

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *True Experimental* dengan rancangan *Posttest Only Control Design*, yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkannya dengan kelompok kontrol. Desain penelitian ini memiliki tingkat validitas internal yang tinggi karena peneliti mampu mengendalikan variabel luar yang berpotensi memengaruhi jalannya penelitian (Sugiyono, 2019). Rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut:

Tabel 2
Desain Penelitian *Posttest Only Control Group Design*

	Perlakuan	Post Test
R	X ₁	O ₁
	X ₂	O ₂
	X ₃	O ₃
	X ₄	O ₄
	X ₅	O ₅

Keterangan:

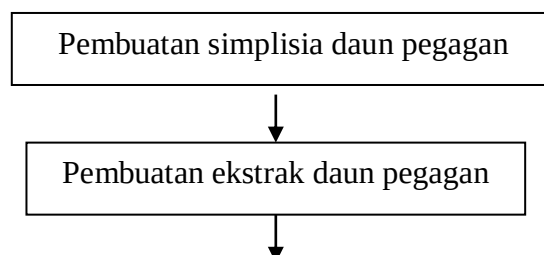
- R : Randomisasi penempatan sampel pada kelompok eksperimen dan kelompok kontrol uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* berdasarkan perbedaan pelarut ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* L.).
- X1 : Perlakuan pada kelompok eksperimen berupa ekstraksi simplisia daun pegagan dengan etanol 96%.
- X2 : Perlakuan pada kelompok eksperimen berupa ekstraksi simplisia daun

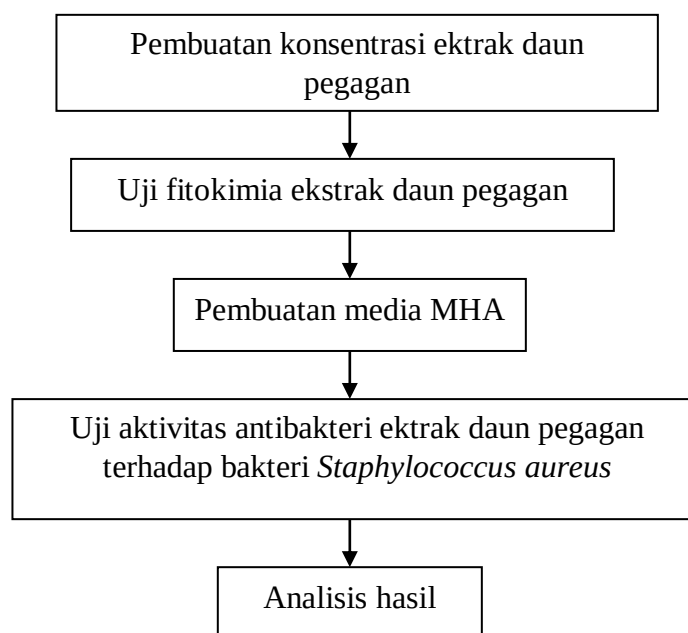
pegagan dengan etil asetat.

- X3 : Perlakuan pada kelompok eksperimen berupa ekstraksi simplisia daun pegagan dengan n-heksana.
- X4 : Kontrol positif menggunakan cakram disk berisi kloramfenikol.
- X5 : Kontrol negatif berupa cakram disk yang ditetesi aquades.
- O1 : Hasil pengukuran zona hambat *Staphylococcus aureus* dari ekstrak etanol 96% daun pegagan.
- O2 : Hasil pengukuran zona hambat *Staphylococcus aureus* dari ekstrak etil asetat daun pegagan.
- O3 : Hasil pengukuran zona hambat *Staphylococcus aureus* dari ekstrak n-heksana daun pegagan.
- O4 : Hasil pengukuran zona hambat dari kontrol positif (kloramfenikol).
- O5 : Hasil pengukuran zona hambat dari kontrol negatif

B. Alur Penelitian

Pada penelitian ini, rangkaian prosedur kerja disusun secara sistematis untuk memperoleh ekstrak daun pegagan yang kemudian diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Proses penelitian dimulai dari pembuatan simplisia hingga tahap pengujian fitokimia dan aktivitas antibakteri. Setiap tahapan dilakukan secara bertahap untuk memastikan mutu ekstrak yang dihasilkan serta validitas hasil pengujian. Adapun alur penelitian yang digunakan dapat dilihat pada gambar berikut.





Gambar 3. Alur Kerja Uji Aktivitas Antibakteri

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar serta Laboratorium Kimia Dasar, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Kegiatan penelitian berlangsung pada periode Februari hingga April 2026.

D. Sampel Penelitian dan Unit Analisis

1. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini berupa ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana. Daun pegagan diperoleh dari perkebunan yang berlokasi di Desa Abianbase, Kecamatan Gianyar, Kabupaten Gianyar. Pengambilan sampel dilakukan dari beberapa tanaman dalam satu area lahan yang sama. Kriteria inklusi meliputi daun

berwarna hijau, berbentuk menyerupai ginjal atau kipas, serta bebas dari jamur. Adapun kriteria eksklusi adalah daun yang layu, tidak segar, atau berwarna kuning sehingga tidak sesuai dengan ketentuan penelitian.

2. Besar sampel penelitian

Besar sampel dalam penelitian ini adalah daun pegagan dengan konsentrasi awal 100% yang digunakan sebagai stok sampel. Setiap ekstrak kemudian diuji pada konsentrasi 50% (b/v), yang diperoleh dengan mengencerkan stok menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana. Pada konsentrasi tersebut, massa ekstrak yang dipakai adalah 0,5 gram untuk masing-masing pelarut, sehingga total kebutuhan ekstrak adalah 0,5 gram etanol 96%, 0,5 gram etil asetat, dan 0,5 gram n-heksana. Kontrol positif yang digunakan berupa antibiotik kloramfenikol, sedangkan kontrol negatif menggunakan aquades.

Jumlah pengulangan ditentukan berdasarkan variasi konsentrasi serta jumlah kelompok kontrol (Hanafiah, 2016). Penelitian ini terdiri atas tiga kelompok perlakuan ekstrak daun pegagan dengan pelarut berbeda, satu kelompok perlakuan kontrol positif, dan satu kelompok kontrol negatif. Dengan demikian jumlah perlakuan (t) adalah lima. Berdasarkan perhitungan dengan rumus Federer, jumlah ulangan minimal adalah lima kali, dengan perhitungan sebagai berikut : :

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

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

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75$$

$$r = 5 \text{ (dibulatkan)}$$

Keterangan :

r = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa jumlah ulangan dalam penelitian ini minimal adalah lima kali. Menurut Hanafiah (2016), banyaknya pengulangan suatu perlakuan ditentukan oleh tingkat ketelitian yang ingin dicapai peneliti dalam menarik kesimpulan. Semakin besar jumlah ulangan, maka semakin tinggi pula ketelitian hasil penelitian. Dengan pertimbangan tersebut, penelitian ini menggunakan lima kali ulangan, sehingga total sampel yang diperiksa pada setiap jenis pelarut adalah 25.

3. Teknik pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan metode *purposive sampling*, yaitu pemilihan sampel berdasarkan kriteria tertentu yang telah ditetapkan peneliti.

4. Kriteria Sampel

Adapun kriteria inklusi dan eksklusi pada penelitian ini adalah :

a. Kriteria inklusi

Sampel berupa daun pegagan (*Centella asiatica L.*) yang tumbuh di wilayah Desa Abianbase, Gianyar yang memenuhi kriteria daun berwarna hijau merata tanpa bercak coklat atau kuning. Tidak menunjukkan tanda kerusakan fisik seperti sobek atau berlubang. Dipanen dalam waktu ≤ 24 jam sebelum

proses pengeringan, dipetik pada pagi hari dari pukul 08.00-11.00 WITA. Dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan sebelum digunakan.

b. Kriteria eksklusi

Daun pegagan yang memiliki perubahan warna, bau tidak norma (menyimpang dari bau daun segar, asam), tekstur berlendir, atau terkontaminasi jamur serta daun yang disimpan lebih dari 24 jam pada suhu ruang sebelum proses pengeringan tidak digunakan sebagai sampel.

5. Unit analisis

Unit analisis yang diamati adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada ekstrak daun pegagan konsentrasi 50% dalam masing-masing pelarut. Pemilihan konsentrasi dan jenis pelarut ini bertujuan untuk menentukan pelarut yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi blender, tabung vial, tempayan, neraca analitik, pipet ukur (1 ml dan 10 ml), mikropipet (20 µl–1000 µl), *ball pipet*, gelas ukur 250 ml, labu ukur 50 ml, evaporator, gelas beker 500 ml dan 1000 ml, erlenmeyer 250 ml dan 500 ml, tabung reaksi beserta raknya, ose, *hotplate*, *magnetic stirrer*, cawan petri steril, *biosafety cabinet*, densitometer, jangka sorong, inkubator, oven, serta autoklaf.

2. Bahan

Bahan yang digunakan antara lain daun pegagan sebanyak 1 kg, aquadest steril 1000 ml, bakteri *Staphylococcus aureus*, media MHA, standar McFarland

0,5%, larutan NaCl fisiologis 0,9%, cakram kosong, cakram antibiotik kloramfenikol, kertas saring, lidi kapas steril, etanol 96% sebanyak 2000 ml, etil asetat 2000 ml, n-heksana 2000 ml, aluminium foil, dan kapas berlemak.

F. Prosedur Kerja

1. Pembuatan simplisia daun pegagan

Daun pegagan dipetik dari perkebunan yang berlokasi di Desa Abianbase, Kecamatan Gianyar, Kabupaten Gianyar. Daun yang digunakan adalah daun berwarna hijau, berbentuk menyerupai ginjal atau kipas, serta bebas dari jamur.

Sebanyak 3 kg daun pegagan yang memenuhi kriteria dicuci, ditiriskan, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C. Setelah kering, daun dihaluskan menggunakan blender kemudian diayak hingga diperoleh serbuk halus. Serbuk inilah yang digunakan sebagai bahan penelitian. Selanjutnya, kadar air simplisia diukur dengan standar kadar air simplisia kurang dari 10%.

2. Pembuatan ekstrak daun pegagan

Ekstraksi daun pegagan (*Centella asiatica L.*) dilakukan dengan metode evaporasi yang dimodifikasi menggunakan rotary evaporator sesuai (Anjani, 2025).

- a. Simplisia daun pegagan ditimbang sebanyak 450 g, lalu dibagi ke dalam tiga gelas beker masing-masing berisi 150 g.
- b. Ditambahkan 750 ml etanol 96% pada beker pertama, 750 ml etil asetat pada beker kedua, dan 750 ml n-heksana pada beker ketiga. Setiap wadah ditutup aluminium foil, diinkubasi selama 24 jam, serta diaduk setiap 8 jam sekali. Proses ini dilakukan dengan perlindungan dari paparan sinar matahari, dan meserasi diulangi sebanyak tiga kali untuk masing-masing pelarut.

- c. Filtrat hasil meserasi kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40–60°C hingga diperoleh ekstrak kental dengan konsentrasi 100%.
- d. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang menggunakan neraca analitik untuk mengetahui total massanya.
- e. Selanjutnya dilakukan perhitungan rendemen ekstrak sebagai indikator jumlah kandungan bioaktif, dengan kriteria baik jika hasilnya lebih dari 10%.

3. Pembuatan konsentrasi ekstrak daun pegagan

- a. Ekstrak daun pegagan digunakan pada konsentrasi 50%. Penelitian oleh Anjani (2025) menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut ekstrak mampu menghambat pertumbuhan bakteri.
- b. Pengenceran dilakukan menggunakan microtube serta micropipet. Variasi konsentrasi dihitung berdasarkan persentase %b/v menggunakan rumus yang telah ditetapkan.

$$\% \frac{b}{v} \times 100$$

Keterangan :

% : variase konsentrasi dalam satuan persen

b : massa ekstrak daun pegagan

v : volume pengenceran

- c. Dari hasil perhitungan, diperoleh bahwa pada konsentrasi 50% dibutuhkan 0,5 gram ekstrak yang kemudian diencerkan dengan masing-masing pelarut hingga mencapai volume 1000 µl.
- d. Campuran kemudian dihomogenkan dan disimpan dalam labu ukur.

4. Uji skrining fitokimia ekstrak daun pegagan

- a. Uji alkaloid: 2 ml ekstrak konsentrasi 20% ditambahkan amonia, H_2SO_4 2N, lalu 1 ml pereaksi Dragendorff.
- b. Uji flavonoid: 1 ml ekstrak diencerkan, ditambah 2 ml NaOH 2% dan beberapa tetes HCl.
- c. Uji tanin: 1,6 ml ekstrak diencerkan, kemudian ditambah 3 tetes FeCl_3 dan dihomogenkan.
- d. Uji terpenoid: 5 ml ekstrak diencerkan dicampur dengan 2 ml kloroform, diuapkan di waterbath, lalu ditambahkan 3 ml H_2SO_4 pekat dan dipanaskan kembali.
- e. Uji saponin: 2 ml ekstrak diencerkan, ditambah 2 ml aquadest, dikocok kuat selama 5 menit untuk mengamati busa. Setelah itu ditambahkan 1 tetes HCl 2N.

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

- a. Untuk 10 cawan, ditimbang bubuk MHA 9,5 g dan dilarutkan dengan 250 ml aquadest (mengacu pada etiket 38 g/L).
- b. Larutan dipanaskan sambil diaduk hingga homogen.
- c. pH media diukur menggunakan stik pH ($7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C).
- d. Erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan aluminium foil.
- e. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit setelah suhu tercapai.
- f. Setelah sterilisasi, media didinginkan hingga $40\text{--}50^\circ\text{C}$.
- g. Dituang ke dalam cawan petri masing-masing 25 ml dan dibiarkan memadat.

- h. Setelah memadat, cawan dibalik. Media yang tidak langsung digunakan atau sisanya disimpan dalam kulkas dengan dibungkus kertas buram.

6. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

- a. Koloni bakteri dari biakan murni disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 ml NaCl fisiologis 0,9%.
- b. Kekeruhan disesuaikan dengan standar McFarland 0,5.
- c. Kepadatan sel diukur dengan densitometer McFarland.

7. Uji aktivitas antibakteri (Anggraini *et al.*, 2019)

- a. Sampel ekstrak daun pegagan 50% dengan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana disiapkan.
- b. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* setara 0,5 McFarland digoreskan zig-zag pada cawan MHA dan dibiarkan 5 menit.
- c. *Paper disk* berdiameter 6 mm ditetaskan 20 µl ekstrak hingga meresap.
- d. *Disk* yang sudah jenuh ekstrak ditempelkan pada media MHA yang telah diinokulasi bakteri.
- e. Kontrol positif (kloramfenikol) dan negatif (pelarut) juga ditempelkan pada media.
- f. Inkubasi dilakukan 24 jam pada suhu 37°C dalam posisi terbalik dengan wadah tertutup kertas buram.
- g. Zona bening di sekitar disk diukur menggunakan jangka sorong dari tepi ke tepi melewati pusat disk, lalu hasilnya dinyatakan dalam mm untuk setiap perlakuan dan kontrol.

8. Pelaporan hasil

Hasil pengamatan disajikan dengan cara mengukur diameter zona hambat

dari sisi terluar ke sisi terluar yang melewati pusat cakram pada setiap konsentrasi, serta pada kontrol positif dan negatif, menggunakan jangka sorong. Nilai yang diperoleh kemudian dikonversi ke dalam satuan milimeter (mm).

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari data primer dan sekunder. Menurut (Sugiyono, 2019), data primer adalah data yang diperoleh langsung melalui pengamatan oleh peneliti. Dalam penelitian ini, data primer berupa hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada berbagai jenis pelarut ekstrak daun pegagan dengan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana. Sedangkan data sekunder diperoleh dari artikel, jurnal, buku, maupun sumber pendukung lainnya.

2. Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan dengan metode observasi, yaitu mengukur diameter zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada variasi jenis pelarut ekstrak daun pegagan. Hasil pengukuran dinyatakan dalam satuan milimeter (mm) sebagai indikator adanya aktivitas antibakteri.

H. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri ekstrak daun pegagan 20% dengan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana diolah secara tabulasi serta dijelaskan secara naratif.

2. Analisis data

Analisis dilakukan secara kuantitatif dengan bantuan perangkat lunak statistik

melalui beberapa tahapan:

a. Uji normalitas

Pada tahap ini digunakan uji Shapiro-Wilk untuk mengetahui apakah data hasil penelitian berdistribusi normal atau tidak. Uji ini dipilih karena jumlah sampel yang digunakan kurang dari 50, sehingga lebih sesuai untuk kondisi penelitian ini.

b. Uji perbedaan

Apabila hasil uji normalitas menunjukkan bahwa data berdistribusi normal, maka analisis dilanjutkan dengan menggunakan *One Way ANOVA* untuk menguji perbedaan diameter zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara in vitro pada berbagai variasi pelarut ekstrak daun pegagan dengan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana. Sebaliknya, jika data tidak berdistribusi normal, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok perlakuan.

c. Uji lanjut (*Post Hoc*)

Tahap ini dilakukan apabila hasil uji menunjukkan hipotesis nol ditolak dan hipotesis alternatif diterima. Jika data berdistribusi normal, maka digunakan uji *Tukey* untuk melihat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Namun, apabila data tidak berdistribusi normal, maka digunakan uji *Games-Howell* yang bersifat non-parametrik untuk menguji perbedaan antar kelompok.

I. Etika Penelitian

Dalam penelitian ini diterapkan prinsip etika *beneficence*, yaitu dengan mengupayakan agar penelitian memberikan manfaat ilmiah di bidang kesehatan serta meminimalkan potensi risiko yang dapat timbul selama proses penelitian.

Selain itu, diterapkan pula prinsip *non-maleficence*, yang bertujuan untuk memastikan bahwa seluruh prosedur penelitian tidak menimbulkan dampak merugikan terhadap subjek maupun bahan penelitian, serta memberikan perlindungan dari kemungkinan penyalahgunaan data dan hasil penelitian (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).