

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat *Quasi experimental* dengan menggunakan rancangan *Posttest Only Control Group Design*. Penelitian eksperimen merupakan salah satu metode dalam pendekatan kuantitatif. Dalam desain ini, subjek dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok eksperimen yang diberikan perlakuan (X) dan kelompok kontrol yang tidak menerima perlakuan. Kedua kelompok kemudian diukur hasil akhirnya (O2) untuk membandingkan efek dari perlakuan yang diberikan (Hardani dkk., 2020).

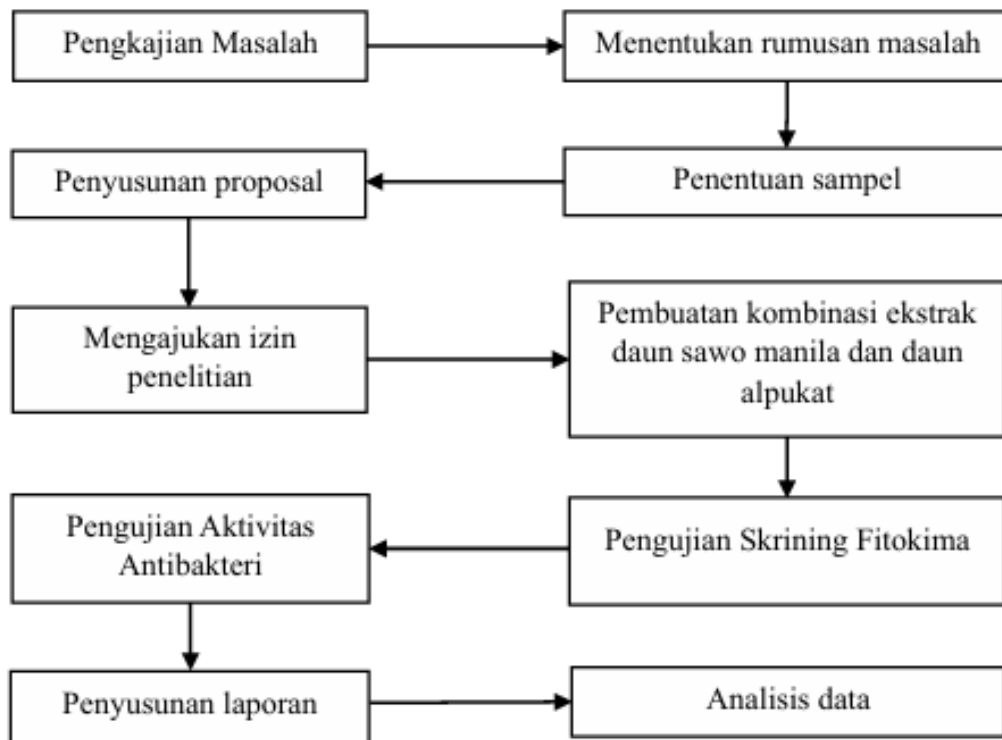
Tabel 2
Rancangan Posttest Only Control Group Design

	Kelompok	Variabel Terikat	Posttest
R1	Eksperimen	X	O2
R2	Kontrol	-	O2

Keterangan :

1. R1 (*Random 1*) : Kelompok perlakuan yang menerima kombinasi ekstrak daun sawo manila dan daun alpukat dengan variasi konsentrasi 15%, 30%, 45%, dan 60%
2. R2 (*Random 2*) : Kelompok kontrol tanpa pemberian perlakuan
3. X (*Exposure*) : Perlakuan yang diberikan dalam penelitian
4. O2 (Observasi) : Hasil pengamatan berupa ukuran diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

B. Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1) Tempat Penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa yang beralamat di Jalan Terompong, Kelod, Kecamatan Denpasar Timur, Kota Denpasar, Bali. Penelitian yang dilakukan di Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa mulai dari preparasi sampel hingga uji aktivitas antibakteri.

2) Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari September 2024 - Mei 2025.

D. Sampel Penelitian

1) Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini, merupakan kombinasi ekstrak daun sawo manila dan daun alpukat. Sampel tumbuhan sawo manila dan tumbuhan alpukat didapatkan di daerah Gianyar, Kecamatan Tampaksiring.

a) Unit Analisis

Unit analisa dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan oleh kombinasi ekstrak daun pada konsentrasi yang berbeda pada daun sawo manila dan daun alpukat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi yakni 15%, 30%, 45%, dan 60%.

b) Besar Sampel

Untuk pengulangan tiap perlakuan, penulis melakukan pengulangan lima kali pengulangan yang menghasilkan total 20 data. Menurut buku "Rancangan Percobaan : Teori dan Aplikasi" oleh (Hanafiah, 2022), Jumlah minimum replikasi untuk eksperimen laboratorium adalah tiga kali replikasi, sehingga replikasi yang dilakukan dalam penelitian ini memenuhi syarat.

c) Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan teknik *probability sampling* dengan *metode simple random sampling*. Adapun kriteria - kriteria dalam penelitian ini, yakni :

1. Kriteria Inklusi : Daun sawo manila dan daun alpukat yang berbentuk pipih, tidak menggulung, dipetik daun ke 5 dari pucuk yang dipetik pada siang hari pukul 11.00 WITA
2. Kriteria Eksklusi : Daun sawo manila dan daun alpukat yang tidak utuh seperti daun yang robek dan berlubang.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1) Jenis Data Yang Dikumpulkan

a. Data primer

Data primer didapatkan dengan mengidentifikasi fitokimia dan mengukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. pada berbagai konsentrasi kombinasi ekstrak daun sawo manila dan daun alpukat yang diukur di laboratorium.

b. Data sekunder

Data sekunder yang diperoleh dari jurnal, artikel, dan buku yang diakses melalui situs web pencarian di internet.

4) Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data dilakukan dengan mengukur zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi kombinasi ekstrak daun sawo manila dan daun alpukat di laboratorium, selanjutnya dilakukan pengukuran menggunakan jangka sorong.

5) Instrumen Pengumpulan Data

Instrumen - instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

a. Alat Tulis

b. Kamera

c. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri

6) Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang akan digunakan diantaranya pisau, blender, wadah, batang pengaduk, *vacum rotary evaporator*, *water bath*, erlenmeyer, pipet ukur, ball pipet,

pipet tetes, tabung reaksi, neraca analitik, cawan petri, *hot plate*, *magnetic stirrer*, autoclave, oven, desintometer mcfarland, inkubator, bunsen, jangka sorong, rak tabung, *laminator air flow*

b. Bahan

Bahan yang digunakan diantaranya daun sawo manila, daun alpukat, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, cakram antibiotik gentamicin, etanol 95%, kertas saring, asam klorida 2N, reagen dragendroff, reagen wagner, serbuk magnesium, HCl pekat, kloroform, asam sulfat pekat, asam asetat anhidrat, FeCl₃ 5%, pereaksi besi (III) klorida, bubuk MHA, media Nutrient Agar, aquadest, stick pH, ose steril, NaCl 0,9%, cakram disk kosong.

7) Prosedur Kerja

a. Preparasi Sampel

1. Dipetik daun sawo manila dan daun alpukat masing – masing sebanyak 2 kg
2. Dicuci bersih daun sawo manila dan daun alpukat menggunakan air mengalir kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50⁰C selama 24 jam
3. Dihaluskan menggunakan blender hingga membentuk serbuk (Khatulistiwa, Permana & Puspawati, 2020)

b. Pembuatan Ekstrak

1. Dimasukkan serbuk yang telah diblender ke dalam wadah masing masing 250 gram
2. Direndam ke dalam etanol 96% lalu ditutup dengan rapat
3. Dibiarkan selama 72 jam sambil diaduk sesekali
4. Disaring maserat tersebut menggunakan kertas saring setelah perendaman selama 3 hari

5. Difiltrat hasil yang sudah didapatkan kemudian diuapkan menggunakan *Vacum Rotary Evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat dengan konsentrasi 100% (Khafipah, Saula & Kasasiah, 2022).

c. Skrining Fitokimia

1. Uji Alkaloid

- a) Disiapkan 2 tabung reaksi lalu masukkan 3 ml ekstrak
- b) Pada tabung pertama, ditambahkan 5 tetes reagen Dragendroff, sedangkan pada tabung kedua, ditambahkan 2-3 tetes reagen Wagner
- c) Ditandainya hasil positif dengan terbentuk endapan berwarna coklat kemerahan pada uji Wagner, dan terbentuk endapan merah atau jingga pada uji Dragendorff (Khafid dkk., 2023).

2. Uji Flavonoid

- a) Dimasukkan 1 mL ekstrak ke dalam tabung reaksi
- b) Ditambahkan 0,5 g serbuk magnesium dan 10 tetes HCl pekat
- c) Ditandainya hasil positif dengan perubahan warna menjadi jingga, merah muda, atau merah (Khafipah, Saula & Kasasiah, 2022).

3. Uji Terpenoid

- a) Dimasukkan 3 ml ekstrak ke dalam tabung reaksi
- b) Ditambahkan 1 ml kloroform dan 2 ml asam sulfat pekat
- c) Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna coklat kemerahan (Indarto, 2015).

4. Uji Steroid

- a) Prosesnya dimulai dengan memasukkan 2 gram sampel, lalu menambahkan 20 mL etanol yang mengandung 2 mL asam sulfat. Setelah itu, campuran dididihkan dan disaring. Ditambahkan 2 mL asam asetat anhidrat
- b) Ditandainya hasil positif dengan perubahan warna menjadi hijau, biru atau ungu (Indarto, 2015).

5. Uji Fenol

- a) Ditambahkan 1 ml ekstrak ke dalam tabung
- b) Dimasukkan 2-3 tetes FeCl_3 5%
- c) Ditandainya hasil positif dengan terjadinya perubahan warna menjadi biru kehitaman (Mailuhu, Runtuwene & Koleangan, 2017).

6. Uji Tanin

- a) Ditambahkan 1 mL ekstrak ke dalam tabung reaksi
- b) Ditambahkan 1 tetes pereaksi besi (III) klorida.
- c) Ditandainya hasil positif jika menghasilkan warna biru atau hijau kehitaman (Sulistyarini, Sari & Wicaksono, 2020).

7. Uji Saponin

- a) Dimasukkan sampel 1 ml ke dalam air panas sebanyak 10 ml dan teteskan asam klorida 2N sebanyak 1 tetes
- b) Dikocok larutan tersebut selama 10 detik
- c) Busa yang terbentuk dengan tinggi antara 1 hingga 10 sentimeter dan tetap stabil selama kurang lebih sepuluh menit menunjukkan adanya senyawa saponin. Setelah itu, dikocok selama sekitar 10 detik (Cahyaningsih, Yuda & Santoso, 2019).

d. Peremajaan Bakteri Uji

1. Diambil bakteri uji dengan ose
2. Digoreskan bakteri pada permukaan *Nutrient Agar*; lalu inkubasi pada inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Dima, Fatimawali & Lolo, 2016).

e. Pembuatan Kombinasi Ekstrak dengan Konsentrasi 15%, 30%, 45%, dan 60%

1. Dibuat konsentrasi ekstrak etanol 15%, 30%, 45%, dan 60% dengan menggunakan rumus b/v (Dima, Fatimawali & Lolo, 2016).
2. Dengan menggunakan rumus di atas, kita bisa mencari massa ekstrak etanol kombinasi daun sawo manila dan daun alpukat yang akan digunakan dalam pembuatan konsentrasi ekstrak 15%, 30%, 45%, dan 60% yang dibuat dalam 1 ml massa campuran yang disajikan dalam tabel berikut :

Tabel 3
Pembuatan Variasi Kombinasi Ekstrak

No	Konsentrasi Ekstrak %	B ₁ (gram) Ekstrak	B ₂ (ml) Etanol 96%
1	15%	0,15 gram	0,85 ml
2	30%	0,3 gram	0,7 ml
3	45%	0,45 gram	0,55 ml
4	60%	0,6 gram	0,4 ml

f. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

1. Berdasarkan etiket pembuatan media MHA, 38 gram bubuk media dilarutkan ke dalam 1 liter aquades, dengan begitu 19 gram bubuk media MHA diperlukan untuk membuat 500 ml media. Ditimbang bubuk media dengan neraca analitik, kemudian ditambahkan aquadest ke dalam erlenmeyer sebanyak 500 ml.
2. Media dipanaskan menggunakan hotplate dan diaduk dengan magnetic stirrer.
3. Diukur pH media dengan stick pH (pH ideal pada suhu ruang adalah 7,2 - 7,4).

4. Disterilisasi media menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, media dikeluarkan dari autoclave dan biarkan hingga beberapa menit sampai suhunya menurun menjadi sekitar 40-45°C lalu tuangkan media ke dalam cawan petri sebanyak sekitar 25 ml, kemudian tunggu hingga media mengeras.

g. Pembuatan Larutan McFarland

1. Dicampurkan larutan H_2SO_4 0,36 N sebanyak 99,5 ml dengan larutan $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,175% sebanyak 0,5 ml dalam erlenmeyer
2. Larutan dikocok sampai keruh. Tingkat kekeruhan ini kemudian digunakan sebagai standar untuk suspensi bakteri yang akan diuji (Dima, Fatimawati & Lolo, 2016).

h. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

1. Disiapkan larutan standar McFarland 0,5
2. Diambil bakteri uji dengan ose steril kemudian disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 ml larutan natrium klorida 0,9 persen hingga memiliki kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan McFarland, yaitu 0,08 hingga 0,1. Jika nilai absorbansi suspensi bakteri lebih tinggi, larutan natrium klorida 0,9 persen diencerkan lagi hingga nilai absorbansi mencapai level yang sama dengan larutan standar McFarland 0,5, yaitu 0,08 hingga 0,1 (Khafipah, Saula & Kasasiah, 2022).

i. Uji daya hambat antibakteri

Prosedur uji daya hambat antibakteri pada penelitian ini di adaptasi dari (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) yaitu sebagai berikut :

1. Dichelupkan kapas steril ke dalam suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* 0,5 Mac Farland selama 15 menit setelah menyiapkan suspensi bakteri dan tunggu hingga kapas tersebut sepenuhnya terlapisi oleh suspensi bakteri.
2. Diinokulasi suspensi bakteri dengan cara: menggoreskan kapas pada permukaan media MHA secara merata. Putar media dengan sudut 60°, kemudian kapas digoreskan kembali pada permukaan media. Langkah ini diulangi sebanyak dua kali guna memastikan distribusi suspensi merata di seluruh permukaan. Sebagai tahap akhir, bagian tepi media agar-agar juga diusap untuk meratakan sebaran suspensi.
3. Dibiarkan tutup terbuka selama 3 - 5 menit untuk memungkinkan penyerapan kelembaban berlebih sebelum peletakan cakram disk.
4. Ditempelkan cakram-disk yang telah direndam oleh kombinasi ekstrak etanol daun sawo manila dan daun alpukat dengan konsentrasi masing-masing 15%, 30%, 45%, dan 60% pada permukaan media MHA dengan jarak antar cakram minimal 24 mm. Tekan secara perlahan agar cakram menempel dengan baik pada permukaan media, untuk kontrol menggunakan cakram disk *gentamicin* yang ditempatkan pada media MHA yang terpisah dari kelompok eksperimen.
5. Diinkubasi pada inkubator dengan suhu $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 18 - 24 jam.
6. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan menggunakan jangka sorong, dengan cara mengukur dari satu sisi tepi zona hambat ke sisi tepi lainnya.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1) Pengolahan Data

Data yang diperoleh ditampilkan dengan format tabel dan deskripsi teks, lalu dianalisis secara statistik dengan komputer.

2) Analisis Data

- a) Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk menguji normalitas data, yaitu untuk menentukan apakah data tersebut mengikuti distribusi normal atau tidak.
- b) Data yang dianalisis memiliki distribusi tidak normal, selanjutnya dilakukan uji *Kruskal Wallis* yaitu uji non-parametrik yang didasarkan pada peringkat yang diterapkan untuk menganalisis perbedaan statistik yang signifikan di antara beberapa kelompok variabel independen terhadap variabel dependen.

G. Etika Penelitian

1) Beneficence

Prinsip ini bertujuan untuk memberikan manfaat sekaligus meminimalkan kemungkinan merugikan orang lain

2) Non-maleficence

Prinsip ini bertujuan untuk memastikan bahwa subjek tidak diperlakukan sebagai objek semata dan dilindungi dari kemungkinan penyalahgunaan (Masturoh & Tamesvari, 2018).