

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian True Experimental karena desain ini memungkinkan peneliti mengontrol semua variabel eksternal yang berpeluang memengaruhi jalannya eksperimen (Sugiyono, 2019). Desain penelitian yang diterapkan yaitu *Post-test Only Control Design* dengan rancangan skema sebagai berikut:

Tabel 3
Desain Penelitian *Posttest Only Control Design*

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

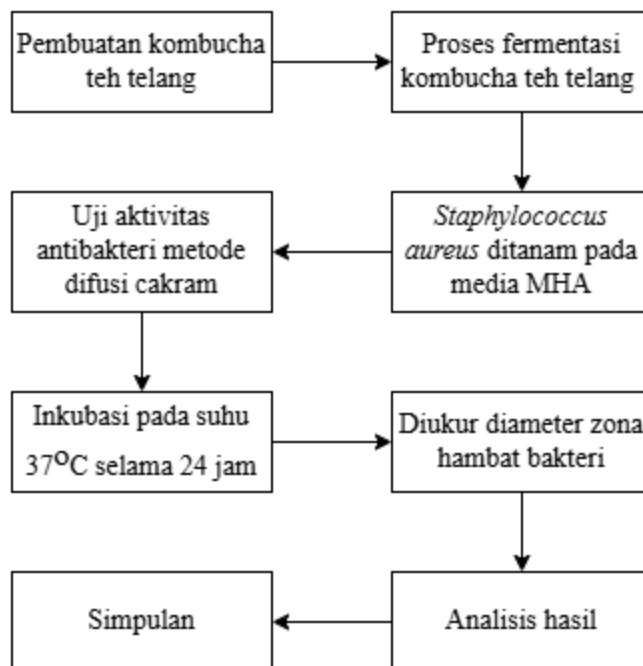
Keterangan:

- R1 (Random 1) :Kelompok eksperimen terdiri dari kombucha bunga telang dengan konsentrasi 100% yang dibandingkan berdasarkan variasi waktu fermentasi yakni hari ke-5, ke-7, k-9, dan ke-11.
- R2 (Random 2) :Kelompok kontrol terdiri atas blank disk yang berfungsi sebagai kontrol negatif dan antibiotik kloramfenikol yang digunakan sebagai kontrol positif.
- X (Exposure) :Intervensi atau perlakuan yang dilakukan.
- O1 (Observasi) :Pengukuran pertama dilaksanakan dengan

mengukur diameter zona hambat pada kelompok perlakuan.

O2 (Observasi) :Pengukuran kedua dilaksanakan dengan mengukur diameter zona hambat pada kelompok kontrol.

B. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu, Poltekkes Kemenkes Denpasar. Proses fermentasi dan pembuatan kombucha dilakukan secara mandiri di rumah.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai bulan April 2026.

D. Sampel Penelitian

1. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang terbentuk di sekeliling sumuran atau kertas cakram yang berisi sampel uji. Zona hambat ini diperoleh dari hasil uji aktivitas antibakteri kombucha bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan variasi lama fermentasi, yakni 5 hari, 7 hari, 9 hari, dan 11 hari, terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Diameter zona hambat yang terukur (mm) menjadi indikator langsung untuk menilai efektivitas antibakteri setiap perlakuan waktu fermentasi.

2. Sampel

Sampel penelitian ini yaitu berupa teh kombucha yang diseduh dari bunga telang (*Clitoria ternatea* L.). Bagian tanaman yang dimanfaatkan secara spesifik yaitu kelopak bunga kering, yang diperoleh dari Anugrah Herbal Bali di Jalan Karang Sari I No. 2, Sanur, Denpasar Selatan, Kota Denpasar, Bali. Kelopak bunga yang sudah dikeringkan tersebut kemudian diolah menjadi teh. Sementara itu, bibit kombucha berupa SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) diperoleh dari IniDya Kombucha di Gang Rambutan No. 5, Sesetan, Denpasar Selatan, Kota Denpasar, Bali. Adapun kriteria sampel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Kriteria inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah teh kombucha yang diseduh dari kelopak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) kering. Sampel teh disiapkan dari bahan baku yang diperoleh dari sumber terpercaya (Anugrah Herbal Bali) dengan proses pengeringan yang jelas. Sampel menggunakan bibit SCOBY yang diperoleh

dari produsen terstandar (IniDya Kombucha) yang bersedia memberikan informasi mengenai usia dan kondisinya.

b. Kriteria eksklusi

Sedangkan kriteria eksklusinya yaitu penggunaan penggunaan kelopak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) kering yang menunjukkan tanda kerusakan, kadaluarsa, atau kontaminasi visual (seperti perubahan warna abnormal atau pertumbuhan jamur). Serta penggunaan bibit SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) yang menunjukkan indikasi kontaminasi atau penurunan viabilitas, yang ditandai dengan perubahan warna (menjadi hitam, hijau, atau oranye), munculnya bau busuk yang menyimpang, atau tekstur yang tidak kenyal (lembek, mudah hancur).

3. Repitasi Pengulangan

Sampel yang digunakan adalah kombucha teh telang yang sudah difermentasi dengan variasi waktu yang berbeda-beda yaitu fermentasi hari ke-5, ke-7, ke-9, dan ke-11. Kontrol positif yang dipakai adalah antibiotik kloramfenikol, sedangkan kontrol negatifnya adalah aquades. Penelitian ini melibatkan 4 kelompok perlakuan. Pengulangan yang dilakukan adalah pengulangan pada uji zona hambat untuk setiap sampel. Untuk pengulangan sampel, rumus yang diterapkan adalah rumus Federer, sebagai berikut:

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

Keterangan :

r = Jumlah pengulangan

t = Jumlah perlakuan

$$\begin{array}{rcl}
(4 - 1) (r - 1) & \geq & 15 \\
(3) (r - 1) & \geq & 15 \\
(r - 1) & \geq & 5 \\
r & \geq & 5 + 1 \\
r & \geq & 6
\end{array}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, diperoleh jumlah ulangan minimal sebanyak 6 kali untuk setiap perlakuan. Oleh karena itu, keempat variasi waktu fermentasi masing-masing akan diuji dalam 6 ulangan. Dengan demikian, total unit percobaan yang dibutuhkan adalah 24 data, yang diperoleh dari perhitungan 4 perlakuan x 6 ulangan.

E. Instrumen penelitian

1. Alat

Alat yang dipakai dalam penelitian ini meliputi neraca analitik (RADWAG AS220.R2), hotplate (JISICO), autoklaf (TOMY SX-500), erlenmeyer (IWAKI), gelas beaker (IWAKI TE-32), inkubator (ESCO Isotherm), densitometer Mc Farland (biosan DEN-1B), Bio Safety Cabinet (BSC-1800 II B2-X), cawan petri, tabung reaksi (IWAKI), rak tabung, lampu spiritus, jangka sorong, magnetic stirrer, batang pengaduk, pipet ukur (IWAKI), ball pipet, ose, pipet tetes, toples kaca, kompor gas, saringan, pinset, serta perlengkapan alat tulis.

2. Bahan

Bahan yang dipakai dalam penelitian ini terdiri dari bunga telang kering, bibit kombucha (SCOBY), gula pasir, air minum, blank disk (OXOID), kultur bakteri *Staphylococcus aureus*, larutan starter kombucha, aquades, media MHA (OXOID), cakram kloramfenikol (OXOID), larutan NaCl fisiologis 0,85%, alkohol 70%,

kapas lidi steril, standar McFarland 0,5%, alat pelindung diri (APD), dan aluminium foil.

3. Prosedur kerja

a. Pelaksanaan protokol kesehatan

Sebelum memulai preparasi sampel, seluruh peneliti diwajibkan mengenakan Alat Pelindung Diri (APD) secara lengkap. Alat pelindung diri (APD) yang digunakan meliputi masker, sarung tangan (handscoon), penutup rambut (haircap), dan jas laboratorium. Setelah APD terpasang dengan benar, dilakukan proses desinfeksi pada permukaan area kerja guna memastikan kondisi yang aseptis..

b. Pembuatan kombucha teh telang

Menurut Kusumaningrum dkk. (2024) prosedur pembuatan kombucha bunga telang yaitu:

- 1) Timbang bunga telang kering (*Clitoria ternatea* L.) sebanyak 10 gram per wadah yang akan dibuat. Untuk pembuatan 4 wadah, timbang total 40 gram bunga telang.
- 2) Rebus bunga telang kering dalam air dengan perbandingan 10 gram bunga telang per 500 ml air. Untuk 4 wadah, rebus 40 gram bunga telang dalam 2000 ml air hingga mendidih.
- 3) Tambahkan gula pasir sebanyak 10% dari volume air (50 gram gula per 500 ml air). Aduk hingga homogen dan biarkan mendidih selama 10 menit.
- 4) Saring larutan untuk memisahkan ampas bunga telang. Biarkan larutan hingga dingin pada suhu ruang (tidak panas).
- 5) Bagi larutan yang telah dingin ke dalam 4 wadah kaca yang sudah dilabeli sesuai dengan proses fermentasi selama beberapa hari, yaitu hari ke-5, 7, 9, dan

11. Masing-masing sebanyak 500 ml per wadah.

- 6) Ditambahkan 10% starter dari volume total per wadah dan mikroorganisme SCOBY dari volume total per wadah lalu ditutup dengan dengan kasa atau tisu.
 - 7) Teh kombucha yang sudah diberi label difermentasi sesuai variasi waktu fermentasi dan dipanen sesuai jangka waktu yang sudah tertera pada label.
- c. Pembuatan media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Prosedur pembuatan media MHA yaitu (Kusumaningrum dkk., 2024):

- 1) Media MHA dibuat dengan cara menimbang bahan media sesuai takaran yang diperlukan.
 - 2) Selanjutnya, ditambahkan aquadest sesuai dengan volume yang diperlukan. Lalu, panaskan hingga mendidih agar semua bahan tercampur sempurna selama 1 menit.
 - 3) Masukkan media atau bahan ke dalam erlenmeyer/botol yang sesuai.
 - 4) Media disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1-2 atm, selama 15 menit.
 - 5) Tunggu hingga media sedikit mendingin, sekitar suhu 40-45°C, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri.
- d. Pembuatan suspensi bakteri

Prosedur pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu (Ramanda dkk., 2026):

- 1) Sejumlah satu ose koloni bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dari biakan murni..
- 2) Koloni bakteri dilarutkan menggunakan NaCl fisiologis 0,85% sebanyak 5 ml.
- 3) Sesuaikan kekeruhan suspensi bakteri dengan membandingkannya secara

visual menggunakan larutan standar McFarland 0,5.

e. Uji antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram dilakukan melalui langkah-langkah berikut (Simanjuntak dkk., 2022):

- 1) Percobaan dengan metode diffuse cakram dikerjakan berdasarkan dengan metode Kirby-Bauer.
- 2) Lidi kapas steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri, lalu goreskan secara merata di atas permukaan media MHA.
- 3) Media yang telah diinokulasi dengan suspensi bakteri dibiarkan selama 4-5 menit agar suspensi tersebut dapat meresap ke dalam media.
- 4) Cakram disk dari setiap kombucha bunga telang yang telah dijenuhkan sesuai lama fermentasi ditempelkan dengan pinset ke media MHA yang sudah diinokulasi, dan tidak boleh digeser setelah diletakkan.
- 5) Tempelkan kontrol positif dan negatif pada media yang telah diinokulasi, di mana media tersebut berbeda dengan media yang digunakan untuk teh kombucha.
- 6) Media yang telah ditemplei cakram disk diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan posisi terbalik.

f. Pelaporan hasil

Hasil observasi dilaporkan berdasarkan pengukuran zona hambat yang terbentuk pada media MHA tempat bakteri *Staphylococcus aureus* ditumbuhkan, menggunakan jangka sorong. Zona hambat (area bening) yang terbentuk di sekeliling cakram kertas diukur diameternya dalam satuan milimeter (mm) (Lesmono dkk., 2025).

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang digunakan yaitu data primer dan data sekunder. Sumber primer adalah sumber data yang memberikan informasi secara langsung kepada peneliti, sedangkan sumber sekunder adalah sumber data yang menyediakan informasi secara tidak langsung, misalnya melalui orang lain atau dokumen yang telah ada (Sugiyono, 2019). Dimana data primer dari penelitian ini adalah zona hambat yang terbentuk pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan sampel fermentasi kombucha teh telang dengan perbedaan waktu fermentasi. Data sekunder dalam penelitian ini meliputi referensi dari jurnal, artikel, buku, dan sumber-sumber lain yang memberikan dukungan.

2. Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dilaksanakan dengan cara mengukur diameter zona hambat yang terbentuk pada media MHA bakteri *Staphylococcus aureus* dari berbagai sampel hasil fermentasi hari ke-5, ke-7, ke-9, dan ke-11 menggunakan jangka sorong.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Diameter zona hambat yang terbentuk dari hasil uji aktivitas antibakteri kombucha teh bunga telang terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* diukur dalam satuan milimeter (mm) untuk setiap variasi lama fermentasi. Pengolahan data dilakukan secara deskriptif, dan temuan tersebut disajikan dalam bentuk tabel atau kolom untuk memudahkan pembacaan dan interpretasi.

2. Analisis data

Data kuantitatif kajian ini dianalisis dengan uji statistik berbantuan perangkat lunak komputer. Analisis meliputi pengolahan, penyajian, perhitungan statistik deskriptif, serta uji statistik inferensial untuk menguji hipotesis (Amruddin dkk., 2022). Proses analisis data dilaksanakan melalui beberapa tahapan, antara lain:

a. Uji normalitas

Uji normalitas dilaksanakan untuk memverifikasi apakah sebaran data mengikuti pola distribusi normal. Dalam hal ini, metode Saphiro-Wilk diterapkan sebagai alat uji

b. Uji *Levene's test*

Uji homogenitas dilakukan dengan metode *Levene's Test* bertujuan untuk mengetahui apakah varians antar kelompok memiliki kesamaan

c. Uji One-Way ANOVA

Uji One-Way ANOVA, yang dilaksanakan setelah dipastikannya normalitas data, digunakan untuk menguji apakah terdapat perbedaan yang signifikan pada diameter zona hambat yang dihasilkan oleh berbagai variasi lama fermentasi kombucha bunga telang terhadap *Staphylococcus aureus*.

d. Uji Kruskal-Wallis

Apabila data tidak berdistribusi normal, analisis statistik dilakukan dengan menggunakan Uji Kruskal-Wallis, yaitu sebuah prosedur nonparametrik. Penerapan uji ini ditujukan untuk menguji ada tidaknya perbedaan yang bermakna pada zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* akibat variasi durasi fermentasi kombucha teh bunga telang.

e. Hipotesis statistik

H₀ : Tidak terdapat perbedaan aktivitas antibakteri kombucha bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) berdasarkan variasi waktu fermentasi (hari ke-5, 7, 9, dan 11) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

H_a : Terdapat perbedaan aktivitas antibakteri kombucha bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) berdasarkan variasi waktu fermentasi (hari ke-5, 7, 9, dan 11) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Berdasarkan hipotesis H_a dan H₀ serta hasil uji statistik, maka akan diambil keputusan H_a diterima dan H₀ ditolak jika $p\text{-value} \leq 0,05$, yang artinya terdapat perbedaan aktivitas antibakteri kombucha bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) berdasarkan variasi waktu fermentasi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Namun, jika $p\text{-value} \geq 0,05$, maka H₀ diterima dan H_a ditolak yang menunjukkan tidak terdapat perbedaan aktivitas antibakteri kombucha bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) berdasarkan variasi waktu fermentasi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

f. Uji Least Significant Difference

Uji Least Significant Difference (LSD) dilakukan sebagai analisis *post-hoc* untuk mengidentifikasi pasangan kelompok mana saja yang menunjukkan perbedaan signifikan terkait zona hambat yang dihasilkan oleh tiap variasi waktu fermentasi kombucha teh telang.

H. Etika Penelitian

Prinsip-prinsip etika menuntut peneliti untuk berperilaku sesuai norma moral selama menjalankan penelitian, mulai dari persiapan, pengambilan data, analisis, hingga penyampaian hasil kepada publik (Sibarani dan Albina, 2025).

Penelitian dilaksanakan dengan berpegang teguh pada prinsip etika penelitian ilmiah yang berlaku, meliputi:

1. *Beneficence*

Prinsip berbuat baik (*beneficence*) menekankan bahwa penelitian harus memberikan manfaat sebesar-besarnya.

2. *Non-maleficence*

Prinsip tidak merugikan (*non-maleficence*) menuntut peneliti untuk meminimalkan segala bentuk risiko dan dampak negatif.

3. *Justice*

Prinsip keadilan (*justice*) menekankan distribusi manfaat dan beban penelitian secara adil.