

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan *true experimental* dengan *posttest-only control group design*. Sampel dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, yang masing-masing ditentukan secara acak (R). Kelompok eksperimen diberikan perlakuan berupa ekstrak bunga gemitir dengan berbagai konsentrasi (X), sedangkan kelompok kontrol tidak menerima perlakuan. Setelah perlakuan, kedua kelompok dilakukan posttest berupa pengukuran diameter zona hambat (O₁ dan O₂), kemudian hasilnya dibandingkan untuk melihat pengaruh perlakuan yang diberikan (Morgan & Renbarger, 2018).

Tabel 3
Bentuk Rancangan Penelitian

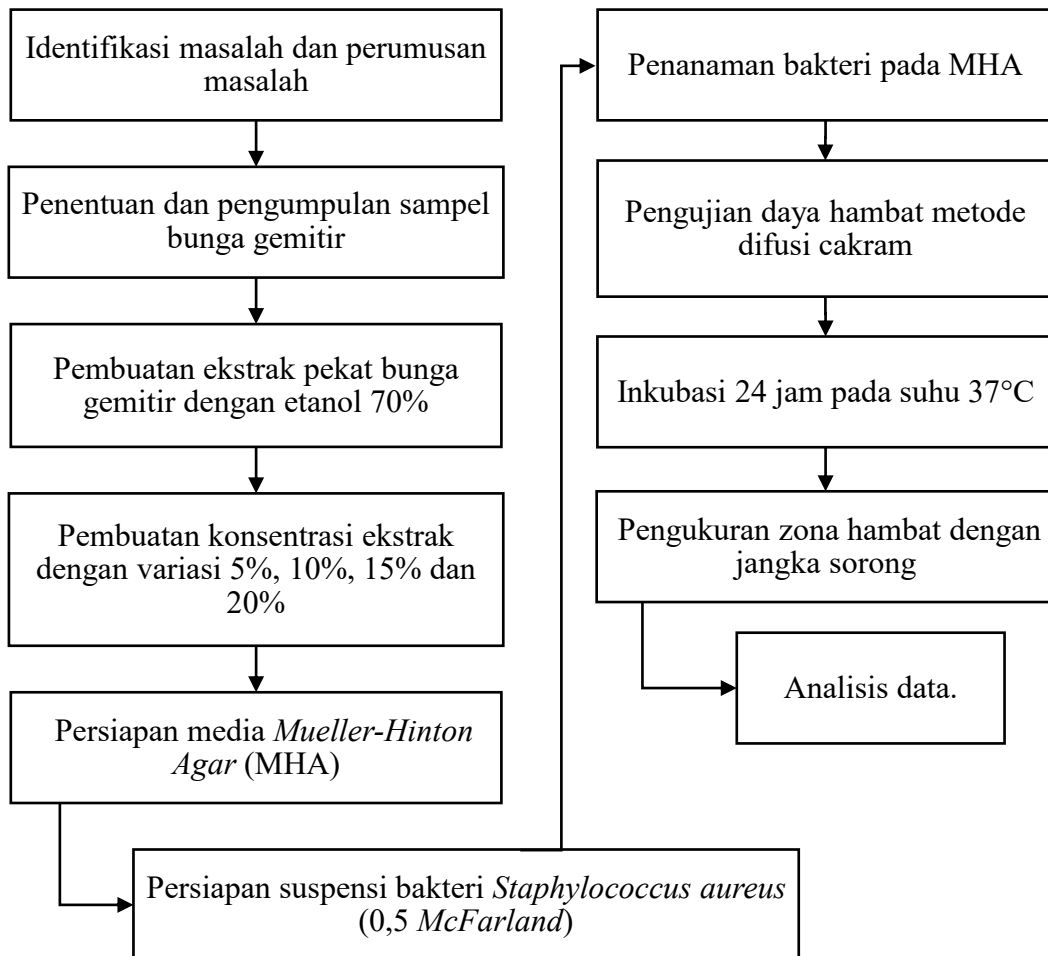
	Kelompok	Perlakuan	Posttest
R ₁	Eksperimen	X	O ₁
R ₂	Kontrol	-	O ₂

Keterangan:

1. R₁ (Random 1): Kelompok eksperimen, dalam penelitian ini merupakan sejumlah konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20% dari ekstrak etanol bunga gemitir (*Tagetes erecta* Linn.).
2. R₂ (Random 2): Kelompok kontrol meliputi etanol 70% sebagai kontrol negatif dan antibiotik kloramfenikol 30 µg sebagai kontrol positif.
3. X (Exposure): Perlakuan ekstrak etanol bunga gemitir (*Tagetes erecta* Linn.)
4. O₁ dan O₂ (Observasi): Diameter area zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

B. Alur Penelitian

Alur Penelitian pada penelitian ini sesuai dengan bagan dibawah ini:



Gambar 5 Alur Kerja Uji Daya Hambat

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar yang berlokasi di Jl. Pulau Moyo No. 33 A, Pedungan, Denpasar Selatan, Kota Denpasar, Bali untuk uji daya hambat serta di Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO) yang beralamat di Jl. Denpasar-Singaraja, Baturiti, Kec. Baturiti, Kabupaten Tabanan, Bali untuk pembuatan simplisia

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2026 hingga bulan April 2026.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Unit analisis pada penelitian ini berupa diameter zona hambat ekstrak bunga gemitir terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20%.

2. Sampel penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel berupa ekstrak bunga gemitir (*Tagetes erecta* Linn.) yang diperoleh dari tanaman bunga gemitir yang berasal dari perkebunan Desa Tembuku, Kecamatan Tembuku, Kabupaten Bangli, Provinsi Bali. Bunga gemitir diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi, kemudian hasil ekstraksi diuapkan hingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak tersebut selanjutnya dibuat dalam beberapa variasi konsentrasi, yaitu 5%, 10%, 15% dan 20%.

3. Jumlah dan besar sampel

Sampel penelitian terdiri atas bahan uji berupa ekstrak bunga gemitir (*Tagetes erecta* Linn.) dan objek penelitian berupa isolat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pengujian daya hambat bunga gemitir menggunakan ekstrak pekat yang kemudian diencerkan dengan etanol 70% dalam perbandingan tertentu untuk menghasilkan variasi konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20%. Kelompok kontrol yang digunakan adalah kontrol negatif (etanol 70%), ini dilakukan untuk memastikan bahwa daya hambat yang diamati berasal dari ekstrak, bukan dari pelarut. sedangkan kontrol positif menggunakan cakram antibiotik kloramfenikol 30 µg,

karena antibiotik tersebut telah terbukti efektif terhadap *Staphylococcus aureus* dan umum digunakan sebagai standar dalam uji sensitivitas.

Berdasarkan rancangan penelitian tersebut, penelitian ini terdiri atas empat perlakuan pada kelompok eksperimen dan dua perlakuan pada kelompok kontrol. Jumlah ulangan pada masing-masing perlakuan ditentukan menggunakan rumus *Federer* (Mushlih & Rosyidah, 2020) sebagai berikut:

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

Keterangan:

r = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

Dimana:

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

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 15+5$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Jumlah ulangan pada penelitian ini ditetapkan sebanyak empat kali berdasarkan hasil perhitungan yang telah dilakukan diatas. Oleh karena itu, setiap perlakuan pada konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20% diberikan empat ulangan, begitu pula pada kontrol positif dan kontrol negatif yang masing-masing dilakukan empat kali pengulangan, sehingga diperoleh total 16 data dari kelompok perlakuan dan 8 data dari kelompok kontrol.

Kriteria sampel yang dijadikan untuk bahan ekstraksi etanol bunga gemitir, sebagai berikut:

a. Kriteria inklusi

- 1) Bunga gemitir mekar sempurna, segar, tidak layu maupun busuk.
- 2) Berwarna kuning-oranye cerah.
- 3) Tidak terkontaminasi oleh jamur dan serangga

b. Kriteria eksklusi

- 1) Bunga dengan cacat atau tidak utuh.
- 2) Bunga yang diambil dari luar area penelitian yang telah ditetapkan.



Gambar 6 Sampel Bunga Gemitir (*Tagetes erecta* L)

4. Teknik pengambilan sampel

Metode pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *purposive sampling*. *Purposive sampling* adalah teknik yang melibatkan sampel yang relevan dengan tujuan penelitian dan memiliki karakteristik tertentu. Karakteristik khusus tersebut ditetapkan berdasarkan kebijakan peneliti (Asrulla dkk., 2023).

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Data penelitian terdiri atas data primer dan data sekunder. Data primer diperoleh melalui eksperimen laboratorium dengan mengukur diameter zona hambat pada media MHA setelah pemberian disk berisi ekstrak etanol bunga gemitir terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Sementara itu, data sekunder diperoleh dari berbagai sumber kepustakaan seperti jurnal ilmiah, hasil penelitian terdahulu, serta referensi lain yang relevan dengan topik penelitian.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini adalah pengukuran zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yang dihasilkan oleh ekstrak bunga gemitir dalam konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20%. Hasil pengukuran tersebut dilaporkan dalam satuan millimeter (mm).

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen penelitian yang dimanfaatkan peneliti untuk memperoleh data hasil penelitian yaitu jangka sorong, alat tulis, kamera serta alat laboratorium dasar.

F. Alat, Bahan dan Prosedur Kerja

1. Alat

Alat dalam penelitian ini yaitu toples kaca, pipet ukur, mikropipet, pipet tetes, neraca analitik, ball pipet, tabung sampel cup, beaker glass, gelas ukur, erlenmeyer, batang pengaduk, lampu spritus, tabung reaksi, hotplate, rak tabung reaksi,, magnetic stirrer, korek api, corong, cawan petri, biosafety cabinet, jangka sorong, *McFarland* densitometer, ose steril, vortex, incubator, autoclave dan refrigerator.

2. Bahan

Bahan dalam penelitian ini adalah ekstrak bunga gemitir, akuades, etanol 70%, isolat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cakram antibiotik kloramfenikol 30 µg, cakram kosong, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), NaCl 0,9%, cotton swab, yellow tip, bluetip, kapas, kertas saring, aluminium foil.

3. Prosedur kerja

Prosedur kerja pada penelitian ini, dilakukan dengan:

a. Pelaksaaan protokol kesehatan

Setiap akan melakukan kegiatan di laboratorium, gunakan alat pelindung diri (APD) dan melakukan disinfeksi pada area kerja dengan alkohol 70% untuk menghindari kontaminasi.

b. Pengambilan sampel

Sampel bunga gemitir (*Tagetes erecta* Linn.) dipilih mengacu pada kriteria sampel yang sudah ditetapkan sebelum penelitian dilaksanakan. Jumlah bahan segar penelitian ini mencapai $\pm 4,2$ kg untuk memperoleh ekstrak dalam jumlah yang memadai.

c. Pembuatan simplisia bunga gemitir (*Tagetes erecta* Linn.).

- 1) Sebanyak 4,2 kg bunga gemitir segar diambil, kemudian dilakukan sortasi basah diikuti pencucian secara singkat menggunakan aliran air untuk membersihkan kotoran.
- 2) Bahan selanjutnya dirajang dan dikeringkan tanpa terkena cahaya matahari langsung sampai kadar air menyusut <30%, kemudian dilanjutkan pengeringan pada oven bersuhu 40-50°C hingga kadar air menyusut <10%.

- 3) Simplisia kemudian ditimbang untuk menghitung % rendemen bobot simplisia, diblender hingga menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan 60 mesh untuk memperoleh serbuk simplisia yang homogen.

d. Pembuatan ekstrak pekat bunga gemitir (*Tagetes erecta* Linn.)

Ekstraksi serbuk simplisia bunga gemitir dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% berdasarkan prosedur Rahmani dkk. (2023).

- 1) Sebanyak 100 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 1 liter etanol 70% (perbandingan bahan : pelarut 1:10) dalam toples kaca.
- 2) Proses maserasi dilaksanakan selama 3×24 jam pada suhu ruang. Selama proses tersebut, pelarut diganti setiap 24 jam dan dilakukan pengadukan pada 6 jam pertama.
- 3) Filtrat hasil maserasi disaring, lalu diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental.
- 4) Tentukan bobot ekstrak kental dengan menimbang hasil tersebut.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

e. Sterilisasi alat

- 1) Semua alat dicuci, dibilas dan dikeringkan.
- 2) Alat dibungkus dengan aluminium foil dan plastik.
- 3) Disterilkan menggunakan autoclave pada 121°C selama 15 menit.

f. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak bunga gemitir (*Tagetes erecta* Linn.)

- 1) Konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20% masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara penimbangan ekstrak pekat bunga gemitir (*Tagetes erecta* Linn.) dengan pelarut etanol 70%.

- 2) Untuk membuat seri konsentrasi ekstrak bunga gemitir dibuat dengan menimbang ekstrak pekat sesuai dengan perhitungan yang ditentukan melalui rumus berikut :

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

Keterangan :

M_1 : Molaritas sebelum pengenceran (%)

M_2 : Molaritas setelah pengenceran (%)

V_1 : Volume sebelum pengenceran (ml)

V_2 : Volume setelah pengenceran (ml)

Massa ekstrak bunga gemitir dan massa pelarut yang akan digunakan dalam pembuatan konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20% disajikan dalam tabel berikut:

Tabel 4
Variasi Konsentrasi Ekstrak Bunga Gemitir

Konsentrasi (%)	Ekstrak Bunga Gemitir (gram)	Etanol 70% (µl)	Total volume (ml)
5%	0,05	950	1
10%	0,10	900	1
15%	0,15	850	1
20%	0,20	800	1

- 3) Campur pada masing-masing konsentrasi dan dihomogenkan.
- g. Pembuatan media MHA (*Mueller Hinton Agar*) (Thermo Fisher Scientific, 2021).
- 1) Seberat 9,5 gram serbuk media MHA (CM0337) dimasukkan ke dalam erlenmayer dan tambahkan 250 ml aquades.
 - 2) Larutkan media MHA ke dalam aquades pada suhu 80°C diatas hotplate dan

diaduk menggunakan magnetic stirrer hingga homogen.

- 3) Kemudian cek pH media dengan menggunakan kertas pH. Media MHA harus memiliki pH $7,3 \pm 0,1$ pada suhu ruang (25 °C).
- 4) Kapas disumbat pada mulut erlenmayer lalu ditutup dengan kasa dan kertas. Sterilkan didalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 2 atm.
- 5) Diamkan hingga suhu media menjadi 50°C
- 6) Tuangkan media cair sebanyak 25 ml ke dalam cawan petri dan biarkan hingga memadat.

h. Subkultur bakteri *Staphylococcus aureus*

- 1) Persiapkan meja kerja secara aseptis untuk memastikan tidak terjadi kontaminasi.
- 2) Ambil beberapa koloni bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 3) Goreskan pada media MHA dengan ose disposable (streak 4 kuadran) secara aseptis.
- 4) Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

i. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* (Hainil dkk., 2022)

- 1) Persiapkan meja kerja secara aseptis untuk memastikan tidak terjadi kontaminasi.
- 2) Ambil biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan ose steril.
- 3) Cuplikan bakteri disuspensikan ke dalam tabung reaksi 5 ml NaCl 0,9%.
- 4) Homogenkan hingga terbentuk kekeruhan yang setara dengan 0,5% dari standar *McFarland*. Kekeruhan suspensi bakteri diukur menggunakan

densitometer *McFarland*, di mana 0,5 *McFarland* setara dengan $1,5 \times 10^8$ (*Colony Forming Unit*) CFU/ml.

j. Tahap uji kemampuan daya hambat

Cara pengujian daya hambat dalam penelitian ini dilaksanakan berdasarkan tahapan kerja yang dikemukakan oleh (Anggaraini dkk., 2019) dengan beberapa modifikasi sesuai kebutuhan penelitian, yaitu sebagai berikut:

- 1) Siapkan suspensi bakteri dengan kekeruhan setara 0,5 *McFarland*. Swab kapas steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri, kemudian diputar pada dinding bagian dalam tabung untuk menghilangkan kelebihan suspensi.
- 2) Swab yang telah mengandung suspensi bakteri digoreskan secara merata ke seluruh media *Mueller Hinton Agar* (MHA) hingga permukaan media terinokulasi secara merata.
- 3) Kertas cakram steril kosong berdiameter 6 mm diletakkan pada permukaan steril, kemudian masing-masing cakram ditetesi 20 μ L ekstrak dengan konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20%. Cakram didiamkan hingga larutan meresap sempurna sebelum digunakan.
- 4) Kertas cakram yang sudah berisi ekstrak ditempelkan pada permukaan media MHA yang telah diinokulasi. Sebagai kontrol, digunakan cakram antibiotik kloramfenikol 30 μ g untuk kontrol positif dan cakram yang ditetesi etanol 70% sebagai kontrol negatif.
- 5) Jarak antar cakram diatur sekitar ± 15 mm dan cakram tidak dipindahkan atau digeser setelah ditempelkan pada media.
- 6) Media yang tertempel cakram kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, cawan diletakkan posisi terbalik.

- 7) Setelah proses inkubasi, area jernih (zona hambat) di sekitar cakram yang terbentuk diamati dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data berupa diameter zona hambat (mm) yang didapatkan dari hasil uji daya hambat ekstrak bunga gemitir (*Tagetes erecta* L) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Data dicatat dan ditabulasi dalam bentuk tabel naratif untuk memudahkan pengolahan lebih lanjut.

2. Analisis data

Data diameter zona hambat (mm) dari pengujian daya hambat ekstrak bunga gemitir (*Tagetes erecta* L) terhadap *Staphylococcus aureus* dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS. Pertama-tama dilakukan uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk* untuk mengevaluasi apakah distribusi data bersifat normal atau tidak. Data dapat dinyatakan berdistribusi normal apabila nilai p lebih besar dari 0,05. Kemudian, untuk menilai konsistensi varians antar kelompok perlakuan, uji homogenitas varians dilakukan melalui uji *Levene*, dimana kriteria homogen ditetapkan jika p lebih dari 0,05.

Jika data memenuhi dua asumsi tersebut yaitu normalitas dan homogenitas, maka analisis perbedaan antar kelompok dilakukan menggunakan uji *One-Way ANOVA*, yang dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Least Significant Difference (LSD)* untuk mengetahui pasangan kelompok yang menunjukkan perbedaan bermakna. Sebagai alternatif, jika data tidak memiliki distribusi normal, analisis akan dilaksanakan dengan menggunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*.

H. Etika Penelitian

Penerapan etika penelitian kesehatan dilakukan yakni (Sugiyono & Puspandini, 2020). Penelitian ini memperhatikan prinsip etika penelitian, yaitu *beneficence* (mendatangkan manfaat dan meminimalkan kerugian) serta *non-maleficence* (tidak merugikan subjek) dan memberikan perlindungan terhadap potensi penyalahgunaan.