

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *True Experimental Design* atau eksperimen sebenarnya. Penelitian eksperimen merupakan jenis penelitian yang memiliki tujuan untuk membuktikan pengaruh suatu perlakuan terhadap akibat dari perlakuan tersebut (Farhan Arib *et al.*, 2024). Desain penelitian yang digunakan yaitu *Post-test Only Controlled Group Design* dengan gambaran skema sebagai berikut ini:

Tabel 2
Desain Penelitian *Posttest Only Controlled Group Design*

Kelompok	Perlakuan	Posttest
R1	X	O1
R2	Kontrol	O2

Keterangan:

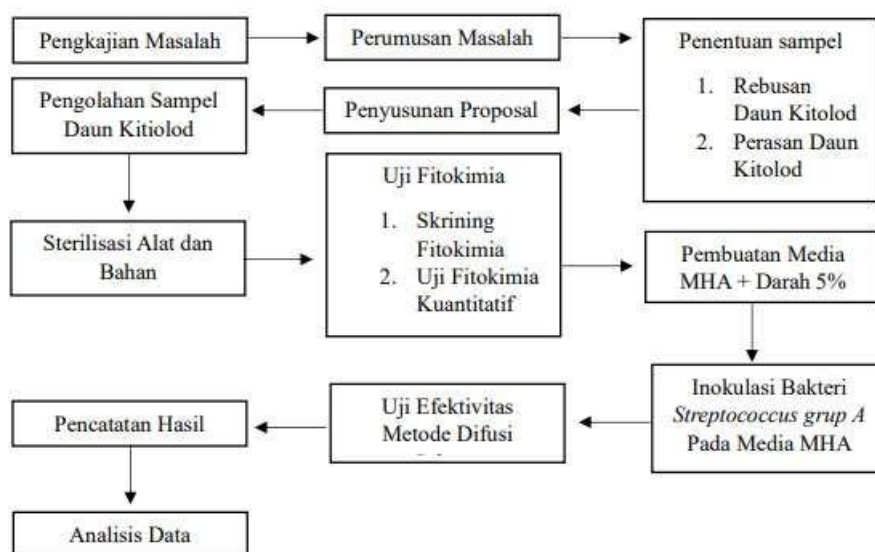
- R1 (Random 1) : Kelompok penelitian atau eksperimen pertama yang diberikan perlakuan yaitu rebusan daun kitolod dan perasan daun kitolod dengan konsentrasi masing-masing 50%, 65%, 80%, 95%.
- R2 (Random 2) : Kelompok penelitian atau eksperimen kedua yang diberikan perlakuan yaitu kontrol, kontrol positif yang digunakan adalah amoxicillin 10 mcg dan kontrol negatif yang digunakan adalah aquades.
- X (Exposure) : Intervensi atau perlakuan yang dilakukan

Observasi (O1) : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus grup A (S. pyogenes)*.

Observasi (O2) : Diameter zona hambat oleh kontrol positif dan kontrol negatif.

B. Alur Penelitian

Alur Penelitian pada penelitian ini yaitu, sebagai berikut:



Gambar 4 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Uji skrining fitokimia dan uji fitokimia kuantitatif dilakukan di Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa, sedangkan uji efektivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari hingga April 2025.

D. Sampel

1. Unit analisis

Pada penelitian ini yang menjadi unit analisis adalah senyawa fitokimia yang meliputi alkaloid, flavonoid, steroid, tanin, fenol, terpenoid, saponin, total kadar flavonoid, total kadar fenol, dan total kadar tanin. Dan diameter zona daya hambat yang terbentuk akibat pemberian perlakuan berbagai konsentrasi rebusan daun kitolod dan perasan daun kitolod, konsentrasi yang digunakan yaitu 50%, 65%, 80%, dan 95%.

2. Sampel

Sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kitolod yang tumbuh dan dipetik di daerah Kintamani yang kemudian diolah secara tradisional yaitu direbus dan diperas. Daun kitolod yang digunakan dipilih berdasarkan kriteria yang ditetapkan oleh peneliti. Berikut kriteria daun kitolod yang akan digunakan:

- a. Daun kitolod yang memiliki wana hijau tua
- b. Daun kitolod yang tumbuh pada baris ketiga dan keempat dari pucuknya
- c. Tidak berlubang dan robek
- d. Tidak memiliki bagian yang busuk
- e. Disimpan pada suhu ruang tidak lebih dari 24 jam setelah dipetik

Daun kitolod yang didapatkan dicuci bersih dengan air mengalir, dan dipotong kecil-kecil, 100 gram daun direbus dengan 100 ml aquades, hal ini berlaku kelipatan. Kemudian untuk perasan, 100 gram daun kitolod dipotong kecil ditambah 100 ml aquades kemudian diperas. Hasil rebusan dan perasan disaring menggunakan kertas saring.

3. Jumlah dan besar sampel

Penelitian ini menggunakan sampel rebusan dan perasan daun kitolod dengan masing-masing konsentrasi 50%, 65%, 80%, dan 95%. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik amoxicillin 10 mcg dan kontrol negatif yang digunakan adalah aquades. Sehingga sesuai dengan konsentrasi sampel total perlakuan pada penelitian ini adalah 4 perlakuan. Untuk pengulangan yang dilakukan dapat ditentukan dengan rumus federer yang ditemukan oleh Walter Theodore Federer, yaitu sebagai berikut:

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

Keterangan:

t = Jumlah perlakuan

r = Jumlah ulangan

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

$$3 (r - 1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 15 + 3$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan hasil perhitungan dengan rumus federer, maka pengulangan dalam penelitian ini dilakukan masing-masing sebanyak 6 kali pengulangan. Sehingga total untuk 1 sampel adalah 24. Pada penelitian ini digunakan dua jenis sampel yaitu rebusan daun kitolod dan perasan daun kitolod, maka total sampel pada penelitian ini adalah 48.

4. Alat, bahan, dan prosedur kerja

a. Alat

Tabung serologi, rak tabung, hot plate, pipet ukur, pipet tetes, ball pipet, erlemayer 100 ml, glass ukur 100 ml, beaker glass 100 ml, spektrofotometer UV-Vis, cawan petri, timbangan analitik, spidol, cakram *disk* ukuran 6 mm, swab steril, mikropipet, tip, penggaris, autoclap, aluminium foil, BSC.

b. Bahan

Rebusan daun kitolod, perasan daun kitolod, etanol 95%, aquades, etanol 96%, mayer dan wagner, serbuk magnesium, kloroform, anhidrida asetat, asam sulfat pekat, FeCl_3 , HCl 2 N, buffer fosfat sitrat, folinciaocalteau, Na_2CO_3 5%, NaNO_2 (10%), AlCl_3 (10%), NaOH (1%), Folin-Denis, bubuk media *Mueller Hinton Agar* 3,8 gram, 5% darah domba, antibiotik amoxicillin 10 mikrogram (mcg), aquades.

c. Prosedur kerja

1) Preparasi sampel

Sampel yang dipetik sesuai dengan kriteria dipotong kecil dan ditimbang sebanyak 100 gram, kemudian ditambahkan 100 ml aquades, rebus dengan suhu 90-100°C selama 15 menit, setelah dingin saring larutan dengan kertas saring. Untuk sampel perasan, daun kitolod yang dipotong kecil ditimbang sebanyak 100 gram dan ditambahkan 100 ml aquades, kemudian diperas dan larutan disaring dengan kertas saring. Sampel rebusan dan perasan daun kitolod yang telah disaring diencerkan masing-masing dengan konsentrasi 50%, 65%, 80%, dan 95% untuk uji antibakteri.

2) Uji fitokimia

a) Uji alkaloid

Pipet 3 ml sampel bahan alam (rebusan dan atau perasan daun kitolod), kemudian tambahkan beberapa tetes asam sulfat 2N atau asam klorida 2N, bagi larutan sampel menjadi 2 bagian, dan tambahkan satu bagian dengan 1-2 tetes reagen Mayer dan Wagner, dan yang lain ditambahkan 1-2 tetes reagen Dragendorf, amati perubahan warna yang terjadi hasil positif bila terbentuk endapan coklat kemerahan dengan reagen Dragendorf dan terdapat endapan putih kekuningan dengan reagen Mayer dan Wagner (Wahyu Ariawan dkk., 2024).

b) Uji flavonoid

Pipet 1 ml sampel bahan alam, kemudian tambahkan 0,1 mg serbuk magnesium dan tambahkan 0,4 mL amil alkohol, kemudian 4 mL etanol, setelah itu kocok pelan campuran dan amati perubahan yang terjadi, hasil positif jika terbentuk warna merah, kuning atau orange (Wahyu Ariawan dkk., 2024).

c) Uji terpenoid dan steroid

Pipet 1 ml sampel bahan alam, kemudian tambahkan 2 ml kloroform, 10 tetes anhidrida asetat, 3 tetes asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Amati perubahan yang terjadi, hasil positif jika terjadi warna merah kecoklatan kemudian berubah menjadi biru, ungu dan kehijauan (Wahyu Ariawan dkk., 2024).

d) Uji saponin

Pipet 1 ml sampel bahan alam kemudian tambahkan 10 ml air panas, kocok kuat-kuat campuran selama 10 detik dan amati busa yang muncul selama 5 menit. Setelah itu tambahkan 1 tetes HCl 2 N dan amati perubahan yang terjadi, hasil

positif jika busa yang terbentuk tidak hilang (Wahyu Ariawan dkk., 2024).

e) Uji fenol

Pipet 1 ml sampel bahan alam, kemudian tambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 5%. Amati perubahan yang terjadi, untuk hasil positif akan terbentuk warna hijau atau hijau biru kehitaman (Wahyu Ariawan dkk., 2024).

f) Tanin

Pipet 2 ml sampel dan tambahkan beberapa tetes FeCl_3 , homogenkan dan lihat perubahan warna, sampel positif apabila terdapat perubahan warna hijau kehitaman, hijau kebiruan, dan biru tua (Wahyu Ariawan dkk., 2024).

g) Uji kadar flavonoid

Sebanyak 0,01 g ekstrak diencerkan ke dalam 5 ml buffer fosfat sitrat sesuai perlakuan. Sebanyak 1 ml sampel dicampur dengan 4 ml akuades dan ditambahkan 0,3 ml larutan NaNO_2 (10%). Setelah itu diinkubasi selama 5 menit dan ditambahkan 0,3 ml larutan AlCl_3 (10%) dan 2 ml larutan NaOH (1%), lalu langsung diuji dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 nm. Konsentrasi flavonoid dalam sampel standar kuersetin dan dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin dalam mg QE/g ekstrak (Suhartono dkk., 2018).

h) Uji kadar tanin

Sebanyak 0,01 g ekstrak diencerkan ke dalam 5 ml buffer fosfat sitrat sesuai perlakuan. Sampel yang telah diencerkan di pipet sebanyak 0,25ml lalu ditambahkan 0,25 ml reagen Folin-Denis, kemudian divortex dan ditambahkan 2 ml Na_2CO_3 5%. Larutan di-vortex lalu diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 725 nm. Hasil pembacaan dibandingkan dengan kurva standar menggunakan asam tanat.

Total tanin pada sampel dinyatakan sebagai ekuivalen asam tanat dalam mg TAE/g ekstrak (Suhartono dkk., 2018).

i) Uji kadar fenol

Ambil 0,01 g sampel dan encerkan ke dalam 5 ml buffer fosfat sitrat sesuai perlakuan. Sampel sebanyak 0,1ml dipipet dan masukkan 0,3 ml Etanol 70%. Setelah itu masukkan 0,4 ml Foliniciaocalteau kemudian inkubasi selama 6 menit. Setelah diinkubasi tambahkan 4,2 ml Na₂CO₃ 5% dan di vortex dan diinkubasi selama 90 menit. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 760 nm. Hasil pembacaan dibandingkan dengan kurva standar yang dibuat menggunakan asam galat dan dinyatakan sebagai Gallic Acid Equivalent dalam mg GAE/g ekstrak. (Suhartono dkk., 2018).

j) Pembuatan media MHA + darah domba 5%

Sebanyak 3,8 gram media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) dimasukkan ke dalam labu takar 250 ml, kemudian ditambahkan 100 ml aquades. Campuran tersebut diaduk hingga homogen dan dipanaskan menggunakan hot plate. Selanjutnya, media MHA disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, media MHA ditambahkan 5 ml darah domba secara aseptis, lalu dihomogenkan. Media yang telah siap kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 10 ml per cawan (Nuswantoro and Kartini, 2023).

k) Pengenceran sampel

Sampel daun kitolod yang telah direbus dan diperas kemudian diencerkan ke konsentrasi 50%, 65%, 80%, dan 95% per masing-masing sampel. Pengenceran dilakukan dengan rumus $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$

Keterangan:

M_1 : Konsentrasi awal

V_1 : Volume sampel yang dicari

M_2 : Konsentrasi yang dicari

V_2 : Volume akhir yang diinginkan

Tabel 3
Pengenceran Sampel

No.	Konsentrasi	Rumus dan Perhitungan	Keterangan
1	2	3	4
1	Konsentrasi 50%	$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ $100\% \cdot V_1 = 50\% \cdot 10 \text{ ml}$ $V_1 = \frac{50\% \cdot 10 \text{ ml}}{100\%}$ $V_1 = 5 \text{ ml}$	Pembuatan dengan larutan konsentrasi sampel 50% sebanyak 10 ml diperlukan 5 ml larutan sampel rebusan ataupun perasan daun kitolod dan ditambahkan 5 ml aquades.
2	Konsentrasi 65%	$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ $100\% \cdot V_1 = 65\% \cdot 10 \text{ ml}$ $V_1 = \frac{65\% \cdot 10 \text{ ml}}{100\%}$ $V_1 = 6,5 \text{ ml}$	Pembuatan larutan sampel dengan konsentrasi 65% sebanyak 10 ml diperlukan 6,5 ml larutan sampel rebusan ataupun perasan daun kitolod dan ditambahkan 3,5 ml aquades.
3	Konsentrasi 80%	$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ $100\% \cdot V_1 = 80\% \cdot 10 \text{ ml}$ $V_1 = \frac{80\% \cdot 10 \text{ ml}}{100\%}$ $V_1 = 8 \text{ ml}$	Pembuatan larutan sampel dengan konsentrasi 80% sebanyak 10 ml diperlukan 8 ml larutan sampel rebusan ataupun perasan daun kitolod dan ditambahkan 2 ml aquades.
4	Konsentrasi 95%	$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ $100\% \cdot V_1 = 95\% \cdot 10 \text{ ml}$ $V_1 = \frac{95\% \cdot 10 \text{ ml}}{100\%}$ $V_1 = 9,5 \text{ ml}$	Pembuatan larutan sampel dengan konsentrasi 95% sebanyak 10 ml diperlukan 9,5 ml larutan sampel rebusan ataupun perasan daun kitolod dan ditambahkan 0,5 ml aquades.

l) Pembuatan suspensi bakteri

Sebanyak 5 ml larutan NaCl 0,9% steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril, kemudian ditambahkan satu ose koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*. Campuran tersebut diaduk hingga homogen, lalu kekeruhannya dibandingkan dengan standar kekeruhan McFarland 0,5, yang terdiri dari 9,95 ml H₂SO₄ 1% dan

0,05 ml BaCl₂.2H₂O 1,175%. Standarisasi ini dilakukan agar jumlah bakteri dalam suspensi setara dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Hudzicki, 2016).

m) Uji efektivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram *Kirby-Bauer*

Celupkan swab steril ke dalam suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes*, lalu tekan swab ke sisi dalam tabung untuk menghilangkan kelebihan cairan. Usapkan swab secara merata pada permukaan media MHA sebanyak tiga kali, dengan memutar cawan petri sekitar 60° setiap kali pengusapan guna memastikan distribusi inokulum yang merata. Diamkan media selama 10 menit, kemudian ambil cakram antimikroba dan letakkan pada permukaan media MHA sambil ditekan perlahan agar cakram menempel dengan sempurna. (1) Antimikroba: Rebusan dan perasan daun kitolod dengan konsentrasi 50%, 65%, 80%, 95%. (2) Kontrol positif: antibiotik amoxicillin 10 mikrogram (mcg). (3) Kontrol negatif: aquades. Setelah semua terisi dengan cakram antimikroba cawan petri diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona daya hambat yang terbentuk diukur tepat melewati tengah cakram antimikroba menggunakan penggaris dan dilaporkan dalam satuan milimeter (mm) (Bintari dkk., 2023).

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data yang dikumpulkan pada penelitian ini yaitu berupa data kuantitatif dan data primer yang diperoleh dari uji laboratorium. Data primer yang dihasilkan berupa hasil pengukuran dan analisis senyawa fitokimia yang terkandung pada rebusan daun kitolod, perasan daun kitolod, dan pengukuran diameter zona daya hambat yang nantinya terbentuk pada media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) terhadap

pertumbuhan bakteri *Streptococcus grup A (S. pyogenes)* oleh rebusan daun kitolod dan perasan daun kitolod.

2. Cara pengumpulan data

Data primer dikumpulkan dari hasil melakukan eksperimen di laboratorium yaitu berupa pengukuran dan analisis senyawa fitokimia yang terkandung pada rebusan daun kitolod, perasan daun kitolod, dan pengukuran diameter zona daya hambat terhadap bakteri *Streptococcus grup A (S. pyogenes)* oleh rebusan daun kitolod dan perasan daun kitolod. Dimana hasil pengukuran zona daya hambat dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

3. Instrumen pengumpulan data

Alat-alat dalam pengumpulan data pada penelitian ini, yaitu:

- a. Spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur kadar senyawa antibakteri yang terdapat pada rebusan daun kitolod dan perasan daun kitolod
- b. Jangka sorong untuk mengukur zona daya hambat yang terbentuk
- c. Alat tulis untuk pencatatan hasil
- d. Kamera untuk dokumentasi kegiatan saat penelitian

F. Pengolahan dan Analisa Data

1. Pengolahan data

Data yang diperoleh dari pengukuran zona daya hambat yang terbentuk akibat pemberian perlakuan antara rebusan daun kitolod dan perasan daun kitolod pada varian konsentrasi 50%, 65%, 80%, dan 95% serta kontrol positif dan negatif terhadap bakteri *Streptococcus grup A (S. pyogenes)* akan ditabulasikan ke dalam bentuk tabel dan naratif, yang kemudian dinyatakan dalam bentuk satuan milimeter

(mm) dan akan diolah dengan analisis statistik.

2. Analisis data

Data yang didapatkan pada penelitian ini akan di analisis dengan analisis kuantitatif yang dilakukan melalui bantuan perangkat lunak komputer yaitu uji statistik sebagai berikut:

a. Uji *Shapiro-Wilk*

Uji *shapiro-wilk* biasa digunakan untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak, uji ini digunakan apabila jumlah data kurang dari 50. Dari hasil uji ini akan didapatkan nilai sig yang dimana nilai ini akan menjadi dasar dalam menentukan interpretasi. Adapun interpretasi pada uji ini yaitu $\text{sig} \geq 0,05$ data terdistribusi normal dan $\text{sig} \leq 0,05$ data terdistribusi tidak normal (Raharjo, 2021).

b. Data berdistribusi normal: uji *two way ANOVA (Analysis Of Variance)*

Analysis of variance atau ANOVA adalah uji statistik yang digunakan untuk melihat adanya perbedaan diantara beberapa kelompok yang diberikan perlakuan. ANOVA *two way* adalah uji yang membandingkan perbedaan rata-rata dua variabel independen. hasil uji ini adalah nilai F hitung, jika hasil nilai F hitung $> F$ tabel maka dapat disimpulkan bahwa hipotesis yang diterima H_1 dan yang ditolak H_0 atau yang berarti ada perbedaan bermakna rerata pada semua kelompok (Hidayat, 2017b).

c. Data berdistribusi tidak normal: Uji *Kruskal Wallis*

Uji *kruskal wallis* memiliki fungsi yang sama dengan uji ANOVA namun pada uji ini digunakan untuk melihat perbedaan pada beberapa kelompok dengan data yang berdistribusi tidak normal. Dasar untuk pengambilan kesimpulan pada uji ini adalah nilai P Value yang ditunjukkan oleh nilai Asymp. Sig. Jika nilai P

Value < batas kritis penelitian maka keputusan hipotesis adalah menerima H1 dan menolak H0 atau yang berarti ada pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat (Hidayat, 2017a).

- d. Uji LSD (*Least Significant Deference*) jika pada uji ANOVA terdapat Perbedaan

Uji *Least Significant Deference* atau uji LSD adalah uji lanjutan dari uji ANOVA, uji ini dilakukan apabila pada uji ANOVA hasil menunjukkan terdapat perbedaan diantara kelompok uji. Sebagai uji lanjutan uji ini dapat membantu mengetahui perlakuan yang berbeda secara signifikan. Namun jika dari uji ANOVA menyatakan tidak adanya perbedaan diantara dua kelompok uji maka uji lanjutan ini tidak perlu dilakukan (Diwangkari, Rahmawati and Safitri, 2018).

- e. Uji Dunn

Uji Dunn adalah salah satu jenis uji lanjutan nonparametrik yang digunakan setelah uji *Kruskal-Wallis*. Uji Dunn melakukan perbandingan berganda atas rata-rata peringkat skor. Uji ini menggunakan nilai kritis sebagai pembanding untuk tiap pasangan rata-rata peringkat skor. Namun jika dari uji *Kruskal-Wallis* menyatakan tidak adanya perbedaan diantara dua kelompok uji maka uji lanjutan ini tidak perlu dilakukan (Ammar Alkautsar *et al.*, 2022).

G. Etika Penelitian

Adapun beberapa etika penelitian yang bertujuan menjaga integritas penelitian yaitu sebagai berikut:

1. *Review by Ethics Committe* (Tinjauan oleh Komite Etik): Semua penelitian kesehatan harus ditinjau dan disetujui oleh komite etik yang independen

sebelum dimulai. Komite ini bertugas memastikan bahwa penelitian memenuhi standar etika yang berlaku.

2. *Non-Maleficence* (Tidak Merugikan): Penelitian harus dirancang dan dilakukan sedemikian rupa untuk meminimalkan risiko dan bahaya, sehingga peneliti tidak merugikan pihak manapun.
3. *Beneficence* (Berbuat Baik): Penelitian harus dilakukan untuk meningkatkan kesejahteraan masyarakat secara keseluruhan dan peneliti harus mempertimbangkan manfaat potensial dari penelitian tersebut.
4. *Justice* (Keadilan): Manfaat penelitian harus dibagikan secara merata dan adil kepada semua pihak yang terlibat.