

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Desain penelitian menggunakan penelitian kuantitatif eksperimental laboratorium dengan pendekatan *the post-test only control grup design*. Desain ini dipilih sebagai pengukuran efek perlakuan ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) pada konsentrasi 75%, 50% dan 25% terhadap bakteri *Lactobacillus acidophilus* setelah melakukan intervensi dengan melakukan pengamatan serta pengukuran dan akan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (akuades steril) dan kelompok kontrol positif (klindamisin). Perlakuan akan dilakukan pasca inkubasi 1 x 24 jam menggunakan metode difusi sumuran dengan replikasi sebanyak tiga kali pada setiap kelompok.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Kimia Terpadu STIKes Panti Waluya Malang

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan April – Juli 2026

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

- | | |
|----------------------|----------------------|
| 1. Cawan petri | 9. Bunsen |
| 2. <i>Cork borer</i> | 10. Mikropipet |
| 3. Gelas ukur | 11. Blue tip |
| 4. Beaker glass | 12. Kantong plastik |
| 5. Erlenmeyer | 13. Kertas label |
| 6. Sendok steanless | 14. Kertas McFarland |
| 7. Tabung reaksi | 15. Vortex |

8. Vial

16. Rak tabung reaksi

3.3.2 Bahan

1. Daun binahong

10. HCl pekat

2. Etanol 70%

11. FeCl

3. Bakteri *Lactobacillus acidophillus*

12. NaCl 0,9%

4. Media MRS Agar

13. Spirtus

5. Media MRS Broth

14. Reagen Mayer

6. *Mueller Hinton Agar* (MHA)

15. Reagen Dragendorff

7. Serbuk klindamisin

16. Reagen Wagner

8. Serbuk magnesium (Mg)

17. Akuades

9. Larutan standar *McFarland* 0,5

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi adalah keseluruhan objek atau subjek penelitian yang memiliki karakteristik tertentu untuk diteliti (Suriani *et al.*, 2023).

1. Populasi bakteri *Lactobacillus acidophilus* menggunakan semua kultur murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang
2. Populasi daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang tumbuh di Kabupaten Malang, Jawa Timur

3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang mewakili keseluruhan populasi (Suriani *et al.*, 2023).

1. Sampel bakteri *Lactobacillus acidophilus* menggunakan kultur murni bakteri *Lactobacillus acidophilus* tanpa adanya kontaminasi

mikroorganisme lain yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang

2. Sampel daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang digunakan berwarna hijau segar, berbentuk oval yang tumbuh di daerah Pakisjajar, Kecamatan Pakis, Kabupaten Malang

3.5 Definisi Operasional Variabel

3.5.1 Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Parameter
1.	Daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis)	Bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan penelitian dengan ciri daun tunggal, berwarna hijau segar, berbentuk oval/jantung, permukaan halus, panjang 6–8 cm dan lebar 4–6 cm serta tidak terserang hama	Observasi langsung	Nominal	Daun memenuhi kriteria inklusi
2.	Maserasi	Proses ekstraksi	Stopwatch, termometer	Nominal	Waktu 3 × 24 jam

		simplisia daun binahong menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:5 (b/v) selama 3 × 24 jam pada suhu ± 25 °C dalam wadah tertutup dan terlindung dari cahaya matahari			dengan suhu ± 25 °C
3.	Ekstrak etanol daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis)	Ekstrak kental yang diperoleh dari proses maserasi daun binahong menggunakan etanol 70% kemudian diuapkan hingga diperoleh ekstrak pekat dan dibuat dalam konsentrasi	Timbangan analitik, gelas ukur, labu ukur, rotary evaporator, waterbath	Rasio	Konsentrasi 75%, 50% dan 25%

		75%, 50%, dan 25%			
4.	Kontrol Positif (Klindami sin)	Larutan klindamisin konsentrasi 1% digunakan sebagai pembanding karena memiliki aktivitas antibakteri terhadap <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Jangka sorong (mm)	Rasio	Terbentuk zona bening dengan diameter (mm)
5.	Bakteri <i>Lactobacil lus acidophill us</i>	Kultur murni <i>Lactobacillus acidophilus</i> merupakan bakteri Gram- positif termasuk dalam bakteri asam laktat (BAL)	Observasi morfologi koloni dan standarisasi Mc Farland 0,5	Nominal	Kultur murni tanpa kontaminasi
6.	Zona hambat	Daerah bening sekitar sumuran pada media setelah inkubasi 1 ×	Jangka sorong (mm)	Rasio	Diameter zona bening (mm)

		24 jam pada suhu 37 °C yang menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri			
--	--	---	--	--	--

3.5.2 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi merupakan persyaratan yang harus dipenuhi oleh subjek agar dapat diikutsertakan dalam penelitian (Wulandari *et al.*, 2025).

1. Kriteria bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang digunakan merupakan kultur murni tanpa adanya kontaminasi mikroorganisme lain yang ditandai dengan pertumbuhan mikroorganisme pada media pertumbuhan
2. Kriteria daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang digunakan berwarna hijau segar, tidak terserang hama, berbentuk oval dengan tekstur halus dan ukuran panjang 6-8 cm serta lebar 4-6 cm

3.5.3 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi merupakan kriteria penolakan pada subjek karena tidak memenuhi kriteria inklusi (Wulandari *et al.*, 2025).

1. Kriteria bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang tidak digunakan terdapat kontaminan yang ditandai dengan adanya mikroorganisme lain pada media pertumbuhan
2. Kriteria daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang tidak digunakan mengalami perubahan bentuk karena terserang hama dengan permukaan yang kasar

3.5.4 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi variabel terikat (Haifa *et al.*, 2025). Penelitian ini menggunakan variabel bebas yaitu variasi ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) pada konsentrasi 75%, 50% dan 25% yang kemudian akan dilakukan perlakuan terhadap bakteri *Lactobacillus acidophillus* menggunakan metode difusi sumuran

2. Variabel Terikat (Dependen)

Variabel terikat merupakan variabel yang akan diamati, variabel ini dapat dipengaruhi oleh variabel bebas yang akan menjelaskan tujuan penelitian (Haifa *et al.*, 2025). Penelitian ini menggunakan variabel terikat yaitu zona hambat bakteri *Lactobacillus acidophillus* oleh ekstrak etanol 70% daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) hasil ekstraksi.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol merupakan variabel yang melengkapi hubungan kausal agar mendapatkan hasil yang lebih baik (Haifa *et al.*, 2025). Penelitian ini menggunakan variabel terkontrol berupa waktu maserasi 3 x 24 jam pada suhu 25 °C dengan media pertumbuhan khusus MRS agar pada bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan waktu inkubasi selama 1 x 24 jam merupakan waktu optimal bakteri mengalami pertumbuhan.

3.6 Metode Analisa Data dan Prosedur Kerja

3.6.1 Metode Analisa

1. Pengukuran zona hambat

Pengukuran zona hambat bakteri dilakukan setelah pengamatan 1 x 24 jam masa inkubasi. Daerah sekitar sumuran akan muncul kepekaan dan respon dari mikroba uji terhadap antibiotik atau ekstrak antimikroba yang digunakan sebagai bahan uji, daerah yang dinyatakan sebagai zona hambat diukur dalam satuan millimeter (mm) menggunakan jangka sorong dengan cara mengukur jarak tepi

sumur uji ke batas lingkaran zona bening kemudian diameter zona hambat dikategorikan berdasarkan Davis and Stout yaitu;

Tabel 3. 2 Kekuatan Daya Hambat

Diameter Zona Bening	Kategori
> 20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
< 5 mm	Lemah

3.6.2 Prosedur Kerja

1. Pengambilan dan determinasi sampel

Pengambilan sampel daun binahong di daerah Pakisjajar, Kecamatan Pakis, Kabupaten Malang. Pengambilan dilakukan pada pagi hari dengan kriteria daun binahong yang masih segar, berbentuk oval, tidak berlubang serta tidak terserang hama dengan permukaan daun yang halus. Determinasi sampel akan dilakukan di UPT Laboratorium Materia Medika Batu untuk memastikan kebenaran spesies tanaman yang digunakan yaitu daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).

2. Pembuatan serbuk simplisia

Pengelolaan sampel daun binahong dilakukan dengan menyortasi daun yang rusak atau tidak masuk kedalam kriteria inklusi serta dicuci menggunakan air mengalir hingga bersih. Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena matahari langsung lalu disortasi kembali untuk melihat adanya kerusakan saat penjemuran, pengeringan akan menggunakan oven dengan suhu 50 °C selama 3 x 24 jam. Pada suhu 50 °C daun binahong akan mengalami penurunan kadar air yang merupakan indikator penting ketika melakukan ekstraksi maserasi agar tidak terdapat pertumbuhan mikroba. Hasil simplisia kering kemudian dihaluskan menggunakan blender dan dilakukan pengayakan menggunakan mesh 40 hingga mendapatkan simplisia serbuk halus. Serbuk simplisia yang sudah halus disimpan dalam wadah bersih yang siap diekstraksi.

3. Ekstraksi daun binahong

Simplisia yang sudah siap dimasukkan dalam wadah maserasi, selanjutnya ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan rasio 1:5 (w/v) hingga simplisia terendam oleh pelarut, wadah maserasi kemudian ditutup dan dimaserasi 3 x 24 jam ditempat yang tidak terpapar matahari langsung sambil sesekali diaduk. Sampel yang sudah dimaserasi akan disaring agar memisahkan filtrat dan residu, lalu residu yang tertinggal dilakukan remaserasi dengan pelarut etanol 70% dalam waktu 3 x 24 jam. Filtrat akhir dari kedua maserasi yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan tujuan mendapatkan ekstrak kental dengan bantuan *rotary evaporator* pada suhu 55 °C dengan kecepatan 80 rpm, kemudian penguapan akan dilakukan dengan bantuan waterbath untuk menguapkan sisa pelarut sehingga tersisa ekstrak kental daun binahong. Rendemen ekstrak yang diperoleh lalu dihitung menggunakan rumus $\% \text{ Rendemen} = (\text{Berat ekstrak (g)} / \text{Berat simplisia (g)}) \times 100\%$, nilai rendemen dianggap baik jika $> 10\%$ hasil perhitungan.

4. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan dengan menimbang 2 g ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) lalu ditambahkan 20 ml akuades panas dan dihomogenkan hingga larut sempurna. Ekstrak disaring menggunakan penyaring kemudian dimasukkan kedalam setiap tabung reaksi. Larutan uji dapat digunakan untuk melakukan skrining fitokimia pada senyawa-senyawa berikut :

a. Uji senyawa flavonoid

Sebanyak 2 ml ekstrak disiapkan dalam tabung reaksi, kemudian dipanaskan selama 5 menit. Setelah pemanasan, ditambahkan 0,2 serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat ke dalam tabung reaksi. Hasil positif akan menunjukkan warna jingga hingga kemerahan.

b. Uji senyawa tanin

Sebanyak 2 ml ekstrak disiapkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 tetes FeCl. Hasil positif akan menunjukkan warna biru kehitaman atau coklat kehitaman.

c. Uji senyawa alkaloid

Sebanyak 2 ml ekstrak disiapkan dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan 3-5 tetes Mayer, tabung kedua ditambahkan 3-5 tetes Dragendorff, dan tabung ketiga ditambahkan 3-5 tetes Wagner. Hasil positif akan membentuk endapan berwarna putih untuk tabung pertama, endapan berwarna jingga untuk tabung kedua dan endapan berwarna coklat untuk tabung ketiga.

d. Uji senyawa saponin

Sebanyak 2 ml ekstrak disiapkan dalam tabung reaksi, kemudian dipanaskan selama 5 menit. Setelah pemanasan, 10 tetes akuades panas ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan digojok. Hasil positif akan ditunjukkan dengan terbentuknya busa tetap setelah digojok.

5. Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi alat dan bahan penelitian dilakukan dengan metode sterilisasi uap panas bertekanan (autoklaf). Sebelum proses sterilisasi seluruh alat dicuci menggunakan air mengalir hingga bersih lalu dikeringkan hingga tidak ada lagi tetesan air yang tersisa, kemudian alat serta bahan yang digunakan akan dibungkus dengan kertas alumunium foil. Selanjutnya alat beserta dengan bahan yang sudah disiapkan akan dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

6. Pembuatan media

a. Media *de Man, Rogosa and Sharpe* Broth (MRSB)

Pembuatan media MRS Broth (MRSB) dengan melarutkan sebanyak 52,2 g MRSB dalam 1000 ml akuades steril di dalam labu ukur. Campuran dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan hot plate dengan bantuan *magnetic stirrer* hingga larut sempurna. Larutan kemudian disterilisasi pada autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, dituangkan ke dalam tabung reaksi steril sebanyak ± 10 ml, kemudian disumbat menggunakan kapas steril dan diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37 °C.

b. Media *de Man, Rogosa and Sharpe* Agar (MRSA)

Pembuatan media MRS agar dengan melarutkan sebanyak 68 g MRSA dalam 1000 ml akuades steril di dalam labu ukur. Campuran dipanaskan dan

dihomogenkan menggunakan hot plate dengan bantuan *magnetic stirrer* hingga larut sempurna. Larutan kemudian disterilisasi pada autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, dituangkan ke dalam tabung reaksi steril sebanyak ± 5 ml, kemudian disumbat menggunakan kapas steril dan diletakkan dalam posisi miring $\pm 45^\circ$ hingga memadat. Media diinkubasi selama 1 x 24 jam suhu 37 °C.

c. Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

Pembuatan media agar *Muller Hinton Agar* (MHA) dengan melarutkan 38 g serbuk MHA dalam 1000 ml akuades steril dimasukkan kedalam labu ukur lalu dilakukan dengan pemanasan dan pengadukan pada hot plate dengan bantuan *magnetic stirrer* hingga larutan homogen, kemudian akan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

7. Peremajaan bakteri

Peremajaan bakteri *Lactobacillus acidophillus* dilakukan pada media MRSB dan MRSA untuk memperoleh kultur aktif dengan biakan murni. Pengerjaan dilakukan secara aseptik menggunakan ose steril dengan mengambil biakan murni bakteri *Lactobacillus acidophillus* kemudian diinokulasikan pada media MRSB dan MRSA didalam tabung reaksi steril yang sudah disiapkan, media lalu disimpan untuk diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37 °C.

8. Pembuatan larutan *McFarland*

Larutan *McFarland* dibutuhkan dalam memperkiraan jumlah bakteri dalam cairan suspensi tanpa melakukan perhitungan bakteri satu per satu untuk melihat kepadatan sel yang akan digunakan pada pengujian. Larutan dibuat dengan mencampurkan 1% asam sulfur 9,95 ml kedalam 0,05 ml barium klorida 1% lalu dihomogenkan, jumlah standar *McFarland* 0,5 setara dengan $\pm 1,5 \times 10^8$ CFU/ml sel bakteri. Larutan yang sudah terhomogen lalu disimpan dengan menyegel rapat tabung larutan *McFarland* agar tidak terjadi penguapan.

9. Pembuatan suspensi bakteri

Suspensi bakteri dibuat dengan mengambil koloni bakteri murni yang telah diremajakan, kemudian disuspensikan ke dalam larutan NaCl fisiologis 0,9% steril. Suspensi tersebut dihomogenkan hingga tercampur merata, lalu kekeruhannya akan

disesuaikan dengan larutan standar *McFarland* 0,5 yang setara dengan $\pm 1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Penyesuaian kekeruhannya dapat dilakukan secara visual dengan membandingkan suspensi bakteri dengan larutan standar *McFarland*. Suspensi bakteri yang telah memenuhi standar selanjutnya dapat digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri.

10. Pembuatan larutan kontrol

Kontrol positif menggunakan antibiotik klindamisin, sebanyak 0,05 g serbuk klindamisin ditimbang lalu dimasukkan ke dalam botol vial dan dilarutkan dengan 5 ml akuades steril kemudian dihomogen hingga larut sempurna maka akan diperoleh konsentrasi 10 µg/ml atau 1%, sedangkan kontrol negatif menggunakan akuades steril.

11. Pembuatan larutan sampel uji

Larutan uji ekstrak pekat daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis (Ten.) Steenis) dibuat dalam tiga variasi konsentrasi yaitu 75%, 50%, dan 25% (b/v) dengan akudes steril sebagai pelarut. Konsentrasi 75% (b/v) diperoleh dengan menimbang 3,75 g ekstrak pekat daun binahong dilarutkan dalam 1,25 ml akudes steril. Kemudian pada konsentrasi 50% (b/v) diperoleh dengan menimbang 2,5 g ekstrak pekat daun binahong dilarutkan dalam 2,5 ml akudes steril. Selanjutnya pada konsentrasi 25% (b/v) diperoleh dengan menimbang 1,25 g ekstrak pekat daun binahong dilarutkan dalam 3,75 ml akudes steril, semua larutan akan dihomogenkan hingga ekstrak larut sempurna sebelum digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri.

12. Pengujian bakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukann dengan menggunakan metode difusi sumuran dengan teknik *pour plate*. Mengambil 1 ml suspensi bakteri *Lactobacillus acidophillus* dimasukkan kedalam cawan petri steril, lalu tambahkan media MHA sebanyak 18-20 ml diratakan dengan menggoyangkan membentuk angka delapan, dibiarkan hingga memadat. Campuran MHA dan campuran bakteri yang sudah memadat dibuat sumuran menggunakan tabung atau *cork borer* steril dengan 2 lubang sumuran tiap cawan petri. Masing-masing sumuran diberikan kontrol positif (+) klindamisin, kontrol negatif (-) akuades steril serta larutan uji

ekstrak daun binahong dengan variasi konsentrasi (75%, 50% dan 25%) lalu pada setiap sumuran akan diisi 0,1 ml. Cawan petri yang sudah diberi perlakuan akan diinkubasi kedalam inkubator selama 1 x 24 jam dengan suhu 37 °C untuk melihat pertumbuhan bakteri. Hasil dari proses inkubasi akan dilakukan pengamatan menggunakan jangka sorong, diameter zona hambat dari tepi (*breakpoint*) ke tepi yang bersebrangan dengan melewati lubang lingkaran akan dihitung, apabila tidak terdapat zona bening maka dicatat sebagai 0 mm. Interpretasi kekuatan daya hambat dikategorikan berdasarkan Davis and Stout (1971).

13. Analisa data

Data yang didapat dari hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap bakteri *Lactobacillus acidophilus* pada konsentrasi 75%, 50% dan 25% serta dibandingkan dengan kontrol positif (klindamisin) dan kontrol negatif (akuades steril) pada tiga kali replikasi. Parameter yang diamati adalah diameter zona hambat (mm) menggunakan jangka sorong, data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik menggunakan uji *One-Way ANOVA* (analisis varians satu arah) untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Analisis statistik dilakukan dengan bantuan program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) versi 26 dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

3.7 Kerangka operasional

