

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

True experimental dengan rancangan *post-test only control group design* merupakan jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini. Dalam penelitian ini kelompok perlakuan dan kelompok kontrol merupakan subjek yang dibagi secara acak menjadi dua bagian kelompok. Kelompok perlakuan dibagi menjadi empat berdasarkan variasi konsentrasi yang dihasilkan, sedangkan kelompok kontrol berjumlah satu. Kelompok eksperimen dan kontrol diambil secara random, sehingga kelompok ini dianggap sama sebelum intervensi dilakukan (Anggreni, 2022).

	Perlakuan	Posttest
R1	X	O1
R2		O2

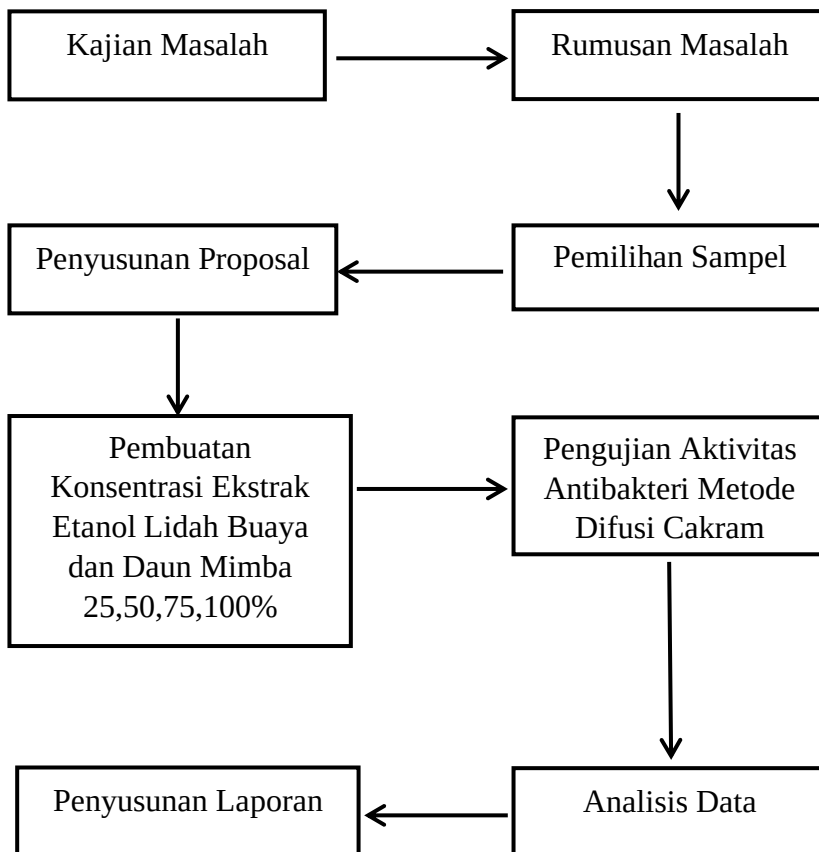
Gambar 5 Rancangan Desain Penelitian

Keterangan:

- R1 : Kelompok kontrol
- R2 : Kelompok eksperimen/perlakuan
- X : Perlakuan (*Treatment*)
- O1 : Pengaruh diberikannya perlakuan
- O2 : Pengaruh tidak diberikannya perlakuan

B. Alur Penelitian

Alur penelitian ditampilkan pada Gambar 3 berikut.



Gambar 6 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa di Jalan Terompong, Sumerta Kelod, Kecamatan Denpasar Timur, Kota Denpasar, Bali.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2024 – Mei 2025.

D. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian

Ekstrak kombinasi lidah buaya dan daun mimba merupakan sampel yang digunakan dalam penelitian ini. Lidah buaya dan daun mimba yang digunakan ditentukan berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah dibuat peneliti, yakni daun yang diambil dari perkebunan petani di desa sulahan kecamatan susut kabupaten bangli, lidah buaya yang diambil yaitu mulai dari kelopak ketiga dan daun yang diambil mulai dari pucuk ketiga sampai ketujuh, serta daun yang tidak berlubang untuk daun mimba.

a. Unit analisis

Zona hambat yang terbentuk di sekeliling cakram ekstrak pada medium agar adalah subjek pengamatan utama dan unit analisis dalam penelitian ini.

b. Besar sampel

Besar sampel merupakan jumlah unit analisis yang digunakan untuk merepresentasikan akurasi data penelitian. Ekstrak etanol lidah buaya dan daun mimba 100% yang dihasilkan dari proses ekstraksi berfungsi sebagai sampel stok utama. Empat variasi konsentrasi (25%, 50%, 75%, dan 100%) dari kombinasi ekstrak tersebut kemudian disiapkan untuk pengujian. Konsentrasi yang lebih rendah diperoleh dengan mengencerkan sampel stok 100% dengan pelarut etanol 96%. Jumlah pengulangan untuk setiap variasi konsentrasi dihitung menggunakan rumus berikut (Hanafiah, 2022):

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

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

r = jumlah replikasi perlakuan

Perhitungan pengulangan:

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

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

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

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 15 + 3$$

$$r \geq \frac{18}{3} = 6$$

Untuk mendapatkan hasil eksperimen yang akurat, setiap kelompok perlakuan menggunakan minimal 6 replikasi. Dengan demikian, total 24 sampel digunakan dalam penelitian ini. Jumlah pengulangan setiap perlakuan disesuaikan dengan tingkat ketelitian yang diinginkan. Semakin banyak pengulangan, semakin tinggi tingkat ketelitiannya.

c. Kriteria sampel

- 1) Kriteria inklusi: Lidah buaya dan daun mimba yang dipetik di desa sulahan, kecamatan susut, kabupaten bangli, lidah buaya yang diambil dimulai dari kelopak ketiga, lidah buaya yang digunakan adalah bagian kulitnya saja dan diambil kurang dari 6 jam, daun mimba yang diambil dimulai dari pucuk ketiga sampai ketujuh, lidah buaya dan daun mimba yang diambil pada pagi hari.
- 2) Kriteria Eksklusi: Lidah buaya dan daun mimba yang diambil lebih dari 12 jam, daun mimba yang diambil lebih dari pucuk ketujuh, lidah buaya digunakan semua bagian daunnya (gel dan kulit), lidah buaya dan daun mimba yang dipetik pada sore hari.

d. Alat, bahan, dan cara kerja

1) Alat dan bahan

a) Alat

Ose Bulat, Tabung vial, Mc farland densitometer (*biosan*), rak tabung reaksi, erlemeyer 100 ml (*pyrex*), corong, neraca analitik (*RADWAG*), api bunsen, spatula, autoclave (*HIRAYAMA*), tabung *ependorf*, batang pengaduk, jangka sorong, cawan petri, mikropipet 20-200 µl dan 100-1000 µl (*SOCOREX*), pinset, tabung reaksi, gelas ukur, gelas kimia 1000 ml (*IWAKI*), refrigerator, magnetic stirrer, oven (*MEMMERT UN 55*), inkubator (*MEMMERT UN 55*), Air Flow (*Laminar*), pisau, alat saring (*BUCHI*), *hotplate (thermo scientific)*, dan evaporator (*BUCHI*).

b) Bahan

Lidah buaya, daun mimba, cakram antibiotik kloramfenikol 30µg, media pertumbuhan bakteri (*MHA*), natrium klorida fisiologis 0,9%, aquadest steril 1000 ml, lidi kapas steril, etanol 96%, bakteri *Staphylococcus aureus*, *yellow tip* (6 buah), kapas berlemak, *blank disk* 30 buah, alkohol 70%, standar *Mac Farland* 0,5%, *blue tip* (1 buah), dan aluminium foil.

2) Prosedur kerja

Tahap Pre Analitik

a) Prosedur pembuatan ekstrak lidah buaya dan daun mimba (Handayany, 2016):

(1) Metode ekstraksi digunakan untuk menyiapkan sampel dan mengekstrak daun mimba dan lidah buaya.

(2) Memetik lidah buaya dan daun mimba masing-masing sebanyak 1 kg yang sesuai dengan kriteria penelitian

- (3) Sortasi basah dilakukan dengan memilih lidah buaya dan daun mimba berdasarkan kriteria yang sudah ditetapkan.
 - (4) Lidah buaya dan daun mimba dicuci bersih menggunakan air mengalir.
 - (5) Selanjutnya dilakukan proses pemotongan agar memudahkan proses pengeringan, untuk lidah buaya dilakukan pemisahan antara kulit dan bagian dalam (daging lidah buaya).
 - (6) Selama 1 x 24 jam, pengeringan dilakukan dalam oven pada suhu 50 °C.
 - (7) Lidah buaya dan daun mimba yang sudah kering dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk.
 - (8) Timbang masing-masing lidah buaya dan daun mimba sebanyak 150 g yang dilarutkan dalam 1.500 ml etanol 96% hingga semua serbuk terendam.
 - (9) Tutup rapat botol hitam tersebut dan rendam selama 3 hari dan aduk merata rendaman setiap 8 jam setiap hari menggunakan *magnetic stirrer*.
 - (10) Pastikan botol sampel disimpan pada tempat yang jauh dari jangkauan cahaya matahari.
 - (11) Kertas saring digunakan untuk menyaring hasil maserasi dan filtrat hasil dari rendaman dievaporasi pada suhu 60°C melalui evaporator rotasi.
 - (12) Simpan hasil ekstraksi pada pot sampel tertutup untuk dilakukan tahap uji.
- b) Membuat variasi konsentrasi ekstrak lidah buaya dan daun mimba sebesar 25, 50, 75, dan 100%.
- (1) Timbang dan encerkan ekstrak kombinasi lidah buaya dan daun mimba dengan konsentrasi 100% dengan pelarut etanol 96% untuk menghasilkan masing-
 - (2) Untuk mengukur perbedaan konsentrasi ekstrak lidah buaya dan daun mimba, gunakan rumus berikut:

$$\% = \frac{b}{v} \times 100$$

Keterangan:

% : variasi konsentrasi (%) ekstrak kombinasi lidah buaya dan daun mimba

b : massa ekstrak kombinasi lidah buaya dan daun mimba

v : volume pelarut

(3) Membuat volume variasi konsentrasi uji:

Tabel 3 Variasi Konsentrasi Komposisi Bahan		
Konsentrasi (%)	Ekstrak Kombinasi Lidah Buaya dan Daun Mimba (gram)	Etanol 96% (ml)
25	0,25	1
50	0,50	1
75	0,75	1
100	1	1

(4) Homogenkan masing-masing konsentrasi

c) Prosedur pembuatan media (MHA) (Nurhayati, Yahdiyani, & Hidayatulloh, 2020):

- (1) Gunakan neraca analitik untuk menimbang 5,7 g serbuk MHA.
- (2) Masukkan bubuk tersebut kedalam erlenmeyer dan tambahkan 150 ml aquades.
- (3) Larutan media dipanaskan dengan *hot plate*.
- (4) Untuk memastikan sterilisasi, autoklaf digunakan untuk membersihkan larutan media selama 25 menit pada suhu 121°C. Setelah selesai, media didiamkan hingga mencapai suhu 40°C. Selanjutnya, sekitar 15 ml larutan media dituangkan ke dalam cawan petri steril, dan media MHA yang telah disterilkan disimpan pada lemari pendingin hingga mengeras dan membentuk media agar padat.

d) Inokulasi Bakteri (Peremajaan) (Kherid, 2020)

- (1) Disiapkan media biakan atau pertumbuhan bakteri (media NA)
- (2) Diambil 1 ose koloni bakteri murni diinokulasikan pada media NA.
- (3) Lalu diinkubasi di suhu 37° C dalm waktu 18 sampai 24 jam.

e) Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* (Nurhayati, Yahdiyani and Hidayatulloh, 2020):

- (1) Koloni bakteri murni diambil dengan ose dan dicampur dalam tabung berisi NaCl 0,9%. Campuran ini kemudian dihomogenkan hingga mencapai konsentrasi 0,5 McFarland, yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, dan diukur menggunakan McFarland densitometer.

Tahap Analitik pemeriksaan uji daya hambat antibakteri (Suyasa dkk., 2022):

- (1) Variasi ekstrak kombinasi lidah buaya dan daun mimba (25%, 50%, 75%, dan 100%) disiapkan, bersama dengan kloramfenikol sebagai kontrol positif dan pelarut etanol 96% sebagai kontrol negatif.
- (2) Kemudian, cakram disk direndam dalam 50 µl larutan ekstrak atau 50 µl etanol 96% untuk kontrol negatif.
- (3) Selanjutnya, lidi kapas steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri dan digoreskan secara merata ke seluruh permukaan media MHA, lalu didiamkan selama 15 menit.
- (4) Terakhir, cakram disk yang sudah jenuh diletakkan secara aseptis di permukaan media MHA, dengan jarak minimal 15 mm antar cakram. Cakram disk berisi antibiotik kloramfenikol juga ditempatkan sebagai kontrol positif.
- (5) Setelah diinokulasi, media MHA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- (6) Selanjutnya, zona hambat atau area bening di sekitar cakram disk diamati.

- (7) Untuk menentukan efektivitas ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri, lakukan pengukuran pada diameter zona hambat.

Tahap Pasca Analitik

- a) Pencatatan dan Pelaporan Hasil: Pertama, semua pemeriksaan dicatat dan didokumentasikan. Setelah itu, hasilnya diinterpretasikan untuk mendapatkan kesimpulan. Terakhir, pelaporan hasil pun dilakukan.

- b) Penanganan Limbah Medis

Penanganan limbah medis dilakukan sesuai kategorinya:

- (1) Tempat sampah kantong kuning diperuntukkan bagi limbah medis
- (2) Kantong hitam untuk limbah non-medis.
- (3) Limbah benda tajam dibuang ke tempat sampah jerigen khusus.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

- a. Data primer

Data primer merupakan informasi yang dikumpulkan secara langsung selama penelitian. Dalam studi ini, data primer tersebut adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

- b. Data sekunder

Data sekunder adalah informasi yang didapat dari sumber-sumber yang sudah ada, seperti literatur, buku, jurnal, artikel, penelitian sejenis yang terkait atau basis data yang sudah ada.

2. Teknik pengumpulan data

Data yang dikumpulkan berupa data zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* yang diukur dengan menggunakan jangka sorong pada setiap kombinasi ekstrak yang telah dibuat.

3. Instrumen pengumpulan data

- a. Alat tulis untuk mencatat data
- b. Kamera untuk dokumentasi
- c. Alat pengambilan sampel dan pengujian
- d. APD (Alat Pelindung Diri), digunakan untuk melindungi diri dari potensi risiko saat bekerja.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang terkumpul akan diolah dan disajikan dalam tabel serta deskripsi teks. Kemudian, data tersebut akan dianalisis menggunakan perangkat lunak komputer.

2. Analisis data

Data yang terkumpul akan dianalisis untuk menguji hipotesis.:

- a. Analisis yang pertama dilakukan adalah *Uji Shapiro-Wilk*, untuk menentukan normalitas distribusi data yaitu apakah data penelitian berdistribusi normal atau tidak normal.
- b. Untuk mengetahui perbedaan zona hambat yang dihasilkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* pada ekstrak kombinasi lidah buaya dan daun mimba

untuk data yang berdistribusi normal dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%, akan digunakan uji statistik *One-Way ANOVA*.

- c. Selanjutnya, uji statistik LSD (Least Significant Difference) akan diterapkan untuk mengidentifikasi perbedaan signifikan pada zona hambat di setiap konsentrasi yang efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.