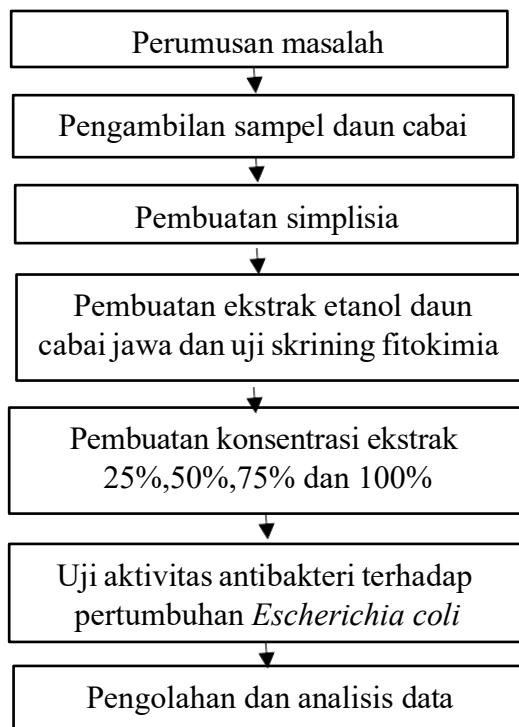


BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan ini merupakan *Quasi Eksperimen* yang memiliki tujuan menguji hubungan sebab akibat diantara variabel tanpa dilakukan pengacakan penuh pada subjek penelitian. Penelitian ini berbeda dengan eksperimen sejati oleh sebab tidak dapat dilakukannya kontrol penuh pada variabel atau tidak dapat menerapkan randomisasi secara menyeluruh. Desain penelitian yang diterapkan yaitu *Static Group Comparison* Dimana kelompok eksperimen dibandingkan dengan hasil kelompok kontrol tanpa dilakukannya pengukuran awal (Anantasia, 2025).

B. Alur Penelitian



Gambar 3 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Tempat dilaksanakannya penelitian ini yaitu dilakukan di Laboratorium Fakultas Pertanian universitas Warmadewa.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret - April 2025.

D. Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Unit analisis pada penelitian ini yaitu diameter zona hambat pertumbuhan *Escherichia coli* di setiap variasi konsentrasi ekstrak etanol daun cabai Jawa yang meliputi konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.

2. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak dari daun cabai Jawa yang diambil dari wilayah Desa Kedisan, Gianyar.

3. Jumlah dan besar sampel

a. Besar sampel

Untuk menguji aktivitas antibakteri dari tanaman cabai Jawa, diperlukan ekstrak pekat yang akan diencerkan dengan etanol 70% dalam perbandingan tertentu menjadi beberapa variasi konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75%, dan 100%. Kelompok kontrol pada penelitian ini menggunakan cakram disk yang telah dijenuhkan dengan etanol 70%.

Dalam melakukan percobaan laboratorium, diperlukan suatu pengulangan terhadap pengujian atau percobaan yang dilakukan. Hal ini bertujuan agar percobaan yang dilakukan memiliki ketelitian yang tinggi. Semakin banyak

pengulangan, maka akan semakin tinggi juga ketelitian percobaan tersebut. Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam suatu percobaan ditentukan berdasarkan rumus Federer (Widiyatno dan Muniroh , 2018).

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

Sumber: (Widiyatno dan Muniroh, 2018).

Gambar 4 Rumus Federer

Keterangan:

t: Jumlah perlakuan r: Jumlah

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

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

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 15 + 4$$

$$r \geq 19 \div 4$$

$$r \geq 4,75$$

Jumlah perlakuan yang dilakukan pada percobaan ini yaitu sebanyak lima perlakuan, antara lain empat perlakuan pada kelompok eksperimen dan satu perlakuan pada kelompok kontrol. Selanjutnya, dalam persamaan dimasukkan jumlah perlakuan (t) sehingga didapatkan jumlah pengulangan (r) yaitu $\geq 4,75$. Berdasarkan perhitungan tersebut, pengulangan yang dilakukan dalam pengujian daya hambat yaitu sebanyak 5 kali sehingga didapatkan 20 data dari kelompok eksperimen dan 5 data dari kelompok kontrol.

4. Kriteria sampel

a. Kriteria inklusi

- 1) Daun cabai Jawa berwarna hijau dan berumur muda
- 2) Daun yang diambil memiliki jarak antar ruas 2-5 cm
- 3) Panjang daun antara 8-18 cm dan lebar 4-10 cm

b. Kriteria eksklusi

- 1) Daun layu, berumur tua
- 2) Warna daun kuning atau kecoklatan
- 3) Kondisi fisik tumbuhan rusak seperti adanya lubang

E. Jenis Dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Data yang diperoleh dari penelitian di laboratorium yaitu berupa data diameter zona hambat ekstrak daun cabai Jawa terhadap pertumbuhan bakteri *Escherechia coli* dengan cara mengukur dan menghitung zona hambat (mm) yang terbentuk yang merupakan jenis data primer.

2. Teknik pengumpulan data

Penelitian ini memakai metode pengumpulan data secara kuantitatif dengan melakukan pengukuran dengan alat ukur melalui eksperimen laboratorium uji daya hambat ekstrak etanol daun cabai Jawa menggunakan metode difusi cara *Kirby-Bauer*. Pengukuran dilakukan pada diameter zona hambat dari tiap variasi konsentrasi dengan bantuan alat jangka sorong yang dilaporkan dalam milimeter (mm).

3. Alat dan bahan

a. Alat

Adapun alat yang digunakan dalam pengujian, antara lain blender, saringan, toples kaca, neraca analitik, pipet ukur 1 ml dan 10 ml, mikropipet 1000 μ l dan tip, bulb pipet, gelas ukur, evaporator, erlenmeyer, labu ukur 10 ml, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cotton swab, hotplate, magnetic stirrer, lampu spritus, autoclave, luminar air flow, fume hood, refrigerator, Mc Farland densitometer, jangka sorong, inkubator , oven, pipet tetes, dan autoclave.

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada pembuatan ekstrak daun cabai Jawa seperti: simplisia daun cabe Jawa, etanol 70%. Bahan yang digunakan pada uji aktivitas anti bakteri seperti : ekstrak daun cabe Jawa, Bakteri *Escherichia coli* EC010140923, media MHB (Mueller Hilton Broth), alkohol.

4. Prosedur kerja

a. Tahap pembuatan serbuk simplisia

- 1) Dikumpulkan daun cabe Jawa sebanyak 3 kg
- 2) Dicuci bersih dengan air mengalir (sortasi basah) dilakukan untuk memisahkan cemaran (kotoran dan benda asing lain) dari bahan simplisia, kemudian ditiriskan.
- 3) Dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C selama $\pm 4 \times 24$ jam (sortasi kering) agar simplisia tidak cepat rusak dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lebih lama. Dengan berkurangnya kadar air, maka reaksi enzimatik dapat dicegah sehingga penurunan mutu atau kerusakan simplisia dapat dihindari

- 4) Selanjutnya, daun yang sudah kering dihancurkan dengan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk.
 - 5) Serbuk simplisia ditimbang dengan hasil 150 gram lalu disimpan pada suhu yang sesuai dengan sifat dan ketahanan simplisia.
- b. Tahap pembuatan ekstraksi daun cabe Jawa dengan menggunakan etanol 70% (Kadek Deni, 2024)
- 1) Ditimbang 100 gram simplisia serbuk daun cabe jawa.
 - 2) Diekstraksi dengan perbandingan pelarut 1:5 (b/v) (200 gram simplisia dilarutkan dalam 1000 ml pelarut). Proses ekstraksi dilakukan selama 1 x 24 jam secara maserasi dengan pengadukan selama 6 jam.
 - 3) Hasil maserasi disaring dengan menggunakan corong yang diberi kertas saring, filtrat di tampung dalam erlenmeyer.
 - 4) Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan atau dikentalkan dengan rotary evaporator pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental.
 - 5) Apabila masih terdapat sisa pelarut maka ekstrak dipekatkan kembali dengan menggunakan waterbath hingga seluruh pelarut menguap dan diperoleh ekstrak etanol kental daun cabai Jawa.
 - 6) Ditimbang ekstrak kental daun cabai Jawa dan dicatat.
 - 7) Dilakukan perhitungan kadar rendemen dari ekstrak yang diperoleh. Kadar rendemen ekstrak dihitung untuk mengetahui seberapa besar ekstrak yang dihasilkan dari proses ekstraksi dari masing-masing pelarut. Kadar rendemen ekstrak (%) = $\frac{\text{bobot hasil ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$

c. Persiapan larutan uji

Ekstrak kental ditimbang sebanyak 0,01 g dilarutkan dalam 100 µl pelarut etanol. Larutan ini digunakan dalam skrining senyawa fitokimia dalam ekstrak daun cabai Jawa.

d. Uji alkaloid modifikasi prosedur dari Pratiwi, (2023)

- 1) Diambil sebanyak 2 mL ekstrak daun cabe Jawa dimasukkan pada 2 tabung berbeda
- 2) Tabung pertama : 2 ml ekstrak ditambahkan 2 tetes reagen mayer, tabung kedua : 2 ml ekstrak ditambahkan 2 tetes reagen wagner, maka tabung pertama akan menimbulkan endapan berwarna coklat kemerahan jika hasil uji positif dan pada tabung kedua akan menimbulkan endapan kemerahan jika hasil uji positif.

e. Uji flavonoid modifikasi prosedur dari Royani, (2024)

- 1) Diambil sebanyak 2 mL ekstrak etanol daun cabe Jawa dimasukan tabung reaksi
- 2) Ditambahkan asam klorida pekat (HCl pekat) sebanyak 2 tetes dan dikocok kuat
- 3) Ditambahkan serbuk Magnesium (Mg) dan dikocok kuat. Sampel mengandung flavonoid bila terdapat buih dengan intensitas yang banyak dan larutan akan mengalami perubahan warna dari warna awal sampel menjadi warna jingga. Terbentuk larutan berwarna jingga menunjukkan adanya flavonoid.

- f. Uji saponin modifikasi prosedur dari Royani, (2024)
- 1) Diambil sebanyak 2 mL ekstrak etanol daun cabe Jawa dan dimasukkan tabung reaksi lalu ditambahkan 10 mL air panas dan ditambahkan asam klorida (HCl) 2N sebanyak 2 tetes lalu dikocok kuat
 - 2) Setelah itu, dilihat apakah terbentuk buih dari warna awal sampel setelah didiamkan selama 7 menit. Sampel dikatakan mengandung senyawa saponin.
- g. Uji tanin modifikasi prosedur dari Royani, (2024)
- 1) Diambil sebanyak 2 mL ekstrak etanol daun cabe Jawa dan dimasukkan tabung reaksi lalu ditambahkan FeCl_3 sebanyak 2 tetes.
 - 2) Homogenkan larutan dan amati perubahan warnanya, jika sampel terbentuk warna hitam kehijauan, maka sampel tersebut positif mengandung tannin.
- h. Uji terpenoid modifikasi prosedur dari Royani, (2024)
- 1) Diambil sebanyak 2 mL ekstrak etanol daun cabe Jawa dan dimasukkan tabung reaksi lalu ditambahkan *Lieberman Burchard* sebanyak 2 tetes.
 - 2) Ditambahkan larutan anhidrida asetat dan H_2SO_4 masing-masing 2 tetes, apabila perubahan warna menjadi orange kecoklatan menunjukkan senyawa mengandung terpenoid.
- i. Uji steroid modifikasi prosedur dari Royani, (2024)
- 1) Diambil sebanyak 2 mL ekstrak etanol daun cabe Jawa dan dimasukkan tabung reaksi lalu ditambahkan *Lieberman Burchard* sebanyak 2 tetes.
 - 2) Ditambahkan larutan anhidrida asetat dan H_2SO_4 masing-masing 2 tetes, apabila perubahan warna menjadi biru kehijauan.

j. Uji fenol

1) Diambil sebanyak 2 mL ekstrak etanol daun cabe Jawa dan dimasukkan tabung reaksi lalu ditambahkan 2 tetes FeCl_3

2) Warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa fenol dalam ekstrak.

k. Tahap pembuatan seri konsentrasi ekstrak etanol daun cabe Jawa

1) Dibuat 4 seri konsentrasi dari ekstrak kental daun cabai Jawa (25%, 50%, 75%, dan 100%) dengan menggunakan pelarut etanol.

2) Untuk larutan uji dengan konsentrasi 25% diambil 25 gram ekstrak kental daun cabai Jawa kemudian ditambahkan pelarut etanol 75 μl .

3) Untuk larutan uji konsentrasi 50% diambil 50 gram ekstrak kental daun cabe jawa kemudian ditambahkan pelarut etanol 500 μl .

4) Untuk larutan uji konsentrasi 75% diambil 75 gram ekstrak kental daun cabe jawa kemudian ditambahkan pelarut etanol 250 μl .

5) Untuk konsentrasi 100% gram ekstrak kental daun cabe Jawa hanya di jenuhkan dalam cakram kosong.

l. Tahap pembuatan media MHB

1) Ditimbang media MHB 21 gram

2) Dimasukkan media MHB kedalam erlenmeyer, larutkan dengan aquadest sebanyak 1000 ml

3) Dipanaskan diatas hot plate sampai mendidih.

4) Diangkat dan ditutup erlenmeyer dengan kapas dan kertas coklat, kemudian ikat dengan benang.

5) Disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit

m. Peremajaan Bakteri

- 1) Disiapkan tabung reaksi steril yang isi dengan 3-5 ml aquades
- 2) Ambil satu ose biakan bakteri murni *Escherichia coli* dan homogenkan pada aquades.
- 3) Ukur kekeruhan dengan standar McFarland 0,5
- 4) Ditutup tabung reaksi dengan penutupnya dan simpan pada kulkas
- 5) Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37⁰ C selama 18-24 jam. n.Uji aktivitas antibakteri
- 6) Suspensi bakteri sebanyak 1 mL dituang pada cawan petri dengan media MHB 15 mL menggunakan metode pour plate
- 7) Ditunggu hingga media dingin dan memadat
- 8) Letakkan cakram dengan ekstrak etanol daun cabe Jawa dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100% beserta kontrol dalam cawan petri yang telah diinokulasikan dengan bakteri.
- 9) Diinkubasi selama 1x 24 jam pada inkubator
- 10) Diamati dan diukur diameter zona bening dengan jangka sorong .

F. Pengolahan Dan Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas menggunakan *SPSS* yang membandingkan diameter zona hambat pada perlakuan kontrol positif dengan masing-masing perlakuan konsentrasi terhadap bakteri *Escherechia coli* dengan $sig < 0.05$. Uji normalitas yang digunakan adalah uji *Shaphiro-Wilk* untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas berfungsi untuk mengetahui data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Apabila $sig > 0.05$ maka data berdistribusi normal. Apabila data tidak berdistribusi

normal dilakukan uji lanjutan *Kruskal Wallis*. Untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dilakukan uji lanjutan *Post-Hoc Kruskal-Wallis Multiple Comparisons*.

G. Etika Penelitian

Prinsip etik bersifat umum sebab dapat melampaui batas geografis, budaya, ekonomi, hukum, dan politik. Setiap orang yang melakukan suatu penelitian memiliki tanggung jawab untuk menerapkan prinsip etik yang meliputi menghormati harkat dan martabat manusia, berbuat baik dan tidak merugikan serta keadilan. Penerapan prinsip etik dalam penelitian bertujuan agar tidak terjadi hal-hal yang tidak melindungi peserta penelitian. Oleh karena itu, perlu diciptakan sistem/mechanisme, termasuk norma dan prosedur berdasarkan prinsip ini yang secara langsung melindungi peserta (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2021)