuran tersebut dididihkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat sebanyak 5 ml diambil, lalu ditambahkan 0,5 gram serbuk magnesium dan 1 ml HCl pekat, kemudian dikocok. Reaksi positif terhadap flavonoid ditunjukkan dengan munculnya warna merah, kuning, atau jingga.

3. Uji Steroid

Sebanyak 2 ml ekstrak ditambahkan dengan 10 tetes asam asetat anhidrat, kemudian ditambahkan 2 tetes asam sulfat pekat. Larutan dikocok secara perlahan dan diamati. Kehadiran senyawa steroid ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi biru atau hijau.

4. Uji Tanin

Sebanyak 1 ml ekstrak ditetesi dengan 10–15 tetes larutan FeCl_3 5%. Reaksi positif terhadap senyawa tanin ditandai dengan munculnya warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam.

4) Pembuatan seri konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dan kontrol

1. Pembuatan kontrol positif dengan menghaluskan antibiotik ampicillin tablet 500 gram digerus hingga halus lalu dilarutkan dengan Hcl 0,1 % sebanyak 10 ml, dihomogenkan lalu ambil 1 ml dan dilarutkan Hcl 0,1% sebanyak 9 ml, pipet 2 mikroliter dimasukkan disumuran kontrol positif.

1. Dibuat konsentrasi ekstrak etanol 5%, 10%, 15%, 20% pembuatan konsentrasi dengan menggunakan rumus: $M_1.V_1=M_2.V_2$

Keterangan:

M_1 : Konsentrasi awal

V_1 : Volume sampel yang dicari

M_2 : Konsentrasi yang dicari

V_2 : Volume akhir yang diinginkan

Berdasarkan rumus diatas, maka dapat dicari massa ekstrak etanol Anggur laut yang akan digunakan dalam pembuatan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% yang dibuat dalam 5 ml massa campuran yang disajikan dalam table berikut:

Tabel 3

Pembuatan Pengenceran Konsentrasi Ekstrak Anggur laut

No	Konsentrasi Ekstrak %	Ekstrak (gram)	Etanol 96% (ml)
1	5	0,25	4,75
2	10	0,5	4,5
3	15	0,75	4,25
4	20	1	4

(Sumber: Data Primer 2025)

2. Pembuatan media *Muller Hinton Agar* (MHA) yang Disuplementasi dengan 5% Darah Kambing

Media (*Mueller Hinton Agar*) MHA bisa dibuat dengan menimbang 3,8 gram media, masukkan media ke erlenmeyer 250 ml yang telah disanitasi, melarutkan media di 100 mL air suling, dan memanaskannya sampai mendidih. Kemudian, tutup permukaan Erlenmeyer dengan kain kasa katun. Media lalu disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Setelah prosedur sterilisasi selesai, media dikeluarkan dari autoklaf dan didiamkan hingga mencapai suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ (hangat). Ditambahkan darah kambing 5% sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* agar darah tidak menggumpal. Media kemudian dituangkan ke dalam setiap cawan petri yang menampung ± 60 mL dan dibiarkan membeku. Jika media dalam cawan petri mulai membeku, media dapat digunakan untuk pengujian (Sidoretno., 2021).

5. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus sp*

Biakan bakteri diambil 2 ose bakteri *Streptococcus sp*, koloni bakteri uji disuspensikan dalam 5 mL natrium klorida (NaCl) 0,9% ke tabung reaksi yang steril dihomogenkan menggunakan vortex. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya kekeruhan dibandingkan dengan Mc. Farland (Hainil, Sammulia, dan Adella., 2022).

6) Uji aktivitas antibakteri metode difusi sumuran

Siapkan suspensi bakteri *Streptococcus sp* celupkan *cotton swab* steril lalu dimasukkan pada suspensi itu, ditiriskan *cotton swab* steril lalu menekannya di dinding dalam tabung, diangkat lakukan inokulasi di media *Muller Hinton Agar* (MHA) goresan dilakukan secara merata sampai tertutup semua permukaan media, melakukan inokulasi pada media *Muller Hinton Agar* (MHA) dengan suspensi bakteri *Streptococcus sp* didiamkan selama 2 menit agar suspensi bakteri meresap

kedalam agar, dibuat sumuran menggunakan cawan petri dengan diameter masing-masing sumur 6 mm, masing-masing larutan uji konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dimasukkan sebanyak 25 µl ke dalam sumuran, kontrol negatif menggunakan etanol 96% dimasukkan sebanyak 25 µl ke dalam sumuran dan kontrol positif menggunakan antibiotik ampicillin dimasukkan sebanyak 2 µl ke dalam sumuran lalu di inkubasi dalam waktu 24 jam di suhu 37° C dan diamati zona bening yang terbentuk.

c) Pasca analitik

1) Mengukur zona hambat

Hasilnya dicatat setelah mengamati zona hambatan, yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekeliling sumur, dilakukan pengukuran menggunakan jangka sorong dari sisi ke sisi melalui bagian tengah sumur, melaporkan hasilnya dalam milimeter (mm) (Rahayuningsih dkk., 2023). Kriteria kekuatan dari antibakteri yang dipakai di penelitian ini pada ekstrak ditentukan dengan pengukuran diameter zona hambatnya yaitu:

1. Sangat kuat bila diameter zona hambat mencapai > 20 mm.
2. Kuat bila diameter zona hambat mencapai 10 - 20 mm.
3. Kekuatan sedang bila diameter zona hambat mencapai 5 - 10 mm.
4. Kekuatan lemah bilamana diameter zona hambat mencapai < 5 mm.

5) Prosedur Kerja Metode Dilusi

a) Pra analitik

Persiapkan alat dan bahan yang digunakan lalu sterilkan meja kerja dengan menggunakan alkohol, hidupkan api bunsen lalu siap melakukan pengujian.

b) Analitik

1. Siapkan 6 tabung reaksi steril lalu beri label 1 – 6.

2. Tabung 1 diisi sebanyak 4 ml konsentrasi 100% ekstrak Anggur laut.
3. Tabung 1 – 6 diisi dengan 0,5 ml media cair *Mueller Hinton Broth* (MHB).
4. Ambil 0,5 ml larutan dari tabung satu, kemudian masukkan ke tabung dua, lalu campurkan hingga homogen hal yang sama dilakukan hingga tabung 6 sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak 50%,25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%. Seluruh konsentrasi ekstrak dilakukan perbandingan 1:2.
5. Ambil suspensi bakteri yang sudah disetarakan dengan standar kekeruhan McFarland sebanyak 0,5 ml, lalu masukkan ke dalam tabung pada tabung 1-6.
6. Tabung 7 hanya isi ekstrak anggur laut 0,5 ml.
7. Tabung 8 hanya isi media MHB dan suspensi bakteri.
8. Lalu dilanjutkan dengan pengujian Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) disubkultur tabung 1-8 dengan media MHA dengan ambil 1 cotton swab lalu di streak sebelum inkubasi dan sesudah inkubasi, inkubasi pada alat inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C.

c) Pasca analitik

- 1) Lakukan pengamatan sebelum inkubasi dilihat pertumbuhan bakteri pada media MHA dan sesudah inkubasi pada media MHA.
- 2) Hasil uji konsentrasi bunuh minimum (KBM) dilihat apakah ada pertumbuhan bakteri di media MHA sebelum inkubasi dan sesudah inkubasi dilihat di konsentrasi berapa KBM dan MIC nya.
- 3) Setelah dilakukan pengujian alat-alat,meja kerja disterilkan dengan bersih menggunakan alkohol 70% dan dicuci hingga bersih,sisa-sisa sample pengujian dilakukan proses destruksi di alat autoklaf.

E. Jenis Data dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data primer yaitu data diperoleh secara langsung yang dilakukan oleh peneliti. Data primer pada penelitian ini berupa diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus sp* pada sejumlah konsentrasi ekstrak Anggur laut yang didapat dari pengukuran di laboratorium.

b. Data sekunder

Data sekunder yaitu data sumber yang tidak langsung dimana memberikan data untuk peneliti, data itu didapat dari sumber yang bisa memberikan dukungan penelitian seperti dari literatur serta dokumentasi (Sugiyono, 2012). Data sekunder dari penelitian ini adalah penelitian terdahulu, data statistik, data kualitatif, artikel, jurnal, dan buku.

2. Teknik pengumpulan data

Metode difusi sumur Kirby-Bauer digunakan dalam penelitian observasional dan laboratorium ini untuk mengukur diameter zona penghambatan ekstrak etanol Anggur laut terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus sp*. Setiap unit analisis yang menunjukkan aktivitas penghambatan diukur diameter zona penghambatannya, dan hasilnya dilaporkan dalam satuan milimeter (mm).

3. Instrumen pengumpulan data

a. Kamera sebagai alat dokumentasi

b. Alat pelindung diri (APD), digunakan sebagai pelindung diri dari resiko kerja

- c. Alat tulis digunakan untuk mencatat data

4. Pengolahan dan Analisis Data

a. Teknik pengolahan data

Data yang didapat dari penelitian ini berupa zona hambat ekstrak pada pertumbuhan *Streptococcus sp* diolah secara tabulating data (data yang disajikan dalam bentuk tabel) dan narasi.

b. Analisis data

Data yang diperoleh dari penelitian ini lakukan analisis dengan *Uji Shapiro-Wilk* sebagai uji normalitas dan *Levene Test* sebagai uji homogenitas. Apa bila suatu data memiliki nilai $p \geq 0,05$, maka data itu bisa dikatakan memiliki distribusi normal dan homogen dan akan dilanjutkan dengan Uji One-Way ANOVA dalam mengetahui rata-rata perbedaan nilai antar kelompok (Ramadhan dkk., 2023). Bila nilai $p \geq 0,05$ atau distribusi data tidak normal dan tidak homogen, data itu tidak bisa dilakukan Uji One-Way ANOVA sehingga bisa digantikan dengan melakukan Uji Kruskal-Wallis (Albab *et al.*, 2020). Dilanjutkan dengan Uji *Post Hoc Games Howell* digunakan apabila data yang diperoleh tidak homogen, namun jika data yang diperoleh homogen digunakan Uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan (Chismirina, Andayani, dan Ginting., 2014). Analisis data menggunakan software komersial.

6. Etika Penelitian

Bakteri coba diperlakukan selaras dengan kode etik penelitian yang berlaku. Pada penelitian ini menggunakan bakteri *Streptococcus sp*. Adapun etika seorang peneliti antara lain (Putra dkk., 2023):

1. Kejujuran

Kejujuran berarti jujur tentang kelemahan atau kegagalan teknik yang digunakan dalam pengumpulan referensi, pengumpulan data, penerapan metode dan cara kerja penelitian, publikasi hasil, dan sebagainya. Saat berbagi penelitian ilmiah, penting untuk jujur tentang data, temuan, metode, dan proses. Tidak dapat diterima untuk memalsukan, mengubah, atau mengarang data, juga tidak dapat diterima untuk menyesatkan penyandang dana penelitian, kolega, atau publik.

2. Objektivitas

Objektivitas bertujuan untuk mengurangi prasangka dan ketidaktepatan dalam analisis penelitian; oleh karena itu, penelitian harus dilakukan secara objektif, baik dalam metode maupun unsur-unsurnya. Untuk mencapai objektivitas, penelitian perlu dilakukan secara transparan, bebas dari pengaruh subjektif dan bias, memakai metode pengumpulan, analisis data yang mungkin interpretasi akurat, bertanggung jawab. Ini termasuk upaya meminimalkan bias atau penipuan diri, mengungkapkan potensi konflik kepentingan finansial maupun pribadi yang bisa memengaruhi hasil, serta menghindari bias dalam menafsirkan data, menganalisis, dan memilih objek penelitian yang relevan.

3. Integritas

Integritas dalam penelitian ini berarti menjaga keselarasan antara pikiran, tindakan secara konsisten. Ini mencakup penghargaan terhadap komitmen dan kesepakatan, menjunjung tinggi perilaku yang terhormat, serta berusaha mempertahankan konsistensi dalam cara berpikir dan bertindak.

4. Ketepatan

Secara teknis, alat yang digunakan untuk mengumpulkan data harus memiliki tingkat validitas, reliabilitas yang memadai. Selain itu, rancangan penelitian, pemilihan sampel, metode analisis data harus disusun secara tepat, karena ketepatan merupakan elemen krusial dalam penelitian. Untuk menjamin hal ini, penting untuk menghindari kesalahan atau kelalaian yang tidak disengaja, melakukan peninjauan yang cermat, kritis terhadap pekerjaan sendiri maupun rekan, serta mendokumentasikan secara lengkap seluruh aktivitas yang berkaitan dengan penelitian, termasuk proses pengumpulan data, perancangan studi, dan komunikasi dengan lembaga atau penerbit.

5. Tanggung Jawab Sosial

Peneliti mempunyai tanggung jawab sosial untuk membantu masyarakat yang ingin memanfaatkan hasil penelitiannya. Termasuk upaya menjamin bahwa hasil penelitian memberikan kontribusi nyata bagi kesejahteraan masyarakat, mendorong peningkatan kualitas hidup, mempermudah aktivitas sehari-hari, serta mengurangi beban sosial. Penelitian sebaiknya diarahkan untuk mendorong nilai-nilai sosial yang positif, serta mencegah atau meminimalkan dampak negatif terhadap masyarakat melalui kegiatan ilmiah, edukasi publik, dan advokasi.

6. Kompetensi

Kompetensi berarti peneliti harus memiliki pengetahuan, keterampilan sesuai dengan bidang ilmiannya. Penting untuk terus mengembangkan kemampuan, wawasan profesional melalui pendidikan serta pembelajaran berkelanjutan, sekaligus mendorong peningkatan keahlian dalam ilmu pengetahuan secara umum.

7. Legalitas

Legalitas mengacu pada kewajiban untuk memahami, mematuhi aturan yang ditetapkan oleh pemerintah serta lembaga yang berkaitan dengan kegiatan penelitian. Peneliti dituntut untuk mematuhi regulasi dan kebijakan yang berlaku, mengkomunikasikan tujuan penelitian secara jelas, serta bersikap transparan dalam proses pengumpulan data dari responden. Meski demikian, dalam situasi tertentu, menjaga kerahasiaan menjadi penting, terutama untuk melindungi keselamatan subjek penelitian. Jika data yang dikumpulkan berpotensi membahayakan responden, maka perlu diperoleh izin terlebih dahulu, dengan batasan yang ditentukan secara jelas dan menyeluruh.