

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian dengan metode eksperimental murni menggunakan desain *Post-test Only Control Group Design*. Desain penelitian ini melibatkan dua kelompok yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, dimana kelompok eksperimen merupakan kelompok yang akan diberikan intervensi ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopasanda (*Chromolaena odorata* L) dengan berbagai konsentrasi. Sedangkan kelompok lainnya yaitu kelompok kontrol yang merupakan kelompok yang tidak diberikan perlakuan. Penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran untuk mengetahui aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopasanda (*Chromolaena odorata* L).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan April – Juli 2026.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Terpadu dan Mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- | | | |
|-----------------------------|----------------------------|---------------------|
| 1. Oven | 13. Gelas ukur | 25. Masker |
| 2. <i>Rotary evaporator</i> | 14. Cawan porselin | 26. Sendok tanduk |
| 3. <i>Incubator</i> | 15. Pipet tetes | 27. Batang pengaduk |
| 4. Blender | 16. <i>Waterbath</i> | 28. Cawan petri |
| 5. Pengayak | 17. Tabung reaksi | 29. Spreder glass |
| 6. Timbangan digital | 18. Timbangan
milligram | 30. Bunsen |
| 7. Botol kaca | 19. Kain hitam | 31. Jarum ose |
| 8. Batang pengaduk | 20. Loyang | 32. Kapas |

- | | | |
|----------------------|-------------------|---|
| 9. Kertas saring | 21. Corong Pisah | 33. <i>Alumunium foil</i> |
| 10. Beker gelas | 22. Erlenmeyer | 34. Autoklaf |
| 11. Bejana maserasi | 23. Sarung tangan | 35. <i>Mikropipet</i> |
| 12. Laminar air flow | 24. Penggaris | 36. <i>Yellowtip</i> dan <i>Bluetip</i> |

3.3.2 Bahan

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- | | |
|--|--|
| 1. Ekstrak Dauk kasanda
(<i>Chromolaena odorata</i> L) | 17. Pereaksi mayer, dragendroft
dan buchardat |
| 2. Etanol 70% | 18. Aquadest |
| 3. Etil asetat | 19. Larutan FeCl ₃ |
| 4. N-heksan | 20. Kloroform |
| 5. Asam asetat anhidrat | 21. DMSO 10% |
| 6. Etanol | |
| 7. Serbuk magnesium | |
| 8. Amoxicillin | |
| 9. Media <i>Brain heart infusion</i> | |
| 10. Media <i>muller hinton agar</i> | |
| 11. Media <i>Nutrient broth</i> | |
| 12. Bakteri <i>Staphyloccus aureus</i> | |
| 13. NaOH 1N | |
| 14. NaCl 0,9 % | |
| 15. H ₂ SO ₄ pekat | |
| 16. HCl pekat | |

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas obyek/subyek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya. Populasi dalam penelitian ini

adalah tanaman kopasanda (*Chromolaena odorata* L) yang berada di Kabupaten Alor, Nusa Tenggara Timur dan kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.4.2 Sampel

Sampel merupakan bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah daun kopasanda (*Chromolaena odorata* L) yang diambil dari Desa Aramaba, Kec. Pantar Tengah, Kabupaten Alor, Nusa Tenggara Timur dan bakteri *Staphylococcus aureus* yang berumur 24 jam yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Panti Waluya Malang.

3.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

3.5.1 Kriteria Inklusi

Daun berwarna hijau muda hingga hijau tua, tidak terdapat cacat fisik seperti berlubang, ujung daun meruncing dan dasar daun tumpul/membulat sobekan atau terdapat bercak-bercak hitam, kuning dan putih. *Staphylococcus aureus* yang berumur 24 jam yang diinkubasi pada suhu 37 °C.

3.5.2 Kriteria Eksklusi

Daun yang sudah layu, kering berwarna hitam/kuning kecoklatan, terdapat hama maupun bekas hama seperti bercak putih, berlubang.

3.6 Identifikasi Variabel

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel lain, apabila terjadi perubahan pada variabel bebas maka dapat menyebabkan perubahan pada variabel lain. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75%.

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas, yang berarti variabel terikat berubah karena disebabkan oleh perubahan variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini adalah luas zona hambat yang terbentuk akibat pemberian ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopasanda (*Chromolaena odorata* L) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.6.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol adalah variabel yang dijaga tetap atau dibuat sama selama penelitian agar tidak memengaruhi hasil percobaan, sehingga perubahan pada variabel terikat benar-benar disebabkan oleh variabel bebas. Variabel terkontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus*, media pertumbuhan bakteri berupa media MHA dan NA, suhu 37 °C dan lama inkubasi selama 1x24 jam, metode difusi sumuran, serta pelarut yang digunakan yakni etanol 70%, etil asetat dan n-heksan.

3.7 Definisi Oprasional

Tabel 3. 1 Definisi Oprasional

Variabel	Devinis Oprasional	Alat Ukur	Skala	Parameter
Daun Kopasanda (<i>Chromolaena odorata</i> L)	Daun Kopasanda (<i>Chromolaena odorata</i> L) memiliki bentuk jorong atau ovalis hingga segitiga memanjang dengan tepi bergerigi, ujung daun meruncing dan pangkalnya tumpul, pertulangan daun bertipe menjari, warna daun hijau saat segar dan dapat berubah menjadi hijau kecoklatan ketika kering, serta permukaannya ditutupi oleh	Pengamatan visual	Ordinari	Daun berwarna hijau muda hingga hijau tua, tidak layu dan tidak memiliki cacat fisik seperti berlubang.

	rambut-rambut halus.			
Maserasi	Proses ekstraksi simplisia Daun Kopasanda (<i>Chromolaena odorata</i> L) dengan cara perendaman menggunakan pelarut etanol 70% selama 3 x 24 jam pada suhu ruang dengan pengadukan sekali 1-2 menit setiap hari untuk menarik senyawa bioaktif bersifat polar	Timbang an analitik, gelas ukur	Rasio	Perbandingan simplisia dan pelarut (1:5), lama maserasi 3 x 24 jam, pelarut etanol 70%
Fraksi Etil Asetat	Proses fraksinasi dengan cara melarutkan ekstrak etanol daun kopasanda (<i>Chromolaena odorata</i> L) dalam etil asetat untuk menarik senyawa bioaktif yang bersifat semi polar	Timbang an analitik, gelas ukur.	Rasio	Terbentuknya 2 fase dalam beaker gelas.

Fraksi N-Heksan	Proses fraksinasi dengan cara melarutkan ekstrak etanol daun kopasanda (<i>Chromolaena odorata</i> L) dalam n-heksan untuk menarik senyawa bioaktif yang bersifat non-polar	Timbangan analitik, gelas ukur.	Rasio	Terbentuknya 2 fase dalam cawan poselen.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bakteri Gram positif berbentuk kokus yang digunakan sebagai mikroorganisme uji dalam penelitian.	Standar <i>Mc Farland</i> 0,5	Nominal	Kepadatan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL
Aktivitas Antibakteri	Luas zona hambat ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan terhadap pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar lubang sumuran pada media MHA.	Jangka sorong	Rasio	Diameter zona hambat (mm) setelah inkubasi 24 jam pada 37°C

Zona Hambat	Area bening di sekitar lubang sumuran yang menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri.	Jangka sorong	Rasio	Diameter zona hambat (mm)
-------------	---	---------------	-------	---------------------------

3.8 Metode Analisis Data dan Prosedur Penelitian

3.8.1 Metode Analisis Data

Metode analisis zona penghambatan dalam pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopasanda (*Chromolaena odorata* L) terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan mengukur luas zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran pada media agar menggunakan jangka sorong dalam satuan mm setelah inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Proses inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C merupakan waktu dan suhu yang ideal untuk pertumbuhan bakteri

Zona hambat bakteri ≤ 5 mm termasuk dalam kategori lemah, daya hambat bakteri 5-10 mm termasuk dalam kategori sedang, daya hambat bakteri 10-20 mm termasuk dalam kategori kuat dan daya hambat bakteri ≥ 21 mm termasuk kategori sangat kuat (Aini *et al.* 2022).

3.8.2 Prosedur Penelitian

3.8.2.1 Determinasi Sampel

Sampel yang diambil dari Desa Aramaba, Kec. Pantar Tengah, Kabupaten Alor, Nusa Tenggara Timur merupakan daun dopasanda (*Chromolaena odorata* L). Daun Kopasanda (*Chromolaena odorata* L) dilakukan determinasi di UPT. Laboratorium Herbal Materia Medica Batu. Tujuan dilakukan determinasi adalah untuk menunjukkan adanya kebenaran keaslian dan identitas dari tanaman yang digunakan dalam penelitian.

3.8.2.2 Pengolahan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun kopasanda (*Chromolaena odorata* L) yang diambil dari Desa Aramaba, Kec. Pantar Tengah, Kabupaten Alor, Nusa Tenggara Timur yang kemudian disortasi basah, dicuci dengan air mengalir, lalu ditiriskan. Kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50 °C. Setelah didapati simplisia yang kering yang ditandai dengan sampel yang mengalami perubahan warna serta mudah dipatahkan dan dilakukan uji kadar air dengan alat *Moisture Balance*. Simplisia ditimbang sebanyak 5 g kemudian diletakkan ke dalam cawan alumunium pada alat dengan cara disebar ke seluruh bagian cawan. Suhu alat diatur menjadi 105 °C. Nilai kadar air tertera pada alat setelah pengujian selesai dilakukan tidak lebih dari 10%. Prosedur pengukuran kadar air direplikasi hingga 3 kali (Nabila, 2023). Sampel ditimbang dan dihaluskan menggunakan blender, lalu diayak menggunakan ayakan mesh 40 hingga didapati serbuk yang halus. Serbuk yang didapat disimpan dalam wadah yang bersih, kering, dan tertutup rapat.

3.8.2.3 Ekstraksi Daun Kopasanda (*Chromolaena Odorata* L)

Metode yang digunakan untuk ekstrak daun kopasanda (*Chromolaens odorata* L) adalah ekstraksi maserasi. Serbuk simplisia dilakukan proses maserasi dengan melakukan perendaman menggunakan etanol 70% selama 3x24 jam dengan perbandingan 1:5 diaduk sesekali setiap hari. Hasil maserasi kemudian di saring dan filtratnya dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan kecepatan 70 rpm hingga diperoleh ekstrak kental yang bebas dari pelarut. Ekstrak daun kopasanda (*Chromolaens odorata* L) dikentalkan diatas *waterbath* dan hasil rendemennya dihitung sesuai rumus, Nilai rendemen dikatakan baik jika nilainya ≥ 10 (Subaryanti *et al.* 2022)

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{berat ekstrak kental (g)}}{\text{berat simplisia (g)}} \times 100 \%$$

3.8.2.4 Skrining Fitokimia

Identifikasi kandungan kimia bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kopasanda seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin fenolik, kuinon, steroid, dan terpenoid (Tari and Indriyana 2021).

a. Uji Flavonoid

Sebanyak 3 tetes ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambah 2-3 tetes methanol 96%, dipanaskan pada suhu 50°C. Setelah dingin ditambahkan logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna merah atau jingga pada sampel (Nurhajannah *et al.*, 2020).

b. Uji Saponin

Sebanyak 5-6 tetes larutan uji saponin dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dikocok kuat secara konsisten selama 10 detik, adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa setinggi 1-10 cm yang stabil kurang lebih 15 menit dan tidak hilang pada penambahan setetes HCl 2N.

c. Uji Alkaloid

Sebanyak 2-3 tetes ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 5 tetes NH₃ pekat. Setelah itu, ditambahkan H₂SO₄ 2N dan dikocok hingga terbentuk 2 lapisan. Larutan dibagi menjadi 3 bagian, pada tabung pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer, tabung kedua ditambah 3 tetes pereaksi Dragendroff dan tabung ke 3 tetes pereaksi Buchardat. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan.

d. Uji Tanin

Sebanyak 3 tetes ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah 3-4 tetes akuades dan 2-3 tetes FeCl₃. Adanya tanin ditandai dengan terjadinya perubahan menjadi warna biru tua atau hitam.

e. Uji Fenolik

Sebanyak 1-2 tetes ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 2 tetes larutan FeCl₃ 5%. Hasil positif jika terbentuk warna hijau, hitam kebiruan atau hitam yang kuat.

f. Uji Kuinon

Sebanyak 3 tetes ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 2-3 tetes NaOH 1N, adanya kuinon ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah.

g. Uji Terpenoid

Sebanyak 3 tetes ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah 2-3 tetes Ac₂O dan 2-3 tetes CHCl₃. Selanjutnya ditambah H₂SO₄ pekat setetes demi setetes sebanyak 2 tetes ke dasar tabung dan diamati terjadinya warna ungu.

3.8.2.5 Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan menggunakan beberapa pelarut yang berbeda yaitu n-heksan dan etil asetat. Fraksinasi dilakukan dengan cara mengambil ekstrak etanol daun kopasanda (*Chromolaena odorata* L.) ditambahkan n-heksan kemudian dikeringkan hingga diperoleh fraksi n-heksan. Residu dari fraksinasi n-heksan dilarutkan menggunakan pelarut etil asetat sebanyak hingga diperoleh fraksi etil asetat. Filtrat dipekatkan di *warterbath* hingga mendapatkan fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat kental (Yahya *et al.* 2024)

3.8.2.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Langkah-langkah dalam pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopasanda (*Chromolaena odorata* L.) adalah sebagai berikut :

a. Sterilisasi Alat

Alat yang akan digunakan pada uji antibakteri disterilisasi melalui dicuci bersih, dikeringkan, dan masing-masing dibungkus dengan kertas lalu disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Ose disterilkan dengan cara pemijaran 15 menit sedangkan alat yang tidak tahan panas disterilkan dengan kontrol (Kadarwenny, 2017).

b. Pembuatan Media *Nutrient agar* (NA)

Media NA dimulai dari menimbang 28 g serbuk NA kemudian larutkan dalam 1000 ml aquadest dan ditutup dengan kapas. Kemudian dipanaskan hingga mendidih dan didinginkan pada suhu ruangan. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit pada tekanan 2 atm.

c. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Pembuatan media *Muller Hinton Agar* (MHA) dimulai dengan menimbang MHA sebanyak 32 g dan dilarutkan ke dalam Labu dengan akuades hingga mencapai volume 1000 mL, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga tercampur homogen. Media disterilisasi menggunakan autoclaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

d. Peremajaan Biakan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara mengambil satu ose bakteri *Staphylococcus aureus* kemudian digores pada media pembuatan NA agar miring. Kemudian dikubasi selama 1x24 jam pada suhu 37 °C (Ngajow *et al.*, 2013).

e. Pembuatan Larutan Standar *McFarland* 0,5

Larutan *McFarland* 0,5 biasa digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair dengan kepadatan antara 1×10^7 sel/ml – 1×10^8 sel/ml. Pembuatan larutan *McFarland* 0,5 yaitu sebanyak 0,05 ml *Barium Chlorida* (BaCl_2) 1% dalam akuades ditambahkan 9,95 ml Asam Sulfat (H_2SO_4) 1%. Kemudian disimpan di tempat yang terhindar dari cahaya matahari langsung (Andira *et al.* 2024).

f. Pembuatan Larutan Suspensi Bakteri

Sebanyak 1-2 ose biakan *Staphylococcus aureus* yang telah diinkubasi, dimasukkan ke dalam NaCl 0,9% sebanyak 5 mL kemudian difortex sampai diperoleh kekeruhan sama dengan standar *McFarland* nomor 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) (Munawar, 2016).

g. Pembuatan Larutan Kontrol

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah *amoxicillin* dan kontrol negatif yang digunakan adalah aquades. Kontrol positif *amoxicillin* dibuat dari sediaan obat kaplet *amoxicillin* 500 mg. Satu kaplet *amoxicillin* dibuka digerus halus kemudian ditimbang serbuk. Kemudian serbuk dimasukkan ke dalam wadah botol kaca dan dilarutkan dengan akuades steril untuk memperoleh larutan *amoxicillin*.

h. Penentuan Konsentrasi Ekstrak Etanol 70%, Fraksi Etil Asetat dan Fraksi N-Heksan

Pembuat larutan konsentrasi ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan n-heksan daun kopasanda (*Chromolaena odorata* L.). Ekstrak etanol ditimbang ekstrak kental kemudian dilarutkan dalam aquades hingga mendapatkan larutan ekstrak dengan konsentrasi konsentrasi 25%, 50% dan 75%. Adapun pembuatan larutan konsentrasi fraksi yaitu ditimbang fraksi kental kemudian dilarutkan dalam DMSO hingga mendapatkan larutan fraksi dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75%.

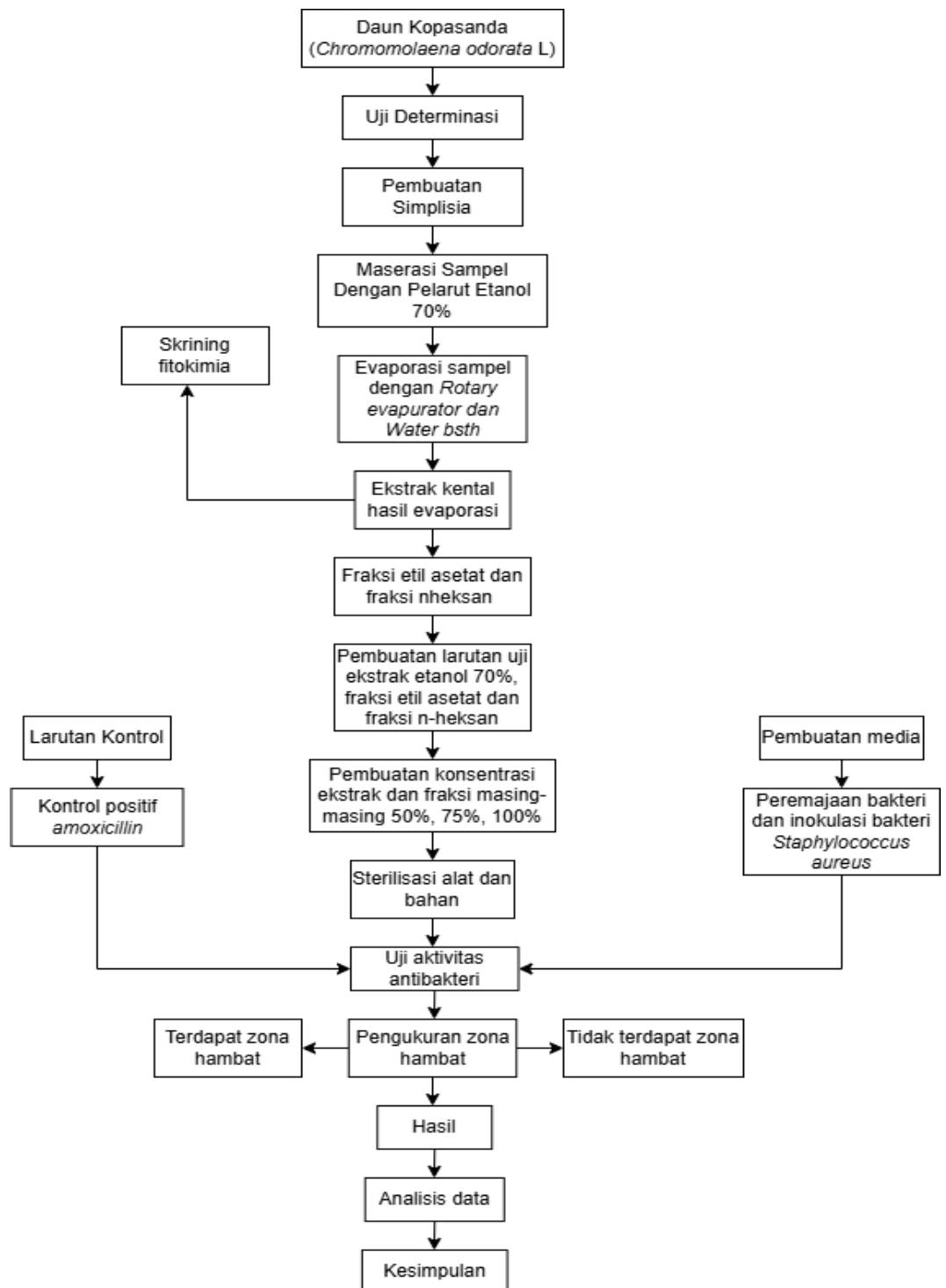
i. Uji Aktivitas Antibakteri

Larutan ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan daun kopasanda yang dibuat dalam tiga variasi konsentrasi yaitu 25%, 50% dan 75%. dihomogenkan dan dilakukan uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi sumuran dengan cara membuat lubang pada media *Mueller Hinton Agar* yang telah diinokulasi bakteri *Staphylococcus aureus*, kemudian masing-masing larutan ekstrak dimasukkan ke dalam sumuran sebanyak 50–100 μL secara aseptis. Cawan dibungkus menggunakan wrap dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, setelah itu diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran diukur dalam satuan mm menggunakan jangka sorong.

j. Analisis Data

Data hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dianalisa secara statistik dengan menggunakan metode *One Way ANOVA* (analisa varians satu arah) dengan program SPSS dengan taraf kepercayaan 95% atau $\alpha = 0,05$. Data awal tidak memenuhi uji homogenitas atau normalitas (Levene, $p < 0,05$), sehingga dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Dun Test, Apabila terdapat perbedaan yang signifikan, maka dilakukan uji lanjut Mann-Whitney untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Jika uji normalitas dan homogenitas menunjukkan data normal serta homogen ($p > 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji lanjut Duncan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. (Sarijowan et al., 2022).

3.9 Kerangka Operasional



Bagan 3.1 Kerangka Operasional