

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *true experimental*. Dikatakan sebagai penelitian *true experimental* karena peneliti dapat mengontrol seluruh variabel eksternal yang dapat mempengaruhi proses eksperimen (Sugiyono, 2013). Pada penelitian ini digunakan desain *Posttest-Only Group Design*. Dalam desain ini terdapat dua kelompok yang masing-masing dipilih secara acak (R). Kelompok yang pertama diberi perlakuan (X) sedangkan kelompok lainnya tidak. Kelompok yang mendapatkan perlakuan disebut kelompok eksperimen dan kelompok yang tidak mendapatkan perlakuan disebut kelompok kontrol (Sugiyono, 2013).

Tabel 4
Desain Penelitian *Posttest Only Control Design*

	Grup	Variabel Terikat	Post test
R1	Eksperimen	X	O1
R2	Kontrol	-	O2

Keterangan:

- R1 : Kelompok eksperimen yaitu rebusan daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del) dengan konsentrasi 25%, 35%, 45% dan 55%
- R2 : Kelompok kontrol, yaitu control negatif berupa aquades steril dan kontrol positif berupa cakram disk antibiotik kloramfenikol.
- X : Perlakuan

- O1 : Pengukuran pertama, yakni pengukuran zona hambat pada kelompok perlakuan
- O2 : Pengukuran kedua, yakni pengukuran zona hambat pada kelompok kontrol

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia dan Bakteriologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Denpasar Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

2. Waktu penelitian

Penelitian akan dilaksanakan dari bulan Januari hingga Juni 2022.

C. Populasi dan Sampel

1. Sampel penelitian

Sampel penelitian ialah sebagian kecil dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki suatu populasi (Pradana dan Reventiary, 2016). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rebusan daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del) dengan konsentrasi 25%, 35%, 45% dan 55%. Daun yang digunakan adalah daun Afrika (latin: *Vernonia amygdalina* Del) yang memiliki kriteria inklusi daun berwarna hijau tua, dipetik dari daun kelima setelah pucuk. Sedangkan karakteristik eksklusinya yakni daun yang layu dan daun yang rusak akibat terkena serangan hama dan penyakit.

2. Besar sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rebusan daun Afrika (latin: *Vernonia amygdalina* Del) dengan konsentrasi 25%, 35%, 45% dan 55%. Penelitian ini menggunakan kontrol negatif berupa aquades steril (tidak terdapat zona hambat) (Pratiwi dan Gunawan, 2018) dan juga kontrol positif berupa cakram disk antibiotik kloramfenikol (terdapat zona hambat), sehingga didapatkan jumlah perlakuan dalam penelitian ini adalah enam.

Untuk memastikan ketelitian dari suatu penelitian diperlukan replikasi. Menurut Hanafiah (2016) replikasi merupakan jumlah pengulangan perlakuan yang diamati dalam sebuah percobaan. Jumlah pengulangan perlakuan tergantung pada derajat ketelitian yang diinginkan oleh peneliti terhadap kesimpulan hasil percobaannya. Sebagai suatu kriteria, jumlah pengulangan dianggap telah cukup baik jika memenuhi persamaan berikut:

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

dimana:

t = jumlah perlakuan

r = jumlah perulangan

Maka, untuk menentukan jumlah perulangan dalam penelitian ini, digunakan persamaan sebagai berikut.

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

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan maka diketahui pada penelitian ini diperlukan minimal empat kali pengulangan pada setiap variasi sampel. Percobaan di laboratorium, biasanya cukup dengan tiga kali pengulangan, namun semakin banyak atau bertambah pengulangan maka akan semakin meningkat ketelitiannya (Sucipta, 2015). Pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah empat kali pengulangan perlakuan konsentrasi. Pada satu kali perlakuan konsentrasi dibutuhkan 20 μ l air rebusan daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del), sehingga pada masing-masing perlakuan konsentrasi membutuhkan air rebusan daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del) sebanyak 80 μ l. Selain itu, dilakukan pengulangan sebanyak satu kali pengulangan untuk kontrol negatif dan kontrol positif. Pada perlakuan kontrol negatif dibutuhkan 20 μ l aquades steril. Kontrol positif menggunakan cakram disk yang sudah berisi antibiotik kloramfenikol, sehingga dibutuhkan 1 buah cakram disk yang sudah berisikan antibiotik kloramfenikol.

3. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah menggunakan teknik *purposive sampling*. *Purposive sampling* merupakan teknik pengambilan sampel dengan menggunakan pertimbangan tertentu (Sugiyono, 2013). Sampel yang digunakan adalah rebusan daun Afrika (latin: *Vernonia amygdalina* Del) dengan konsentrasi 25%, 35%, 45% dan 55%, dimana daun yang digunakan adalah daun Afrika (latin: *Vernonia amygdalina* Del) yang memiliki kriteria inklusi daun berwarna hijau tua, dipetik dari daun kelima setelah pucuk. Sedangkan karakteristik eksklusinya yakni daun yang layu dan daun yang rusak akibat terkena hama.

4. Unit Analisis

Unit analisis pada penelitian ini adalah diameter zona hambat dalam satuan mm yang dihasilkan dari konsentrasi yang berbeda dari rebusan daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del) yakni 25%, 35%, 45% dan 55% terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*. Rebusan air daun Afrika dihitung dalam satuan μL .

D. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan adalah sebagai berikut, *autoclave* (Tomy Sx-500), kompor listrik (Maspion), neraca analitik (RADWAG), *biosafety cabinet* (Biobase), *hotplate* (Jisico), *magnetic stirrer*, gelas ukur (Pyrex Iwaki) 250 ml dan 10 ml masing-masing 1 buah, *erlenmeyer* (Schott Duran) 500 ml, *beaker glass* (Schott Duran) 500 ml 2 buah, *beaker glass* (Pyrex Iwaki) 1000 ml, pipet ukur (Pyrex Iwaki) 1ml, 5ml dan 10 ml masing-masing 1 buah, *ball pipet* (Marienfield) 1 buah, batang pengaduk, *petridish* steril 9 buah, jangka sorong 1 buah, *mikropipet* (Socorex) 2 μl -20 μl 1 buah, *yellow tip* 5 buah, *Mac Farland* densitometer (Den-18) 1 buah, lampu spirtus 1 buah, korek api 1 buah, *incubator* (Esco Isotherm), ose, tabung reaksi (Iwaki) 8 buah, rak tabung reaksi 2 buah dan alat tulis.

2. Bahan

Adapun bahan yang digunakan adalah daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del) 100 gram yang dipetik dari daun kelima dari pucuk, aquades, cakram disk kosong 17 buah, cakram disk antibiotik kloramfenikol 1 buah, bakteri *E coli*, media *Mueller Hinton Agar* (Oxoid) 5,13 gram, NaCl fisiologis 0,9% 10 mL, standar

McFarland 0,5%, lidi kapas steril 1 buah, kertas saring dan alat pelindung diri berupa jas laboratorium, masker serta handscoon.

3. Prosedur kerja

a. Pengambilan sampel daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del):

Pemetikan daun dilakukan pada siang hari. Pemetikan daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del) dilakukan dengan menggunakan formula pemetikan daun teh. Hal ini dilakukan untuk menjaga kualitas daun yang dihasilkan agar tetap terjaga. Proses pemetikan pada umumnya menggunakan petikan medium. Petikan medium adalah pemetikan daun yang dimulai dari daun kelima setelah pucuk. Rumus petikan daun akan mempengaruhi kandungan senyawa kimia pada daun teh yang dihasilkan (Amanto, Aprilia dan Nursiwi, 2019).

b. Pelaksanaan protokol Kesehatan:

Sebelum melakukan preparasi sampel, menggunakan alat pelindung diri terlebih dahulu. Adapun alat pelindung diri yang digunakan adalah masker, handscoon dan jas laboratorium. Setelah menggunakan alat pelindung diri melakukan desinfeksi pasa area kerja.

c. Pembuatan rebusan daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del): (Upadhana, 2021)

- 1) Daun dicuci hingga bersih lalu dipotong menjadi kecil-kecil untuk memudahkan saat proses perebusan.
- 2) Daun ditimbang seberat 100 gram lalu dicampurkan dengan air sebanyak 1 L.
- 3) Kemudian direbus dengan suhu 90°C hingga air yang tersisa hanya sepertiga bagian atau hanya tersisa 300 ml.

d. Pembuatan konsentrasi air rebusan daun Afrika (latin: *Vernonia amygdalina* Del):

1) Rumus pengenceran yang digunakan yakni:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan rumus:

M_1 = konsentrasi awal

V_1 = volume yang diperlukan

M_2 = konsentrasi yang ingin dibuat

V_2 = volume yang akan dibuat

2) Jumlah volume air rebusan daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del) yang diperlukan untuk membuat berbagai konsentrasi adalah sebagai berikut:

Tabel 5
Volume air rebusan daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del) yang diperlukan untuk membuat masing-masing konsentrasi

Konsentrasi	Volume konsentrasi yang diinginkan	Volume rebusan murni yang diperlukan	Volume Aquades yang diperlukan
25%	2 ml	0,5 ml	1,5 ml
35%	2 ml	0,7 ml	1,3 ml
45%	2 ml	0,9 ml	1,1 ml
55%	2 ml	1,1 ml	0,9 ml

3) Masing-masing konsentrasi dihomogenkan.

- e. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar*: (Utomo dkk., 2018)
- 1) Media MHA (Muller Hinton Agar) dibuat dengan menimbang sejumlah 5,13 gram dan dilarutkan dalam 135 ml aquades (dari perbandingan etiket media yaitu 38,0 gram media disuspensikan ke dalam 1 liter aquades)
 - 2) Media dipanaskan menggunakan hotplate sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer sampai serbuk tercampur merata.
 - 3) Selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama satu sampai dua jam.
 - 4) Tuang ke dalam cawan petri diaman masing-masing cawan petri dituangi media sebanyak 15 ml.
 - 5) Kemudian didiamkan pada suhu kamar hingga memadat.
 - 6) Lalu disimpan pada suhu 4°C (di dalam lemari es).
- f. Pembuatan suspensi *E. coli* (Yanti, 2018)
- 1) Ambil satu sampai tiga koloni *E. coli* menggunakan ose dari biakan murni lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl fisiologis 0,9%.
 - 2) Suspensi ini dibandingkan dengan kekeruhan standar 0,5 *Mc Farland* menggunakan alat *Mc Farland* densitometer.
- g. Uji antibakteri terhadap *E. coli* menggunakan metode difusi cakram: (Yanti, 2018)
- 1) Siapkan cakram disk kosong dan diteteskan 20 µl masing-masing konsentrasi rebusan daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del) hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram disk.

- 2) Siapkan cakram disk kosong lalu ditetaskan 20 μ l aquades sebagai kontrol negatif dan cakram disk kloramfenikol sebagai kontrol positif.
- 3) Siapkan suspensi *E. coli* dengan kepekatan 0,5 Mc Farland
- 4) Siapkan lidi kapas swab steril dan 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-putar.
- 5) Swab kapas yang telah dicelupkan pada suspensi bakteri mulai digoreskan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan yang dilakukan secara merata.
- 6) Diamkan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) selama 5 sampai 15 menit untuk memberikan waktu bagi bakteri untuk menempel pada media.
- 7) Masing-masing cakram disk yang telah terisi dengan konsentrasi rebusan daun Afrika, kontrol negatif yang berisikan aquades steril dan kontrol positif kemudian diletakkan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang sudah berisikan goresan suspensi bakteri sesuai rancangan yang telah dibuat.
- 8) Cakram disk ditempelkan dan sedikit ditekan-tekan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah digoreskan suspensi bakteri tersebut.
- 9) Jarak antar cakram satu dengan lainnya minimal 15 mm, selain itu cakram yang telah diletakkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan maupun digeser.
- 10) Media yang telah ditemplei cakram disk diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan posisi terbalik.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Penelitian ini menggunakan data primer, yakni data yang mengacu pada data yang proses pengumpulannya dilakukan secara langsung (Hardani dkk., 2020). Data pada penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *E. coli* pada berbagai konsentrasi rebusan daun Afrika (latin: *Vernonia amygdalina* Del) dan kontrol yang diperoleh dari pengukuran di laboratorium.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang digunakan adalah pengujian laboratorium dengan mengukur zona hambat pertumbuhan bakteri *E. coli* pada berbagai konsentrasi rebusan daun afrika (*Vernonia amygdalina* Del), yakni 25%, 35%, 45% dan 55% menggunakan jangka sorong.

F. Pengumpulan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa diameter zona hambat pertumbuhan *E. coli* pada berbagai konsentrasi rebusan daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del) yang dinyatakan dalam satuan milimeter (mm) yang kemudian diolah menggunakan teknik pengolahan data secara data tabular, yaitu data yang akan disajikan dalam bentuk tabel dan dideskripsikan secara naratif (Suyasa dan Becti, 2020)

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis kuantitatif, dilakukan dengan uji statistik menggunakan bantuan perangkat lunak komputer.

- a. Uji *Kolmogorov-Smirnov* digunakan untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak.
- b. Jika data berdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan menggunakan uji *Two Way Anova* untuk mengetahui adanya perbedaan zona hambat *E. coli* pada berbagai konsentrasi rebusan daun afrika (*Vernonia amygdalina* Del).
- c. Jika data berdistribusi tidak normal, maka dilanjutkan dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis* yang digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan zona hambat *E. coli* pada konsentrasi 25%, 35%, 45% dan 55% rebusan daun afrika (*Vernonia amygdalina* Del).