

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *True Experimental Post Test only Control Group Design* dengan menggunakan metode dilusi tabung (*tube dilution test*) untuk membuktikan efektivitas ekstrak bunga tahi kotok (*Tagetes erecta L.*) sebagai antimikroba dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *In Vitro*. Metode dilusi tabung meliputi dua tahap yaitu: tahap pertama untuk menentukan kadar hambat minimal (KHM) dan tahap kedua untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Proses ekstraksi bunga tahi kotok (*Tagetes erecta L.*) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Besarnya konsentrasi yang digunakan ditetapkan melalui Uji Eksplorasi konsentrasi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di UPT Materia Medica, Jl. Lohor No. 87, Batu, Malang dan Laboratorium Mikrobiologi Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dengan pelaksanaan penelitian pada bulan Oktober s/d Desember 2015.

4.3 Sampel penelitian

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak bunga tahi kotok (*Tagetes erecta L.*) dan sampel yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus aureus* isolat *pus* dengan kepadatan bakteri 10^6 CFU/ml yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang digunakan dalam penelitian terdiri dari dua macam variabel yaitu variabel tergantung dan variabel bebas.

4.4.1 Variabel Tergantung (*Dependent*)

Variabel tergantung pada penelitian adalah pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yaitu dengan melihat kekeruhan pada tabung *broth* untuk menentukan KHM dan jumlah koloni *Staphylococcus aureus* pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*) untuk menentukan KBM.

4.4.2 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas pada penelitian adalah ekstrak etanol bunga tahi kotok (*Tagetes erecta L.*) dengan beberapa perbedaan konsentrasi. 0%, 0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.25%. Besarnya konsentrasi ekstrak didapatkan setelah melakukan penelitian pendahuluan.

4.5 Pengulangan dan Besar Sampel

Jumlah pengulangan sampel yang dipakai dalam penelitian dihitung dengan rumus sebagai berikut (Solimun, 2001):

$$p(n-1) \geq 15$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan (konsentrasi ekstrak bunga tahi kotok)

n = jumlah pengulangan sampel

Penelitian ini menggunakan 4 macam konsentrasi yang berbeda, serta satu kontrol kuman (KK) *Staphylococcus aureus* tanpa diberi ekstrak bunga tahi kotok. Maka memiliki total 5 dosis perlakuan. Jumlah sampel yang didapatkan sebagai berikut:

$$P(n-1) \geq 15$$

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4 \approx 4$$

Jadi, jumlah pengulangan sampel yang diperlukan dalam penelitian adalah minimal 4 kali pengulangan. Namun pada penelitian ini, peneliti menggunakan 5 kali pengulangan.

4.6 Definisi Operasional

- 1) Ekstrak bunga tahi kotok (*Tagetes erecta* L.) adalah hasil dari 300 gram bubuk kering bunga tahi kotok yang dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sehingga menghasilkan konsentrasi total dari ekstrak 100% yang dilakukan di UPT Materia Medica, Jl. Lohor No.87 Batu, Malang.
- 2) *Staphylococcus aureus* yang digunakan berasal dari isolat *pus* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- 3) Pengujian kepekaan antimikroba menggunakan metode dilusi tabung yang meliputi dua tahap, yaitu untuk menentukan KHM dan KBM.
- 4) Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol bunga tahi kotok (*Tagetes erecta* L.) yang mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan tidak terdapatnya kekeruhan dan menunjukkan kejernihan pertama kali pada pengujian ekstrak di media cair yang telah diberi bakteri uji, setelah diinkubasi selama 18—24 jam.

- 5) Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol bunga tahi kotok yang mampu membunuh bakteri uji *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* pada media agar padat yang telah dilakukan streaking dengan satu ose larutan ekstrak etanol bunga tahi kotok yang telah diberi bakteri uji tersebut setelah diinkubasi selama 18—24 jam dengan jumlah koloni bakteri $\leq 0,1\%$ (OI) *original inoculum*.
- 6) Original Inokulum (OI) adalah inoculum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL yang diinokulasikan pada media agar padat. OI merupakan inoculum awal dari bakteri *Staphylococcus aureus* yang sebelum diinkubasi dan digunakan untuk menentukan kategori KBM.
- 7) Pengamatan kualitatif digunakan untuk menentukan skor pertumbuhan *Staphylococcus aureus* berdasarkan bayangan tiga garis hitam yang tampak di balik tabung. Semakin rendah skor maka menunjukkan semakin efektif bahan coba. Kriteria skoring adalah:
 - 0 : jernih, ketiga garis nampak jelas
 - 1 : agak keruh, garis pertama dan kedua tampak, garis ketiga tidak tampak
 - 2 : keruh, garis pertama tampak sedangkan garis kedua dan ketiga tidak tampak
 - 3 : sangat keruh, ketiga garis tidak tampak
- 8) Pengamatan Kuantitatif digunakan untuk menentukan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* uji dengan menghitung koloni kuman dengan *colony counter*.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Bunga Tahi Kotok

Alat : toples tertutup, *Shaker* digital, botol steril untuk menampung hasil ekstrak, oven, timbangan analitik, kertas saring, labu erlenmayer, corong gelas, labu evaporator, labu penampung etanol, rotary evaporator, *water pump*, *water bath*, *vacum pump*, beaker glass, gelas ukur.

Bahan : bubuk kering bunga tahi kotok, etanol 96%.

4.7.2 Identifikasi Senyawa Fitokimia Ekstrak Bunga Tahi Kotok

Alat : objek glass, timbangan analitik, tabung reaksi, jepit tabung, bunsen, sendok obat, kertas saring, corong, gelas ukur, labu erlenmayer, pipet tetes, micro pipet, cawan porcelin.

Bahan : hasil ekstrak bunga tahi kotok, serbuk bunga tahi kotok, aquades, asam klorida 2 N, serbuk Mg, HCl, etanol 90%, FeCl_3 , CHCl_3 , H_2SO_4 , metanol.

4.7.3 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

Alat : mikroskop, gelas objek, plate steril, api bunsen, ose, minyak emersi.

Bahan : biakan murni *Staphylococcus aureus*, medium NAP (*Nutrient Agar Plate*), medium MSA (*Manitol Salt Agar*).

Bahan pewarnaan Gram : kristal violet, lugol's iodine, alkohol 96%, safranin.

Bahan tes Katalase : H_2O_2 3%.

Bahan tes Koagulase : plasma darah.

4.7.4 Pembuatan Bahan Cair Bakteri Kepadatan 10^6 CFU/mL

Alat : plate steril, *Nutrient Agar*, ose, tabung reaksi, *Nutrient broth* (NB), *micropipet*, larutan NaCl, vortex, inkubator, spektrofotometri.

Bahan : bakteri *Staphylococcus aureus* pada media agar.

4.7.5 Tube Dilution Test

Alat : tabung reaksi steril dengan label konsentrasi, *micropipet*, inkubator, vortex, bunsen (spiritus), aquadest, korek api, kapas, inkubator.

Bahan : hasil ekstrak bunga tahi kotok, perbenihan cair *Staphylococcus aureus* dengan kepadatan 10^6 CFU/mL.

4.7.6 Uji Streaking Plate

Alat : Ose, api bunsen, plate steril dengan label konsentrasi, inkubator.

Bahan : media NAP kosong, hasil inkubasi dari uji dilusi tabung, perbenihan cair bakteri 10^6 CFU/mL.

4.8 Prosedur Penelitian

a) Persiapan Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian dipersiapkan dalam keadaan steril terlebih dahulu.

b) Persiapan Bahan

- 1) bunga tahi kotok kering yang sudah halus.
- 2) NAP disterilkan kemudian dimasukkan ke dalam lemari es.
- 3) *Staphylococcus aureus* dari laboratorium mikrobiologi ditanam pada medium NAP dan *Nutrient broth* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24—48 jam.

4.8.1 Pembuatan Bentuk Sediaan Ekstrak Etanol Bunga Tahi Kotok dengan Metode Maserasi

1) Tahap Ekstraksi

- a) 8000 gram bunga tahi kotok (*Tagetes erecta L.*) yang segar dan berwarna kuning dikeringkan terlebih dahulu dengan oven pada suhu 50°C, sekitar 5 hari. Kemudian bunga tahi kotok yang sudah kering dihaluskan hingga berbentuk serbuk dengan penggilingan dan didapatkan bahan sebanyak 1000 gram bentuk bubuk halus.
- b) Bunga tahi kotok yang sudah dihaluskan diambil sebanyak 300 gram kemudian dimasukkan ke dalam toples tertutup yang dapat menampung volume sebanyak 2000ml.
- c) Rendam dengan etanol 96% hingga volumenya 1700 ml. Toples ditutup dengan rapat selama 24 jam
- d) Dikocok dengan *Shaker* digital 50rpm sampai benar-benar tercampur (± 8 jam).
- e) Campuran didiamkan selama 2 malam sampai mengendap untuk mendapatkan hasil filtrasi pertama.
- f) Campuran dipisahkan dari endapan dengan kertas saring di dalam wadah baru.
- g) Maserasi dilakukan sebanyak dua kali pada ampas dengan dimasukkan kembali ampas ke dalam toples dan ditambahkan pelarut etanol 96%. Kemudian dibiarkan semalam/ 24 jam dan dishaker. Masing-masing remaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1500ml.

- h) Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir, dijadikan satu dan siap untuk dievaporasi.

2) Tahap Evaporasi

- a) Cairan hasil filtrasi dimasukkan ke dalam labu evaporasi berukuran 1 liter, diisi sebanyak $\frac{2}{3}$ dari volume labu.
- b) Labu evaporasi dipasang pada evaporator.
- c) *Water bath* diisi dengan air sampai penuh.
- d) Semua rangkaian alat dipasang termasuk rotary evaporator, pemanas *water bath* diatur sampai suhu 60°C , dan pengatur tekanan pumping disesuaikan dengan pelarut etanol yang digunakan (sudah tersetting dalam alat), lalu disambungkan dengan aliran listrik.
- e) Larutan etanol dibiarkan sampai menguap yaitu memisahkannya pelarut dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- f) Ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu).
- g) Ekstrak cair yang dihasilkan setelah evaporasi kemudian diuapkan dengan menggunakan *water bath* selama 1 jam. Hal tersebut dilakukan untuk memastikan sisa kadar etanol pada ekstrak dapat menguap.
- h) Hasil ekstrak dimasukkan ke dalam botol plastik kemudian ditimbang dengan neraca analitik.
- i) Disimpan dalam refrigerator.

4.8.2 Identifikasi Uji Fitokimia Ekstrak Tahi Kotok

1) Uji Saponin

- a) Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian dimasukkan di dalam tabung reaksi.
- b) Ditambahkan 10 ml aquades yang sudah mendidih kemudian diaduk hingga larut.
- c) Kocok sekuat-kuatnya selama 10 detik. Dilihat apakah terbentuk busa setinggi 1—10 cm dan tidak hilang selama kurang dari 10 menit.
- d) Ditambahkan asam klorida 2 N sebanyak 1 tetes. Amati apakah busa menghilang atau tidak.
- e) Hasil saponin (+), jika didapatkan busa setinggi 1—10 cm yang stabil.

2) Uji Flavonoid

- a) Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- b) Serbuk Mg 5 mg, HCl 1 ml, dan etanol 90% ditambahkan sebanyak $\pm \frac{1}{2}$ dari larutan.
- c) Kocok dengan kuat dan larutan dibiarkan memisah. Amati perubahan yang terjadi.
- d) Hasil flavonoid (+), jika larutan yang memisah berwarna merah oranye.

3) Uji Tanin

- a) Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- b) Aquades ditambahkan sebanyak 20 ml. Diaduk hingga larut
- c) Dididihkan diatas api bunsen. Sesudah mendidih larutan dituang di cawan porcelen
- d) Tetesi FeCl_3 0,1% 1—2 tetes. Hasil perubahan warna diamati.
- e) Hasil tanin (+), jika warna berubah menjadi hijau kecoklatan atau biru kehitaman.

4) Uji Terpenoid

- a) Serbuk bunga tahi kotok dtimbang sebanyak 0.8 gram kemudian dilarutkan dalam 10 ml metanol. Diaduk hingga benar-benar tercampur.
- b) Ekstrak disaring dan diambil 5 ml ke dalam tabung. CHCl_3 (kloroform) dan 3 ml H_2SO_4 (asam sulfat pekat) ditambahkan 2 ml secara hati-hati.
- c) Amati perubahan warna. Hasil positif jika didapatkan formasi merah kecoklatan.

4.8.3 Identifikasi Ulang *Staphylococcus aureus*

Sebelum digunakan untuk pengujian, bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh diidentifikasi ulang. Identifikasi *Staphylococcus aureus* dapat dilakukan dengan beberapa cara yakni pewarnaan Gram dan uji Katalase.

1) Prosedur Pewarnaan Gram

- a) Isolat bakteri diambil untuk membuat sediaan apusan di atas permukaan objek gelas kemudian dikeringkan dan dilakukan fiksasi diatas api.
- b) Sediaan dituangi Kristal violet selama 1 menit, kemudian sisa dari tetesan violet dibuang dan dibilas dengan air. Kristal violet berfungsi sebagai bahan warna dasar.
- c) Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit, kemudian sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- d) Sediaan dituangi dengan alkohol 96% selama 5—10 detik atau sampai warna cat luntur, kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- e) Sediaan dituangi dengan safranin selama 30 detik kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air. Safranin berfungsi sebagai warna pembanding.
- f) Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, dituangi minyak emersi dan dapat dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x. Amati adanya bakteri Gram positif (berwarna ungu), berbentuk kokus, dan bergerombol.

2) Penanaman Bakteri di Media MSA (*Mannitol Salt Agar*)

- a) Sediakan perbenihan cair bakteri dan plate kosong yang sudah berisi media MSA.
- b) Sebanyak satu ose bakteri diambil kemudian distreaking pada media MSA.

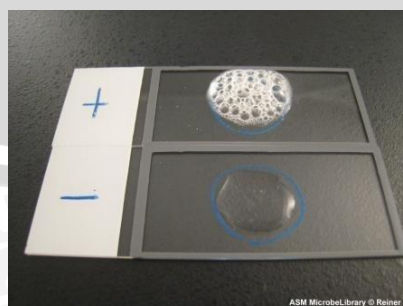
- c) Media yang berisi isolat bakteri diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18—24 jam.
- d) Pertumbuhan pada media tersebut diamati. Koloni yang ditanam pada media MSA akan berwarna kuning hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri tersebut dapat memfermentasikan manitol.

3) Penanaman Bakteri di Media NAP (*Nutrient Agar Plate*)

- a) Sediakan perbenihan cair bakteri dan plate kosong yang sudah berisi media NAP.
- b) Sebanyak satu ose bakteri diambil kemudian distreaking pada media NAP.
- c) Media yang berisi isolat bakteri diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18—24 jam.
- d) Pertumbuhan pada media tersebut diamati. Koloni yang ditanam pada media NAP menunjukkan pigmen kuning keemasan.

4) Tes Katalase

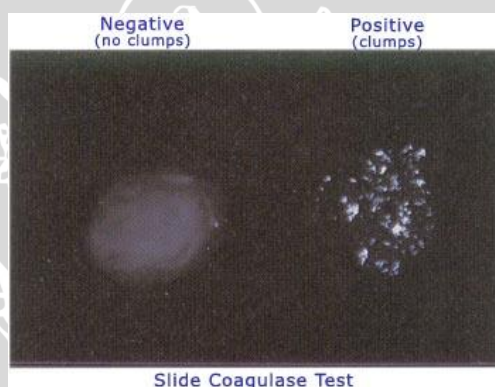
- a) Sediaan perbenihan cair bakteri ditetaskan pada objek gelas.
- b) Sediaan ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3%.
- c) Perhatikan ada tidaknya gelembung udara yang terjadi. Apabila terjadi gelembung udara maka uji katalase dikatakan positif.



Gambar 4.1 Tes Katalase *Staphylococcus aureus* pada Slide Mikroskop yang Menunjukkan Reaksi Positif (Rainer, 2010)

5) Tes Koagulase

- Sediaan pada media plasma diambil dan diletakkan pada objek glass sebanyak 1—2 tetes.
- Bakteri dari NAP diambil menggunakan ose dan dioleskan pada objek glass yang sudah ditetesi plasma.
- Reaksi aglutinasi diamati selama ± 20 detik.
- Hasil dikatakan positif apabila terjadi aglutinasi atau penggumpalan, berarti menandakan bakteri tersebut mempunyai potensi menjadi patogen invasif.



Gambar 4.2 Tes Koagulase *Staphylococcus aureus* pada Slide Mikroskop yang Menunjukkan Reaksi Positif disertai Gumpalan (Acharya, 2012)

4.8.4 Pembuatan Perbenihan Bakteri Kepadatan 10^6 bakteri/ml

- Pada hari pertama, koloni *Staphylococcus aureus* yang sudah di stok pada medium NAP (*Nutrient Agar plate*) diambil sebanyak 1 ose untuk dibiakkan di medium *Nutrient broth* sebanyak 10 ml.
- Tabung reaksi divortex kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18—24 jam.
- Pada hari kedua, spektrofotometri pada tabung reaksi dilakukan pada panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui kepadatan bakteri ($\text{OD} =$

Optical Density). Untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10^8 CFU/ml setara dengan OD = 0,1 dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan:

N_1 = hasil spektrofotometri

V_1 = volume bakteri suspensi yang diambil (ml)

N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^8 CFU/ml pada panjang gelombang 625 nm)

V_2 = volume keseluruhan dalam tabung (ml)

- d) Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume bakteri (ml) yang akan ditambah pengencer NaCl untuk mendapatkan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml.
- e) Dari 10 ml bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl 0,9% sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^7 CFU/ml.
- f) Ambil 1 ml dari larutan bakteri dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml kemudian masukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml *nutrient broth* sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/ml.
- g) Larutan bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml siap untuk digunakan penelitian.

4.8.5 Uji Sensitivitas Antimikroba (Uji Dilusi Tabung)

- a) Sediakan 5 tabung reaksi steril, 4 tabung sebagai uji bakteri (0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.25%), 1 tabung sebagai kontrol positif (KK = 0) diberi label pada tabung sesuai konsentrasi ekstrak yang telah ditentukan.
- b) Pengenceran ekstrak dilakukan menggunakan aquades menjadi konsentrasi 0.5% sebanyak 5 ml, untuk mempermudah hitungan ekstrak saat dimasukkan ke dalam tabung sesuai konsentrasi.
- c) Sebanyak 1 ml suspensi bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/ml dimasukkan ke dalam masing-masing tabung. Untuk konsentrasi 0% dimasukkan 2 ml suspensi bakteri, tanpa diberikan tambahan aquades maupun ekstrak.
- d) Sesuai konsentrasi ekstrak yang telah ditentukan. Untuk mendapatkan masing-masing konsentrasi tersebut maka harus ditambahkan pengencer aquadest sesuai proporsi konsentrasi ekstraknya sehingga total volume yang dihasilkan sebanyak 1ml.
- e) Dengan demikian tiap-tiap tabung uji berisi total larutan sebanyak 2 ml.
- f) Seluruh tabung divortex kemudian diinkubasikan selama 18—24 jam pada suhu 37°C .
- g) Untuk menentukan *Original inoculum* bakteri, sebanyak satu ose dari perbenihan cair bakteri 10^6 CFU/ml ditanam di media NAP dan diinkubasi selama 18—24 jam pada suhu 37°C .
- h) Dihari kedua semua tabung dikeluarkan dari inkubator, 4 tabung perlakuan dibandingkan kekeruhannya dengan tabung KK (0%) untuk menentukan KHM. Pada semua tabung derajat kekeruhan diperhatikan dan dicatat serta diberi nilai skoring.

- i) Seluruh tabung divortex kembali. Pada masing-masing tabung 0%, 0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.25%, diambil sebanyak 1 ose untuk ditanam (digoreskan) pada NAP kemudian dinkubasi pada suhu 37°C selama 18—24 jam.
- j) Pada hari ketiga dilihat ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri. Pada masing-masing plate konsentrasi dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh dengan *colony counter*. Data KBM ditentukan dengan tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh pada NAP atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di *original inoculum*.

Tabel 4.1 Persiapan Uji Dilusi Tabung

Tabung	Konsentrasi	Ekstrak + Aquades	Suspensi Uji 10 ⁶ CFU/ml	Total
1	0.25%	0.5 ml + 0,5 ml	1 ml	2 ml
2	0.2%	0.4 ml + 0.6 ml	1 ml	2 ml
3	0.15%	0.3 ml + 0.7 ml	1 ml	2 ml
4	0.1%	0.2 ml + 0.8 ml	1 ml	2 ml
5	0%	-	2 ml	2 ml

4.9 Analisis Data

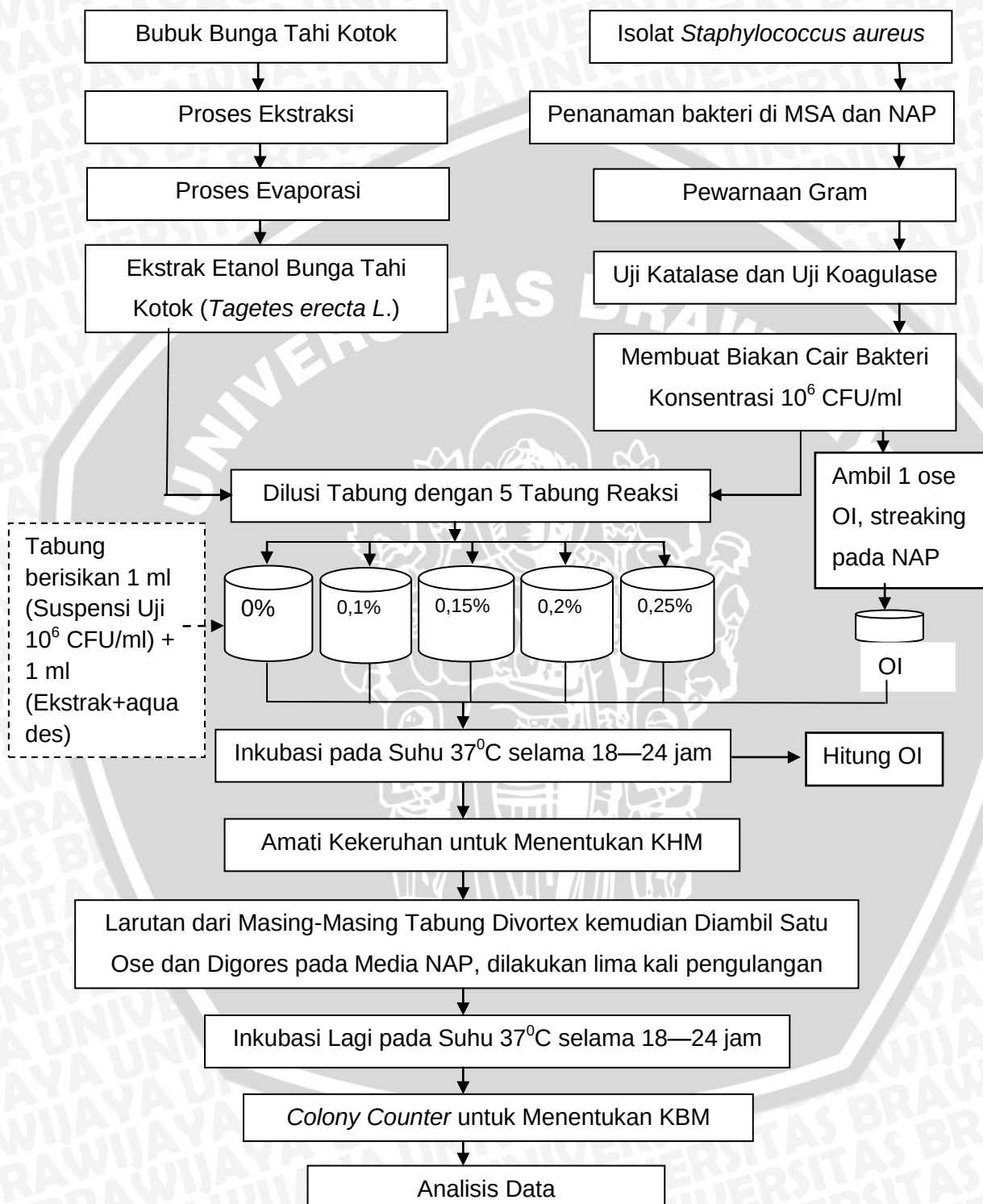
Hasil data yang didapatkan setelah dilakukan pengamatan akan dianalisis menggunakan analisis statistik, *IBM SPSS (Statistical Products and Service Solutions) Statistics* versi 22.0 for Windows. Data yang diperoleh untuk uji statistik adalah data konsentrasi bunga tahi kotok (*Tagetes erecta* L.) dan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus*. Dalam perhitungan hasil penelitian ini digunakan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Data hasil perhitungan rerata koloni dianalisa terlebih dahulu dengan Uji Normalitas dan Uji Homogenitas. Jika dari kedua uji tersebut, didapatkan hasil sebaran data tidak normal dan varian data tidak homogen, maka digunakan uji non parametrik. Data statistik

parametrik menggunakan metode *One Way ANOVA* pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan Data statistik nonparametrik menggunakan metode Analisis *Kruskal Wallis*.

Pada uji statistik parametrik, Uji ANOVA satu arah berfungsi untuk mengetahui perbedaan signifikansi dilihat dari apakah pemberian ekstrak etanol bunga tahi kotok menyebabkan penurunan koloni *Staphylococcus aureus* secara signifikan ($p < 0,05$). Kemudian dilakukan analisis *Post Hoc Test (Tukey Test)* untuk mengetahui perlakuan mana saja yang menyebabkan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan perbedaan bermakna dan tidak bermakna. Untuk mengetahui kekuatan dan keeratan hubungan pemberian perlakuan konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni *Staphylococcus aureus* dapat dilakukan dengan uji korelasi. Dan uji regresi, untuk mengetahui pengaruh pemberian perlakuan terutama yang disebabkan oleh pemberian ekstrak etanol bunga tahi kotok terhadap koloni bakteri *Staphylococcus aureus*.

Pada uji non parametrik, Uji Analisis Kruskal Wallis digunakan untuk menilai pengaruh dari variabel independen dan dependen secara bersama-sama dari antarkelompok perlakuan yang berpengaruh secara bermakna atau tidak bermakna dengan nilai signifikansi <0.005 . Untuk mengetahui antar kelompok perlakuan mana saja yang memiliki pengaruh secara bermakna (signifikan) dilanjutkan dengan uji analisis Mann-Whitney. Uji Korelasi Spearman's Rho digunakan untuk mengetahui hubungan bermakna antara pemberian ekstrak etanol bunga tahi kotok dengan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.10 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.3 Alur kerja Penelitian

Keterangan:



: alur proses



: kegiatan



: plate



: tabung reaksi