

BAB IV
METODELOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menerapkan metode *true experimental* dengan desain *Posttest Only Control Group Design*. Dalam desain ini, sampel penelitian dibagi secara acak (R) menjadi dua kelompok, yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Kelompok eksperimen diberi perlakuan tertentu (X), sementara kelompok kontrol tidak menerima perlakuan. Setelah intervensi, kedua kelompok dievaluasi berdasarkan hasil akhir mereka (O2) untuk menilai efek dari perlakuan yang diberikan. Rancangan penelitian ini ditunjukkan pada tabel 2.

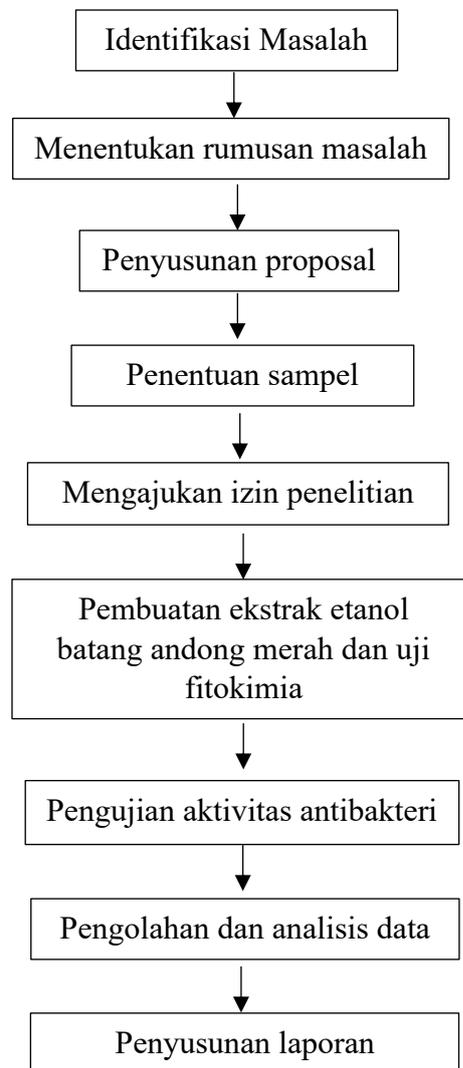
Tabel 2
Rancangan Posttest Only Control Group Design

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

Keterangan:

1. R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen, dalam penelitian ini merupakan sejumlah konsentrasi dari ekstrak etanol Batang Andong Merah
2. R2 (Random 2): Kelompok kontrol
3. X (Exposure): Perlakuan ekstrak etanol batang andong merah
4. O2 (Observasi): Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

B. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat pengambilan sampel berlokasi di Kecamatan Marga, Kabupaten Tabanan, Provinsi Bali. Pemeriksaan Laboratorium dilaksanakan di Laboratorium Pertanian Universitas Warmadewa berlokasi di Jl. Terompong, Sumerta Kelod, Denpasar Timur., Kota Denpasar, Bali 80239, Indonesia.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari Maret 2025 sampai dengan April 2025.

D. Sampel Penelitian

1. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini merujuk pada diameter zonaambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada setiap konsentrasi ekstrak etanol batang andong merah, dengan konsentrasi 60%, 70%, 80% dan 90%.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah batang tumbuhan andong merah yang tumbuh pada daerah Kecamatan Marga Kabupaten Tabanan.

3. Jumlah dan besar sampel

a. Besar sampel

Besar sampel mengacu pada jumlah unit analisis yang dimanfaatkan dalam suatu penelitian untuk mendapatkan data yang representatif dan valid. Dalam proses ekstraksi, diperoleh ekstrak etanol batang andong merah dengan konsentrasi 100%, yang digunakan sebagai sampel stok. Pada penelitian ini ekstrak dari batang andong merah dibuat dengan 4 konsentrasi yaitu 60%, 70%, 80% dan 90% yang dibuat dengan mengencerkan stok sampel menggunakan pelarut etanol 96% karena etanol 96% lebih efektif dalam mengekstraksi senyawa yang terkandung di dalam sel tanaman (Maslakhah dkk., 2019) sehingga batang andong merah yang dibutuhkan adalah 2,5 kg.

Dalam percobaan laboratorium, pengulangan uji atau percobaan diperlukan untuk memastikan hasil yang lebih akurat. Tujuan dari pengulangan ini adalah

meningkatkan ketelitian dalam penelitian. Jumlah ulangan yang dibutuhkan dalam suatu percobaan ditetapkan berdasarkan rumus *Federer* sebagai berikut:

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

keterangan

t = jumlah perlakuan

r = jumlah pengulangan

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

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

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 15 + 4$$

$$r \geq 19 \div 4$$

$$r \geq 4,75$$

Berdasarkan persamaan *Federer* diatas bisa dijelaskan bahwa dalam penelitian ini memerlukan pengulangan sejumlah 5 kali, Dalam perhitungan digunakan jumlah perlakuan (t) untuk memperoleh nilai jumlah ulangan (r) dengan hasil $\geq 4,75$. Berdasarkan hasil tersebut, jumlah ulangan pada uji daya hambat ditetapkan sebanyak 5 kali, sehingga diperoleh total 20 data dari kelompok perlakuan dan 5 data dari kelompok kontrol.

4. Kriteria sampel

Adapun kriteria inklusi dan eksklusi pada penelitian ini adalah :

1. Kriteria Inklusi : Batang andong merah berwarna coklat, menggunakan batang tumbuhan andong merah yang berumur sekitar 7 hingga 12 bulan dan panjang batang yang diambil berkisar 10-100 cm.
2. Kriteria Eksklusi : Batang andong merah yang busuk dan berlubang.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data Primer

Data primer diperoleh melalui penelitian laboratorium yang mengukur diameter zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol dari batang andong merah.

b. Data sekunder

Data sekunder didapat dari publikasi jurnal, artikel, dan buku melalui situs web pencarian di internet.

2. Teknik pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan metode pengumpulan data kuantitatif yang diperoleh melalui pengukuran dengan menggunakan instrumen yang sesuai dalam eksperimen laboratorium. Pengujian daya hambat ekstrak etanol dari batang andong merah dilakukan dengan metode difusi cakram Kirby-Bauer. Pengukuran diameter zona hambat untuk setiap variasi konsentrasi dilakukan menggunakan jangka sorong, dan hasil pengukuran tersebut dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

3. Instrumen pengumpulan data

- a. Kamera digunakan sebagai alat dokumentasi.
- b. Alat pelindung diri (APD), digunakan untuk melindungi diri dari resiko kerja.
- c. Alat tulis digunakan untuk mencatat data.

4. Alat dan bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pisau, blender, wadah, batang pengaduk, vacuum rotary evaporator, erlenmeyer, pipet ukur, pipet tetes, tabung reaksi, neraca analitik, cawan petri, hot plate, magnetic stirrer, autoclave, oven, desintometer mcfarland, inkubator, jangka sorong, rak tabung, lemari pendingin, laminar air flow.

b. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu batang andong merah, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, cakram antibiotik kloramefenikol, etanol 95%, kertas saring, asam korida 2N, reagen dragendroff, reagen mayer wagner, serbuk magnesium, HCl pekat, H₂SO₂ pekat, FeCl₃ 1%, bubuk MHA, media Nutrient Agar, aquadest, stick pH, H₂SO₄ 0,36 N, BaCl₂.2H₂O 1,175%, ose steril, NaCl 0,9%, cakram disk.

5. Prosedur kerja

a. Persiapan sampel

Tanaman andong merah yang digunakan dalam penelitian ini mencakup bagian batang, yang dipilih berdasarkan kriteria sampel yang telah ditetapkan sebelumnya. Untuk memperoleh ekstrak dalam jumlah yang memadai, diperlukan sampel sebanyak 2,5 kg. Batang andong merah yang telah diperoleh dicuci dengan

cara merendamnya dalam air bersih, kemudian ditiriskan. Selanjutnya, batang dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama dua hari. Setelah bahan benar-benar kering kemudian dihancurkan hingga diperoleh simplisia dalam bentuk serbuk halus (Khatulistiwa, Permana dan Puspawati., 2020).

b. Pembuatan ekstrak etanol batang andong merah dengan metode maserasi.

Serbuk yang telah diblender dimasukkan ke dalam wadah, ditimbang sebanyak 450 gram kemudian direndam dalam etanol 96% sebanyak 2.250 liter hingga simplisia terendam dan ditutup dengan aluminium foil. Campuran tersebut dibiarkan selama 3×24 jam sambil diaduk sesekali. Setelah perendaman selama 3 hari, larutan tersebut kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan Vacuum Rotary Evaporator hingga menghasilkan ekstrak pekat dengan konsentrasi 100% (Qamariah, Handayani dan Friskila., 2020).

c. Skrining fitokimia.

1) Uji alkaloid

Sebanyak 3 ml sampel dicampurkan dengan 3 tetes asam klorida 2 N, kemudian larutan tersebut dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Pada tabung pertama, ditambahkan 1 ml reagen Dragendorff, sedangkan pada tabung kedua ditambahkan 1 ml reagen Mayer Wagner. Tanda positif pada uji ini ditunjukkan oleh terbentuknya endapan berwarna jingga kemerahan pada tabung pertama dan endapan berwarna putih pada tabung kedua. (Khafid dkk., 2023).

2) Uji flavonoid

Sebanyak 1 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,5 g serbuk magnesium dan 10 tetes HCl pekat. Jika sampel tersebut

positif mengandung flavonoid, larutan akan mengalami perubahan warna menjadi jingga, merah muda, atau merah (Khafipah, Saula dan Kasasiah., 2022).

3) Uji tanin

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambahkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 tetes pereaksi besi (III) klorida. Jika terbentuk warna biru atau hijau kehitaman, maka sampel dinyatakan positif (Sulistyarini, Sari dan Wicaksono., 2020).

4) Uji Fenol

Sebanyak 1 ml ekstrak ditambahkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diteteskan 2–3 tetes larutan FeCl_3 5%. Hasil positif ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi biru kehitaman (Mailuhu, Runtuwene dan Koleangan., 2017)

5) Uji saponin

Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam 10 ml air panas, kemudian ditambahkan 1 tetes asam klorida 2N dan dikocok kuat selama 10 detik. Pembentukan busa dengan ketinggian antara 1 hingga 10 sentimeter yang stabil selama kurang lebih sepuluh menit menunjukkan adanya kandungan senyawa saponin. Setelah itu, larutan dikocok kembali selama sekitar 10 detik (Cahyaningsih, Sandhi dan Santoso., 2019).

6) Uji steroid

Sebanyak 2 gram sampel dimasukkan dan ditambahkan dengan 20 mL metanol yang mengandung 2 mL asam sulfat, kemudian campuran tersebut dididihkan dan disaring. Selanjutnya, filtrat ditambahkan dengan 2 mL asam asetat

anhidrat. Hasil positif ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi hijau, biru, atau ungu (Indarto., 2015).

7) Uji terpenoid

Sebanyak 5 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 ml kloroform dan 3 ml asam sulfat pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna coklat kemerahan (Indarto., 2015).

d. Peremajaan Bakteri

Bakteri uji diambil menggunakan ose, kemudian digoreskan pada permukaan Nutrient Agar dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Dima, Fatimawali dan Lolo., 2016).

e. Pembuatan ekstrak etanol batang andong merah dengan konsentrasi 60%, 70%, 80% dan 90%.

1) Variasi konsentrasi ekstrak sebesar 60%, 70%, 80% dan 90% dibuat dengan mengencerkan ekstrak pekat menggunakan pelarut etanol 96%, dengan menggunakan rumus % b/v

2) Jumlah massa ekstrak pekat yang dibutuhkan untuk setiap konsentrasi ekstrak masing-masing konsentrasi dengan volume 1 ml dalam Tabel 3.

Tabel 3
Variasi Konsentrasi

Konsentrasi ekstrak (%)	Massa ekstrak etanol batang andong merah 100% (gram)	Volume etanol 96% (ml)
60 %	0,60 gram	1 ml
70 %	0,70 gram	1 ml
80 %	0,80 gram	1 ml
90 %	0,90 gram	1 ml
Total	3 gram	4 ml

3) Selanjutnya, ekstrak pekat yang sudah dicampur etanol dihomogenkan kemudian disimpan.

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

Sebanyak 38 g bubuk media ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dalam satu liter aquadest. Oleh karena itu, untuk membuat 500 ml media, diperlukan 19 g bubuk media MHA. Larutan media dipanaskan di atas hotplate sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer hingga seluruh bubuk larut sempurna. Setelah larut, pH media diukur dengan menggunakan stick pH, dengan kisaran nilai optimal antara 7,2 hingga 7,4 pada suhu ruang. Media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah proses sterilisasi, media dikeluarkan dari autoklaf dan didiamkan beberapa menit hingga suhu menurun menjadi 40-45°C. Setelah mencapai suhu yang diinginkan, media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak ±25 ml dan dibiarkan hingga mengeras.

g. Pembuatan larutan McFarland

Larutan H₂SO₄ 0,36 N sebanyak 99,5 ml dicampurkan dengan larutan BaCl₂.2H₂O 1,175% sebanyak 0,5 ml dalam sebuah erlenmeyer, kemudian dikocok hingga terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan yang dihasilkan digunakan sebagai standar kekeruhan untuk suspensi bakteri uji (Dima, Fatimawali dan Lolo., 2016).

h. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Larutan standar McFarland 0,5 disiapkan terlebih dahulu. Kemudian, sampel bakteri uji yang telah diinokulasi kemudian diambil menggunakan kawat ose steril dan disuspensikan pada tabung berisi 2 ml larutan natrium klorida 0,9%. Suspensi ini diaduk hingga kekeruhannya sesuai dengan standar McFarland, yaitu dalam rentang 0,08 hingga 0,1. Jika nilai absorbansi suspensi bakteri lebih tinggi dari standar, larutan natrium klorida 0,9% ditambahkan untuk mengencerkan suspensi

hingga mencapai tingkat kekeruhan yang sama dengan larutan standar McFarland 0,5 (Khafipah, Saula dan Kasasiah., 2022).

i. Uji daya hambat antibakteri

Dalam waktu 15 menit setelah pembuatan suspensi bakteri, lidi kapas steril dicelupkan ke dalam suspensi *Staphylococcus aureus* 0,5 Mac Farland dan dibiarkan hingga terlapisi dengan sempurna. Suspensi bakteri kemudian diinokulasi dengan cara menggoreskan lidi kapas secara merata pada media MHA, lalu media diputar sebesar 60° dan penggoresan diulang dua kali untuk memastikan distribusi yang merata, diakhiri dengan mengusap bagian tepi media. Media dibiarkan terbuka selama 3-5 menit agar kelembaban berlebih terserap sebelum cakram disk diletakkan. Cakram disk yang telah direndam dalam ekstrak etanol batang andong merah dengan konsentrasi 60%, 70%, 80% dan 90% ditempatkan pada permukaan media MHA dengan jarak antar cakram minimal 24 mm, lalu ditekan perlahan agar kontak optimal dengan media. Sebagai kontrol, cakram antibiotik kloramfenikol diletakkan pada media MHA yang terpisah dari kelompok perlakuan. Media yang telah dipasang cakram kemudian diinkubasi dengan posisi terbalik pada inkubator dengan waktu 24 jam di suhu 37°C. Setelah proses inkubasi, aktivitas hambat ekstrak batang andong merah diamati dengan mengukur zona yang menghambat perkembangan *Staphylococcus aureus* pada media (MHA). Pengukuran zona hambat dilakukan menggunakan jangka sorong, dengan mengukur dari ujung ke ujung area hambatan (Clinical and Laboratory Standards Institute., 2012).

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang diperoleh dari hasil uji efektivitas ekstrak batang andong merah (*Cordyline sp*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* akan dicatat, dikategorikan dan disajikan dalam bentuk tabel. Selanjutnya, data tersebut akan dianalisis secara statistik melalui perangkat lunak *Statistical Program for Social Science* (SPSS).

2. Analisis data

Data yang didapat dianalisis secara kuantitatif, mencakup proses pengolahan, penyajian, dan perhitungan data. Selain itu, uji hipotesis dilaksanakan menggunakan analisis statistik yang dilakukan dengan bantuan perangkat lunak SPSS. Penelitian ini menguji normalitas data dengan Uji Shapiro-Wilk. Selanjutnya, uji homogenitas dilakukan untuk memastikan apakah data homogen. Data yang memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas dianalisis dengan uji *One Way* ANOVA. Ini juga digunakan untuk mengidentifikasi perbedaan antar kelompok perlakuan berdasarkan konsentrasi ekstrak serta untuk mengukur diameter zona hambat yang mencegah pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada setiap perlakuan dan pengulangan. Setelah analisis *One Way* ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan secara keseluruhan, kelompok mana saja yang menunjukkan perbedaan signifikan satu sama lain, uji lanjut seperti LSD digunakan untuk menentukan kelompok mana saja yang memiliki perbedaan signifikan satu sama lain.

G. Etika Penelitian

Penelitian ini wajib mematuhi prinsip etika yang berlaku. Prinsip-prinsip tersebut diterapkan di setiap tahap penelitian, mulai dari penyusunan hingga selesainya penelitian. Salah satu prinsip yang diterapkan yaitu beneficence, bertujuan untuk memberikan manfaat sekaligus mengurangi risiko kerugian bagi pihak lain. Selain itu, penelitian ini juga berpegang pada prinsip non-maleficence, yakni prinsip untuk tidak menimbulkan bahaya. Prinsip ini memastikan bahwa subjek penelitian tidak diperlakukan hanya sebagai objek dan tetap mendapatkan perlindungan dari potensi penyalahgunaan (Masturoh dan Anggita., 2018).