

BAB IV

METODELOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menerapkan metode *true experimental* dengan desain *Posttest Only Control Group Design*. Pada desain ini, sampel penelitian akan dibagi secara acak (R) menjadi dua kelompok, yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Dimana, kelompok eksperimen akan diberikan perlakuan tertentu (X), sementara kelompok kontrol tidak menerima perlakuan. Lalu kedua kelompok akan dievaluasi berdasarkan hasil akhir (O2) untuk menilai efek dari perlakuan yang diberikan (Auliya dkk., 2020).

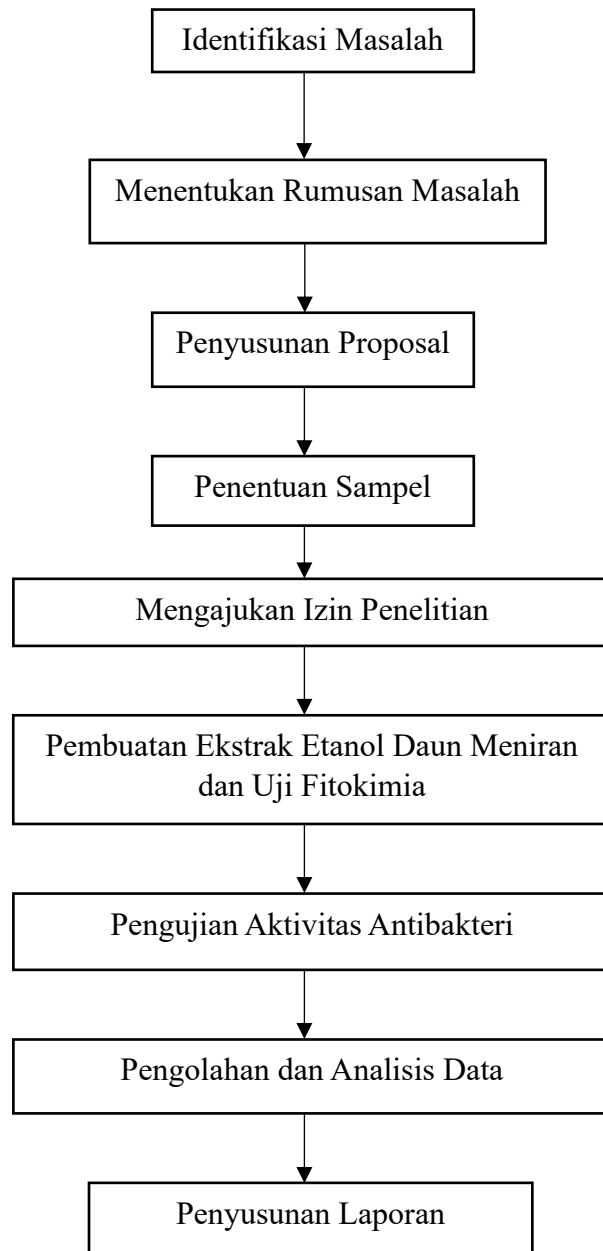
Tabel 2
Rancangan Posttest Only Control Group Design

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

Keterangan :

1. R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen, di penelitian ini merupakan sejumlah konsentrasi dari ekstrak etanol daun meniran.
2. R2 (Random 2) : Kelompok kontrol
3. X (Exposure) : Perlakuan ekstrak etanol daun meniran
4. O2 (Observasi) : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

B. Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Terapan dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Februari – April 2026.

D. Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian yang dilakukan merujuk pada diameter zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada setiap konsentrasi ekstrak etanol daun meniran, dengan konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%.

a. Repitasi pengulangan

Pada pemeriksaan laboratorium, pengulangan uji atau pengulangan percobaan perlu dilakukan untuk memastikan hasil yang lebih akurat. Tujuan pengulangan yaitu meningkatkan ketelitian dalam penelitian. Rumus Federer digunakan untuk menghitung jumlah pengulangan yang dibutuhkan dalam suatu percobaan (Dewangga & Qurrohman, 2019).

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

Keterangan :

t = jumlah perlakuan

r = jumlah pengulangan

$$\text{➤ } (t - 1) (r - 1) \geq 15$$

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

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

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 15 + 3$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 18 \div 3$$

$$r = 6$$

Berdasarkan persamaan *Federer* yang sudah dipaparkan bisa dijelaskan bahwa dalam penelitian yang dilakukan memerlukan pengulangan sebanyak 6 kali. Dalam perhitungan digunakan jumlah perlakuan (t) untuk memperoleh nilai jumlah pengulangan (r) dengan hasil = 6. Berdasarkan hasil yang didapatkan, jumlah pengulangan pada uji daya hambat ditetapkan sebanyak 6 kali, sehingga diperoleh 24 data.

2. Kriteria sampel

Adapun kriteria inklusi dan eksklusi pada penelitian ini adalah :

- a. Kriteria Inklusi : Daun Meniran yang tumbuh di wilayah Dasa Lebih Gianyar, diambil pagi hari di jam 8-11 WITA. Daun masih berwarna hijau atau tidak mengalami perubahan warna, diambil daun ke-3 sampai ke-8. Pengambilan sampel dilakukan secara purposive sampling, dari tanaman yang tumbuh disekitar Pantai Lebih, Kabupaten Gianyar.
- b. Kriteria Eksklusi : Daun meniran yang berwarna kuning, berlubang ataupun rusak.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

- a. Data Primer

Data primer diperoleh berdasarkan hasil penelitian laboratorium yang dilakukan secara langsung yaitu hasil skrining fitokimia (alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid) dan pengukuran zona hambat pertumbuhan

Staphylococcus aureus pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol dari daun meniran.

b. Data Sekunder

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

2. Teknik pengumpulan data

Pendekatan pengumpulan data kuantitatif, yang diperoleh dari pengukuran yang dilakukan menggunakan instrumen yang tepat dalam percobaan laboratorium, digunakan dalam penelitian ini (Auliya dkk., 2020). Hasil skrining fitokimia ekstrak Daun Meniran berdasarkan reaksi warna atau terbentuknya endapan/perubahan warna setelah penambahan reagen. Teknik difusi cakram Kirby-Bauer digunakan untuk mengevaluasi daya hambat ekstrak etanol dari daun meniran. Jangka sorong digunakan untuk mengukur diameter zona hambat untuk setiap perubahan konsentrasi, dan hasilnya dilaporkan dalam milimeter (mm).

3. Instrument pengumpulan data

- a. Alat pelindung diri (APD), digunakan sebagai alat untuk melindungi diri dari resiko kerja.
- b. Alat tulis, digunakan untuk mencatat data dan hasil.
- c. Kamera/*Handphone*, digunakan sebagai alat untuk mendokumentasikan selama penelitian.

4. Alat dan bahan

a. Alat

Alat yang diperlukan dan digunakan dalam penelitian ini yaitu pisau, blender/*chopper*, 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, incubator, jangka sorong, rak tabung, lemari pendingin, laminar air flow.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun meniran, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, cakram antibiotik kloramefenikol, etanol 96%, bubuk MHA, aquadest, kertas saring, stik pH, ose steril, NaCl 0,9%, cakram disk, asam klorida 2N, reagen dragendroff, reagen mayer wagner, serbuk magnesium, HCl pekat, H₂SO₄ pekat, FeCl₃, H₂SO₄ 0,36 N.

5. Prosedur kerja

a. Persiapan sampel.

Tanaman meniran yang digunakan dalam melakukan penelitian ini yaitu bagian daun hingga tangkai, pastikan daun dalam keadaan segar. Dikumpulkan dalam jumlah 2 kg untuk mendapatkan ekstrak yang memadai. Daun yang sudah dikumpulkan dicuci bersih dengan air mengalir atau dengan cara merendamnya, lalu ditiriskan. Setelah itu daun dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 2 hari. Setelah daun kering kemudian di potong-potong dan hancurkan hingga memperoleh simplisia dalam bentuk serbuk halus (Dewangga & Qurrohman, 2019)

b. Pembuatan ekstrak etanol daun meniran dengan metode maserasi.

Simplisia daun meniran yang sudah dibuat dimasukkan ke dalam wadah dan ditimbang sebanyak 238 gram, lalu direndam pada etanol 96% sebanyak 1.190 liter, sampai semua simplisia terendam dan tutup menggunakan aluminium foil. Setelah didiamkan selama 3 hari dengan pengadukan sesekali, kertas saring digunakan

untuk menyaring campuran tersebut. Dengan menggunakan evaporator putar vakum, filtrat dari hasil maserasi dipisahkan dari sisa pelarut untuk menghasilkan ekstrak pekat 100% (Dewangga & Qurrohman, 2019).

c. Skrining fitokimia.

1) Uji alkaloid

Pipet 3 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan beberapa tetes asam klorida 2N lalu bagi larutan sampel menjadi 2 tabung. Tambahkan 1-2 tetes reagen Mayer Wagner pada tabung pertama, pada tabung kedua tambahkan 1-2 tetes reagen Dragendorff. Setelah itu amati perubahan yang terjadi, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan merah jingga pada tabung kedua atau reagen Dragendorff dan endapan putih kekuningan pada tabung pertama reagen Mayer Wagner (Habibah & Dewi, 2024).

2) Uji flavonoid

1 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 0,5 g serbuk magnesium dan 10 tetes HCL pekat. Sampel positif mengandung flavonoid jika terbentuk warna merah, merah muda atau jingga.

3) Uji tanin

Sampel sebanyak 1 ml dimasukkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 1 tetes pereaksi besi (III) klorida. Hasil positif ditunjukkan dengan warna biru atau hijau kehitaman.

4) Uji saponin

Pipet 1 ml sampel dan tambahkan 10 ml air panas lalu kocok kuat-kuat selama 10 detik. Amati busa yang muncul selama 5 menit, kemudian tambahkan 1 tetes

asam klorida 2N dan amati perubahan yang terjadi, jika busa yang terbentuk tidak hilang maka hasil positif.

5) Uji terpenoid

Pipet 1 ml ekstrak lalu tambahkan 2 ml kloroform dan 3 ml asam sulfat pekat.

Hasil positif jika terbentuk warna coklat kemerahan.

- d. Pembuatan ekstrak etanol daun meniran dengan konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%.

Ekstrak pekat diencerkan menggunakan pelarut etanol 96% dengan rumus % b/v untuk menghasilkan variasi konsentrasi ekstrak 20%, 40%, 60%, dan 80%. Jumlah ekstrak pekat yang dibutuhkan pada setiap konsentrasi dengan volume 1 ml tercantum dalam Tabel 3. Setelah menentukan berapa banyak ekstrak yang dibutuhkan pada setiap konsentrasi, ekstrak pekat yang telah dicampur dengan etanol dihomogenkan dan kemudian disimpan.

Table 3
Variasi Konsentrasi

Konsentrasi ekstrak (%)	Massa ekstrak etanol daun meniran 100% (gram)	Volume etanol 96% (ml)
20%	0,20 gram	1 ml
40%	0,40 gram	1 ml
60%	0,60 gram	1 ml
80%	0,80 gram	1 ml

- e. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Dengan menggunakan timbangan analitik, timbang 38 gram bubuk media, lalu larutkan dalam satu liter air suling. Dibutuhkan 19 gram bubuk MHA untuk membuat 500 mililiter media. Hingga semua bubuk larut, larutan media dipanaskan di atas kompor listrik sambil diaduk dengan pengaduk magnetik. Kemudian,

gunakan stik pH untuk mengukur pH larutan, yang pada suhu ruang seharusnya antara 7,2 dan 7,4. Setelah itu, media diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C untuk mensterilkannya. Setelah disterilkan, media dikeluarkan dan dibiarkan dingin selama beberapa menit hingga suhunya mencapai antara 40 dan 45 derajat Celcius. Setelah suhu media berada dalam kisaran tersebut, media dipindahkan ke cawan petri sebanyak ± 25 ml dan dibiarkan mengeras.

f. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Biakan bakteri diambil 2 ose bakteri *Staphylococcus aureus*, lalu koloni bakteri uji disuspensikan dalam 5 ml natrium klorida (NaCl) 0,9% ke tabung reaksi steril dan dihomogenkan menggunakan vortex. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya kekeruhan dibandingkan dengan *McFarland Densitometer*.

g. Uji daya hambat antibakteri

Setelah pembuatan suspense, celupkan lidi kapas steril ke dalam suspense *Staphylococcus aureus* 0,5 Mac Farland dan diamkan hingga terlapisi dengan sempurna. Inokulasi suspense bakteri dengan menggoreskan lidi kapas secara merata pada media MHA, putar media sebesar 60° dan lakukan penggoresan sebanyak dua kali untuk memastikan distribusi merata dan pada bagian akhir usap bagian tepi media secara menyeluruh. Biarkan media terbuka selama 3-5 menit sebelum cakram disk diletakkan agar kelembaban yang berlebih terserap. Letakkan cakram disk yang sudah terendam ekstrak etanol daun meniran dengan konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80% pada permukaan media MHA dengan memperkirakan jarak antar cakram minimal 24 mm, setelah itu tekan cakram disk agar kontak optimal dengan media. Cakram antibiotik kloramfenikol yang digunakan sebagai kontrol positif diletakkan pada media MHA yang berbeda dari

kelompok perlakuan. Begitupun dengan kontrol negatif yang diletakkan pada media MHA yang berbeda. Media yang sudah diisi atau terpasang cakram diinkubasi dengan posisi terbalik pada incubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi dilakukan, aktivitas hambat ekstrak daun meniran diamati dengan cara mengukur zona yang menghambat pertumbuhan atau perkembangan *Staphylococcus aureus* pada media. Gunakan jangka sorong untuk melakukan pengukuran, pengukuran dilakukan dengan mengukur dari ujung ke ujung area hambatan (Qamariah dkk., 2018).

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Informasi yang dikumpulkan dari penelitian tentang seberapa baik ekstrak daun meniran menghambat perkembangan bakteri *Staphylococcus aureus* akan didokumentasikan, diklasifikasikan, dan ditampilkan dalam bentuk tabel. Perangkat lunak *Statistical Program for Social Science* (SPSS) selanjutnya akan digunakan untuk melakukan analisis statistik pada data tersebut.

2. Analisis data

Data yang dikumpulkan, termasuk pengolahan, penyajian, dan perhitungannya, akan dianalisis secara kuantitatif. Dengan bantuan perangkat lunak SPSS, analisis statistik digunakan untuk pengujian hipotesis. Hipotesis nol (H_0), yang menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan pada berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hipotesis alternatif (H_1) terdapat perbedaan pada berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Uji Shapiro-Wilk digunakan untuk melakukan uji normalitas. Uji homogenitas dilakukan untuk memastikan data seragam. Data

diperiksa homogenitas dan normalitasnya menggunakan uji ANOVA Satu Arah. Tujuan uji ini adalah untuk memastikan bagaimana luas zona inhibisi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dipengaruhi oleh berbagai jumlah ekstrak etanol daun meniran. Untuk mengidentifikasi apakah kelompok memiliki perbedaan yang signifikan, uji lebih lanjut seperti uji LSD dijalankan jika hasil uji ANOVA Satu Arah menunjukkan perbedaan yang signifikan (Auliya dkk., 2020).

G. Etika Penelitian

Penelitian yang dilakukan harus mematuhi prinsip etika yang berlaku. Pada setiap tahap penelitian prinsip-prinsip etika tersebut harus diterapkan, mulai dari penyusunan hingga penelitiannya selesai (Masturoh & Anggita T, 2018). Penelitian laboratorium tetap harus memperhatikan prinsip etika penelitian meskipun tidak melibatkan subjek manusia secara langsung. Dalam penelitian mikrobiologi, penggunaan bakteri uji harus dilakukan sesuai prosedur *biosafety* laboratorium untuk mencegah kontaminasi dan penyebaran mikroorganisme. Selain itu, seluruh proses penelitian harus dilakukan berdasarkan prinsip integritas ilmiah seperti tidak melakukan manipulasi data, pencatatan hasil dilakukan secara objektif, serta penggunaan metode yang sesuai standar laboratorium. Penelitian dilakukan dengan memperhatikan prosedur keselamatan kerja laboratorium, penggunaan alat pelindung diri (APD), sterilisasi alat dan bahan, serta pengelolaan limbah biologis sesuai prosedur laboratorium mikrobiologi. Selain itu, penelitian ini tidak melibatkan manusia maupun hewan coba sehingga tidak memerlukan informed consent, namun tetap mengacu pada prinsip etika penelitian kesehatan berupa kejujuran ilmiah, keamanan kerja laboratorium, dan tanggung jawab terhadap hasil penelitian yang diperoleh (Sebayang dkk., 2025).