

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah deskriptif kualitatif yang dilakukan dengan mengamati daya hambat yang terbentuk disekitar sumuran.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi, laboratorium Kimia dan laboratorium Farmasi Bahan Alam di Program studi D-III Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu

Penelitian akan dilakukan pada bulan April Tahun 2026.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) yang berada di Desa Baumata, Kecamatan Taebenu, Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur

2. Sampel dan teknik sampling

Sampel yang akan digunakan adalah daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) . Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah *purposive* sampling, dengan kriteria daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) hijau ketuaan dan segar.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah infusa daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.

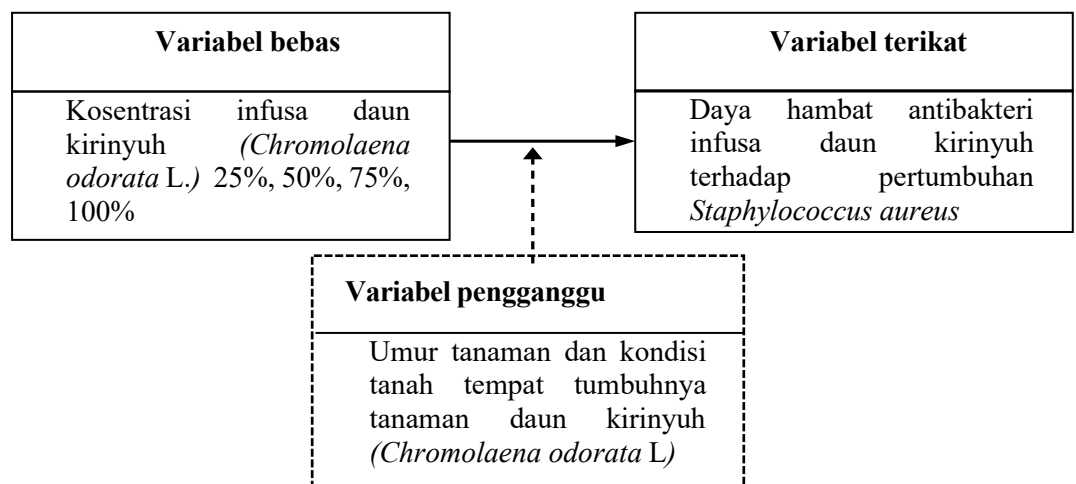
2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah daya hambat antibakteri infusa daun kirinyuh terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu adalah variabel di luar penelitian yang perlu dikendalikan oleh peneliti seperti umur tanaman dan kondisi tanah tempat tumbuhnya tanaman kirinyuh.

E. Kerangka konsep



Tabel 1. Hubungan antar variabel

Keterangan	-----	Yang diteliti
	————	Tidak diteliti

F. Defenisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

	Definisi Operasional	Alat ukur	Skala
Daya hambat	Kemampuan infusa daun kirinyuh dalam menghambat pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> yang ditunjukkan dengan zona bening disekitar area sumuran	-	Ordinal
Infusa (<i>Chromolaena odorata</i> L.)	Infusa yang diperoleh dengan cara direbus pada suhu 90°C selama 15 menit dengan konsentrasi 25%,50%,75%,100 %	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bakteri uji yang digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri yang diperoleh oleh BPOM.ATCC 6538.	-	Nominal
Diameter zona	Salah satu daerah bening disekitar sumuran yang menunjukkan bahwa tidak adanya aktivitas antibakteri dari infusa daun kirinyuh terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .	Jangka sorong	Rasio
Metode uji	Cara menguji aktivitas antibakteri dengan metode difusi sumuran.	-	Nominal

G. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang di gunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, batang pengaduk, cawan petri, pinset , erlenmeyer (Pirex), timbangan analitik, *waterbath*, gelas ukur 100 ml(Pirex), inkubator, gelas kimia 500mL (Pirex), jaum ose, *cork borer* (pelubang), corong, lemari pendingin, mikropipet 100 μ L dan 50 μ L , bunsen, kapas, pipet ukur, jangka sorong, aluminium foil, autoklaf dan kertas saring, Laminar Air Flow (LAF), *spreader*, lemari pendingin.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah sampel daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) bakteri yang di uji yaitu *Staphylococcus aureus*, alkohol 70%, Aquadest, NaCl 0,9%, medium nutrient agar (NA), spritus, aquades, McFarland, serbuk magnesium (Mg), FeCl₃, HCl.

H. Prosedur Penelitian

1. Persiapan alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam proses penelitian harus disterilkan terlebih dahulu seperti peralatan kaca disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit, dengan cara yang sama media juga dapat disterilkan. Sedangkan peralatan logam seperti jarum ose akan dipijarkan diatas api bunsen. Peralatan plastik seperti mikropipet disterilkan menggunakan menggunakan alkohol 70%.

2. Pembuatan simplisia daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.)

Daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) yang telah dikumpulkan dilakukan pengolahan sampel dengan beberapa tahap berupa sortasi basah untuk memisahkan pengotor pada daun sebelum dicuci dengan cara membuang bagian-bagian yang tidak diperlukan, pencucian dilakukan untuk menghilangkan pengotor yang masih melekat pada daun setelah sortasi basah. Daun kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Simplisia yang sudah kering di haluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan nomor mesh 60, kemudian dimasukkan ke dalam wadah kaca tertutup.

3. Pembuatan infusa daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.)

Simplisia daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dibuat 4 konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75% dan 100%. Kemudian ditimbang masing-masing sebanyak 25g, 50g, 75g, 100g. Selanjutnya panaskan aquades menggunakan *hotplate* hingga suhu aquades mencapai 90°C (yang diukur dengan termometer). Kemudian masukkan serbuk simplisia daun kirinyuh dan aquades banyak 100ml ke dalam panci infusa ditutup dan tunggu selama 15 menit sambil sesekali diaduk. Selanjutnya simplisia diangkat dan dilakukan penyaringan menggunakan kain flannel sehingga diperoleh ekstrak infusa daun kirinyuh. Jika volumenya kurang dapat di tambahkan aquades steril panas yang dilewatkan pada ampas daun kirinyuh hingga diperoleh volume infusa daun kirinyuh. Infusa daun kirinyuh di simpan dalam

wadah kaca tidak lebih dari 24 jam setelah pembuatan karena rentan terhadap cemaran mikroba (Hamzah Hasyrul *et al.*, 2021).

4. Skrining fitokimia

- a. Uji Saponin, pengujian dilakukan dengan cara mengambil sampel ekstraksi daun kirinyuh ditambahkan sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambkan 15 ml air panas, setelah itu didinginkan kemudian dikocok selama 10 sampai 20 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1 -10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 3 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya senyawa saponin. Hasil dari pengujian jika terdapat busa maka menunjukkan kandungan saponin (Wulandari & Umam, 2023).
- b. Uji Tanin, pengujian dilakukan dengan cara mengambil sampel ekstrak daun kirinyuh 5 ml diaduk dengan 10 ml aquades, disaring dan ditambahkan 3 tetes reagen FeCl_3 . Hasil akhir dari pengujian ini jika hasil menunjukkan warna hijau, biru, dan hitam maka menunjukkan kandungan tanin (Wulandari & Umam, 2023).
- c. Uji Flavonoid, pengujian dilakukan dengan cara mengambil sampel ekstrak daun kirinyuh sebanyak 5 ml dicampur dengan aquades dan dilarutkan dengan serbuk Mg sebanyak sebanyak 0,1 mg, lalu ditambahkan 3 tetes HCL sampai berubah warna. Apabila terbentuk warna orange, merah dan merah bata atau kuning berarti menandakan kandungan flavonoid (Wulandari & Umam, 2023)

d. Uji fenolik

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil sampel ekstrak daun kirinyuh sebanyak 5 ml ditambahkan larutan FeCl_3 sebanyak 3 tetes, positif adanya fenolik jika terjadi perubahan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam (Wulandari & Umam, 2023)

e. Uji senyawa Steroid dan Triterpenoid

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil sampel ekstrak daun kirinyuh ditambahkan sebanyak 5ml ke dalam gelas kimia, kemudian tambahkan 5ml kloroform dan diaduk hingga rata. Setelah itu, tambahkan 3 tetes pereaksi H_2SO_4 pekat. Jika terbentuk warna merah berarti menunjukkan adanya steroid dan jika terbentuk warna biru kehijauan berarti menunjukkan triterpenoid (Wulandari & Umam, 2023b)

5. Pembuatan media nutrient agar (NA)

Timbang 3,6 gram NA dan campurkan dengan aquades untuk membuat lapisan dasar. Kemudian masukkan kedalam erlenmeyer 250 ml. Selanjutnya gunakan *hotplate* untuk memanaskan media nutrien agar hingga larut dan mendidih. Selanjutnya proses sterilisasi media menggunakan autoklaf dengan temperatur 121°C selama 15 menit. Selanjutnya media base layer yang telah steril dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 20 ml dan dilaksanakan dalam LAF (Indrayati *et al.*, 2021)

6. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah diinokulasi diambil dengan jarum ose yang telah dipijarkan lalu disuspensikan kedalam tabung reaksi steril yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% kemudian homogenkan hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan kekeruhan larutan Mc. Farland 0,5.

7. Pembuatan media pengujian

Masing-masing 20 ml nutrien agar (NA) dituangkan kedalam 9 cawan petri sebagai media dasar, kemudian diinkubasi selama 24 jam. setelah diinkubasi, cawan petri dilubangi secara aseptik menggunakan cork borer berdiameter 5mm sehingga terbentuk sumur-sumur untuk uji antibakteri.

I. Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif kuantitatif dengan membandingkan rata-rata diameter daya hambat pada setiap konsentrasi infusa. Semakin besar diameter daya hambat yang terbentuk menunjukkan semakin kuat aktivitas antibakteri infusa daun kirinyuh terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.