

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah True Eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian yaitu “Post Test Only Control Group Design” yang bertujuan untuk mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok Kontrol. Bentuk rancangan pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel :

Tabel 3.

Jenis Penelitian

Kelompok	Perlakuan	Posstest
R1 (Kelompok eksperimen)	X	O1
R2 (Kelompok Kontrol)	Kontrol	O2

Keterangan :

R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen dalam penelitian ini yaitu berbagai konsentrasi dari ekstrak etanol batang Serai konsentrasi 10%, 15%, 25%, 40%.

R2 (Random 2) : Kelompok kontrol, dalam penelitian ini adalah blank disk untuk reagen dan antibiotik kloramfenikol untuk kontrol positif.

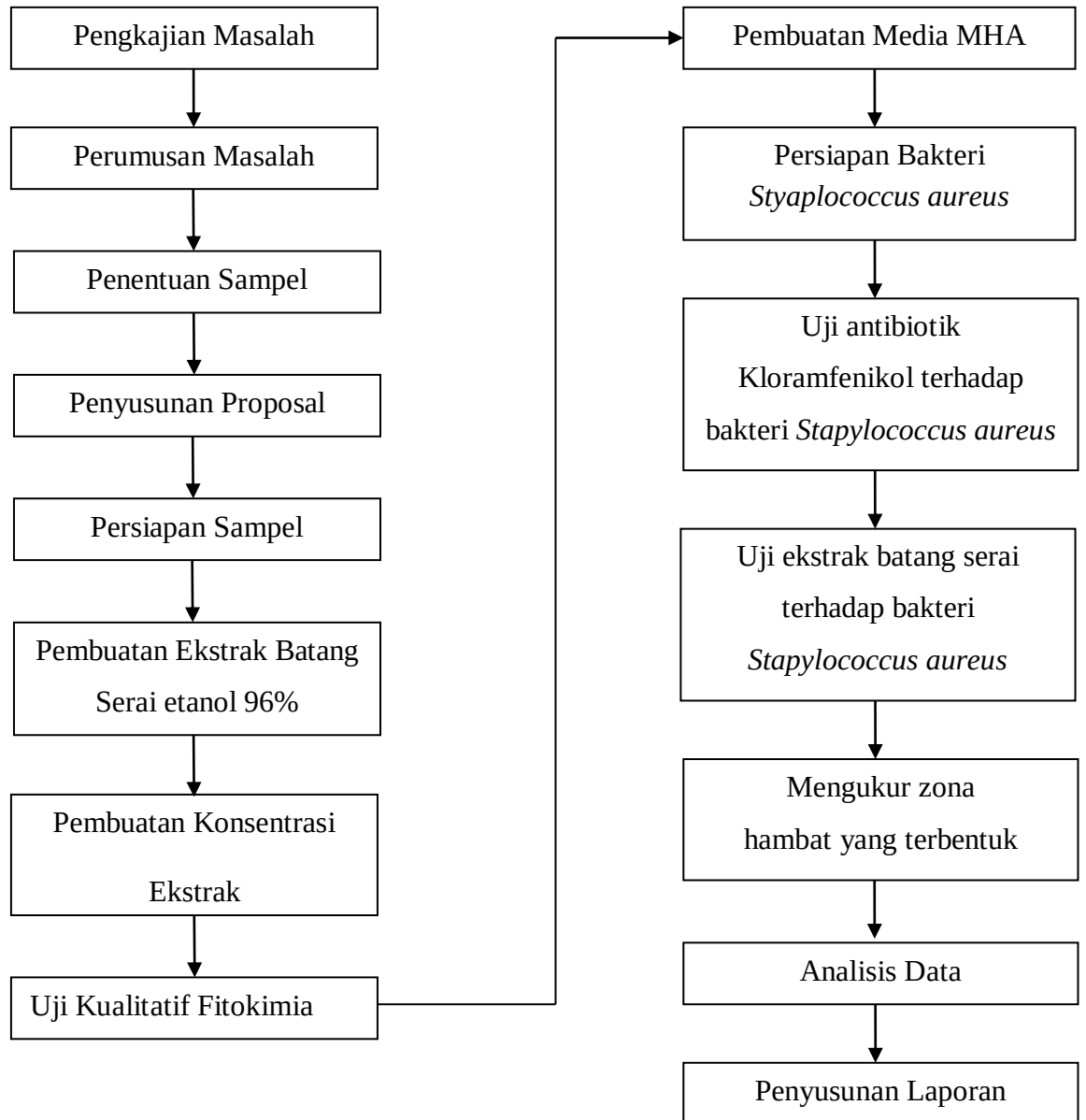
X (Exposure) : Perlakuan (Intervensi)

Observasi (O1) : Diameter zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus*

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

B. Alur Penelitian

Alur penelitian pada penelitian ini pada tabel dibawah ini :



Gambar 3. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Pusat Pengolahan Pasca Tanaman Obat (P4TO), Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Denpasar dan UPTD. Balai Laboratorium Kesehatan Kerthi Bali Sadhajiwa Provinsi Bali dari bulan April 2025.

D. Sampel Penelitian

1. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang Serai (*Cymbopogon citratus*) yang telah melalui proses evaporasi dan kemudian dibuat dalam beberapa konsentrasi, yaitu 10%, 15%, 25%, dan 40%. Batang Serai diperoleh dari Desa Siangan, Kec.Gianyar, Kab.Gianyar dengan kriteria tertentu, seperti bertekstur lunak dan berongga, dalam kondisi segar, memiliki aroma yang khas serta tidak mengalami kerusakan. Ekstrak batang Serai dibuat menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian diuapkan dengan evaporator hingga menghasilkan ekstrak kental.

2. Teknik Pengulangan

Batang Serai yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 3 kg, yang terlebih dahulu disortasi, dikeringkan, dan diayak. Sampel yang diuji berupa ekstrak batang Serai dengan konsentrasi 10%, 15%, 25%, dan 40%, yang diperoleh dengan mengencerkan ekstrak pekat menggunakan pelarut etanol 96%. Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik kloramfenikol, sedangkan kontrol negatif menggunakan blank disk. Dengan demikian, total perlakuan dalam penelitian ini berjumlah enam. Setiap perlakuan dalam penelitian ini

masing-masing perlakuan tersebut dilakukan pengulangan pada masing-masing variasi konsentrasi dihitung menggunakan rumus Federer sebagai berikut :

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

Keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

r : Jumlah Ulangan

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

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini sebanyak empat kali. Menurut Hanafiah (2016), jumlah minimal pengulangan yang digunakan dalam penelitian laboratorium adalah tiga kali pengulangan. Pada penelitian ini menggunakan empat perlakuan dengan konsentrasi 10%, 15%, 25% , 40%, masing- masing konsentrasi dilakukan empat kali pengulangan.

3. Unit analisis

Unit analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah zona hambat berbagai konsentras ekstrak batang Serai dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi yaitu 10%, 15%, 25%, 40%.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data yang dikumpulkan dalam penelitian ini terdiri dari data primer dan data sekunder. Data primer, menurut danang Sunyoto (2013), adalah data yang diperoleh langsung melalui observasi oleh peneliti. Dalam penelitian ini, data primer mencakup pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi ekstrak batang Serai. Sementara itu, data sekunder dalam penelitian ini didapat dari beberapa sumber referensi dan literature yang terkait dengan penelitian ini.

2. Teknik pengumpulan data

Cara pengumpulan data yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan melakukan observasi. Pengukuran dilakukan pada diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi ekstrak batang Serai. Hasil pengukuran diameter zona hambat tersebut menunjukkan adanya efektivitas penghambatan yang dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

3. Instrument pengumpulan data

Dalam penelitian ini instrument yang digunakan dalam pengumpulan data yakni jangka sorong, alat tulis, kamera dan alat laboratorium.

F. Alat Bahan dan Prosedu Kerja

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah mikropipet 20-200 dan 100 ul, batang pengaduk, Erlenmeyer (Pyrex), cawan petri, rak tabung reaksi, neraca analitik, Biosafety Cabinet (Biobase), rotary evaporator, spatula, jangka

sorong, wadah tempat maserasi (tabung vial), ose bulat, pinset, magnetik stirer, oven, api bunsen, ose bulat, densitometer, incubator, autoclaf.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah ekstrak batang Serai (*Cymbopogon citratus*), MHA (Mueller Hinton Agar), larutan NaCl fisiologis 0,9%, standard 0,5 Mc Farland, aluminium foil, blue tip, yellow tip, tissue, kertas saring, cotton swab, bakteri *Staphylococcus aureus*, kloramfenikol, etanol 96%.

3. Prosedur Kerja

a. Pembuatan serbuk simplisia

- 1) Batang Serai yang telah didapatkan ditimbang sebanyak 3 kg disortasi basah bahan alam yang akan digunakan, pastikan jenis, ukuran dan warna sesuai.
- 2) Kemudian dicuci dibawah air mengalir sampai bersih
- 3) Setelah bersih dari pengotor , batang Serai ditiriskan
- 4) Selanjutnya batang Serai diiris tipis dan dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.
- 5) Sampel yang telah kering kemudian ditimbang, menggunakan neraca analitik dan rendemennya dihitung dengan rumus :

$$\frac{\text{Bobot ekstrak kental (gr)}}{\text{Bobot simplisia yang di ekstraksi (gr)}} \times 100\%$$

- 6) Setelah dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk
 - 7) Kemudian serbuk diayak dengan menggunakan ayakan hingga halus.
- ### **b. Pembuatan ekstrak**
- 1) Sampel batang Serai yang telah dikeringkan dan dihaluskan sehingga didapat serbuk simplisia.

- 2) Serbuk simplisia batang Serai di ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan ditambahkan serbuk simplisia dengan perbandingan 1:5 hingga terendam sempurna oleh pelarut.
- 3) Kemudian proses perendaman dilakukan selama 3 hari dengan pengadukan sebanyak 4 kali dalam sehari.
- 4) Selanjutnya sampel disaring menggunakan kertas saring, lalu filtrat yang didapat dievaporasi dengan cara menggunakan rotary evaporator dengan suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kental.
- 5) Setelah itu ekstrak kental ditimbang menggunakan neraca analitik dan disimpan sebelum sampel siap digunakan untuk pengujian.

c. Skrining Fitokimia

1) Identifikasi alkaloid

- a) 1 ml sampel ekstrak batang serai dipipet, kemudian ditambahkan beberapa tetes asam sulfat 2N atau asam klorida 2N.
- b) Kemudian bagi larutan sampel menjadi 2 bagian
- c) Selanjutnya tambahkan 2 tetes reagen mayer dan wagner dan bagian lainnya dengan 1 ml reagen dragendorf.
- d) Lalu amati perubahan yang terjadi jika terbentuk endapan merah/coklat pada reagen dragendorf dan endapan putih/kuning pada reagen mayer dan wagner maka hasil dinyatakan positif.

2) Identifikasi flavonoid

- a) 1 ml sampel ekstrak batang serai diambil padatannya kemudian ditambahkan 2 ml NaOH hingga terbentuk warna kuning.

b) Kemudian tambahkan dengan beberapa tetes HCL hingga warna menghilang.

3) Identifikasi tanin

a) 1 ml sampel ekstrak batang serai diambil padatannya, kemudian tambahkan 2 ml aquadest lalu disaring.

b) Kemudian filtrat ditambahkan dengan 3 tetes FeCl_3 .

c) Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan.

4) Identifikasi saponin

a) 1 ml sampel ekstrak batang serai diambil padatannya, kemudian ditambahkan 2 ml aquadest.

b) Kemudian kocok kuat-kuat campuran selama 10 detik, lalu amati busa yang muncul selama 5 menit.

c) Selanjutnya tambahkan 1 tetes HCL 2N, kemudian amati perubahan yang terjadi, lalu amati jika hasil positif busa yang terbentuk tidak hilang.

d. Penentuan konsentrasi ekstrak batang Serai

Pada penelitian ini konsentrasi yang akan digunakan sebanyak 4 taras yaitu ekstrak batang Serai 0% sebagai control, ekstrak batang Serai 10%, ekstrak batang Serai 15%, ekstrak batang Serai 25% serta ekstrak batang Serai 40%.

Penentuan konsentrasi ekstrak batang Serai dilakukan dengan rumus yaitu :

$$K = \left(\frac{b}{vt} \right) \times 100\%$$

Keterangan :

K : Konsentrasi ekstrak batang Serai (%)

B : Berat ekstrak batang Serai

Vt : Volume total larutan

Tabel 4.
Variasi Kosentrasi

No	Kosentrasi (%)	Ekstrak Batang Serai Pekat 100% (gram)	Volume Etanol (ml)
1.	10%	0,5	5
2.	15%	0,75	5
3.	25%	1,25	5
4.	40%	2,0	5

- 1) Pembuatan larutan uji dilakukan dengan ekstrak batang Serai dengan seri konsentrasi 10%, 15%, 25%, 40%.
 - 2) Kemudian ekstrak batang Serai diencerkan menggunakan pelarut etanol 96%.
 - 3) Selanjutnya kosentrasi 10% dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam 5 ml pelarut etanol.
 - 4) Lalu kosentrasi 15% dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 0, 75 gram dalam 5 ml pelarut etanol
 - 5) Kosentrasi 25% dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 1,25 gram dilarutkan dalam 5 ml pelarut etanol.
 - 6) Dan kosentrasi 40% dibuat dengan menimbang , 2,0 gram dilarutkan dalam 5 ml pelarut etanol.
- e. Pembuatan suspensi bakteri
- 1) Diambil koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakkan murni dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl fisiologi 0,9%.
 - 2) Suspensi dibandingkan dengan kekeruhan standard Mc Farland 0,5%.

- 3) Suspensi diukur dengan menggunakan Mc Farland densitometer.
- f. Pembuatan media mueller hinton agar (MHA)
- 1) Bubuk media Muller Hinton Agar (MHA) ditimbang sebanyak 8,4 gram menggunakan neraca analitik dan setelah proses penimbangan bubuk media dipindahkan kedalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 400 ml diaduk hingga larut.
 - 2) Kemudian dipanaskan menggunakan hotplate sambil diaduk sampai serbuk benar-benar larut dan tercampur dengan sempurna.
 - 3) Setelah bubuk media larut sempurna dan homogen, lalu disterilkan media menggunakan autoclav selama 15 menit pada suhu 121°C.
 - 4) Selanjutnya media yang telah disterilisasi, didiamkan sampai suhu media turun menjadi $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$.
 - 5) Tuangkan ke dalam cawan petri (Plate) masing-masing plate sebanyak 20 ml, kemudian didiamkan hingga memadat.
 - 6) Setelah media memadat, cawan petri dibalik dan, apabila tidak langsung digunakan media yang sudah dituangkan pada cawan petri atau sisa media dalam tabung Erlenmeyer dapat dibungkus dengan kertas buram dan disimpan didalam refrigerator.
- g. Tahap pemeriksaan
- 1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan, kemudian sterilisasi area kerja menggunakan alkohol 70%.
 - 2) Lalu suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kepekatan Mc Farland 0,5% disiapkan.

- 3) Kemudian swab kapas steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah suspensi bakteri meresap, swab kapas steril diangkat dan diperas dengan cara menekan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar.
- 4) Selanjutnya swab kapas yang telah dicelupkan tadi disebar dengan cara digores-goreskan pada permukaan media MHA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dan merata hingga menutup seluruh permukaan media dengan goresan-goresan.
- 5) Lalu media MHA didiamkan 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam.
- 6) Cakram disk kosong disiapkan dan cakram disk ini ditetaskan 20 u masing-masing konsentrasi ekstrak batang serai yaitu konsentrasi 10%, 15%, 25%, 40% hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram disk.
- 7) Cakram antibiotik kloramfenikol yang berfungsi sebagai Kontrol positif dan cakram disk yang telah dijenuhkan dengan aquadest sebagai kontrol negatif ditempelkan pada media MHA.
- 8) Atur jarak cakram ± 15 mm antara cakram yang lainnya dan cakram yang sudah ditempelkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan.
- 9) Media yang telah ditanami cakram diinkubasi di inkubator selama 24 jam dengan posisi terbalik pada suhu 37°C.
- 10) Setelah diinkubasi zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram diukur menggunakan jangka sorong yang dinyatakan dalam satuan mm (milimeter) dan dikategorikan kekuatan daya antibakterinya.

h. Penentuan efektivitas antibakteri

Efektivitas antibakteri ekstrak batang Serai diperoleh dengan membandingkan diameter zona hambat ekstrak uji dengan diameter zona hambat kontrol positif kloramfenikol. Efektivitas antibakteri dari masing-masing perlakuan dihitung berdasarkan rumus yaitu ;

$$E = \frac{D}{Da} \times 100\%$$

Keterangan :

E : Efektivitas antibakteri (%)

D : Diameter zona hambat ekstrak (mm)

Da : Diameter zona hambat kontrol positif (mm)

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan Data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen perbedaan efektivitas antibakteri ekstrak batang Serai terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi ekstrak batang Serai yang dinyatakan dalam satuan milimeter (mm) yang diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating dan naratif.

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis kuantitatif, dilakukan dengan uji statistik menggunakan bantuan perangkat lunak komputer, analisis data dilakukan dengan beberapa tahap, antara lain :

- a. Untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak normal digunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*.
- b. Untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan ekstrak batang Serai antara konsentrasi 10%, 15%, 25% , 40%, apabila data berdistribusi normal digunakan uji *One Way Anova*
- c. Untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* apabila data berdistribusi normal, uji statistik yang digunakan adalah (Least Significant Difference) LSD.

H. Etika Penelitian

Dalam penelitian ini, pemahaman terhadap etika penelitian sangat penting bagi peneliti. Tujuan utama penerapan etika penelitian adalah untuk melindungi hak-hak subjek penelitian. Beberapa prinsip yang menjadi pedoman dalam aspek etika penelitian meliputi :

1. Prinsip penghormatan terhadap martabat manusia (*respect for persons*)

Prinsip ini menekankan penghargaan terhadap individu sebagai makhluk yang memiliki hak untuk membuat keputusan sendiri serta bertanggungjawab atas pilihannya.

2. Prinsip berbuat baik (*beneficence*) dan tidak merugikan (*non-maleficence*)

Prinsip ini menitikberatkan pada upaya memberikan manfaat yang maksimal dengan risiko seminimal mungkin kepada subjek penelitian. Selain itu, prinsip ini juga bertujuan untuk memastikan bahwa subjek tidak mengalami kerugian atau dimanfaatkan untuk kepentingan lain yang tidak etis.

3. Prinsip keadilan (*justice*)

Prinsip ini menekankan perlunya perlakuan yang adil bagi setiap individu. Hak-hak subjek harus dijaga dan dilindungi dengan baik. Sesuai dengan standar moral yang berlaku.