

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

1. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang diterapkan ialah *True Experimental* yang dimana penelitian berikut dapat mengontrol semua variabel yang mempengaruhi, sampel yang diterapkan dalam eksperimen maupun kelompok kontrol (berupa kontrol positif dan negatif) diambil secara acak (random) dari populasi tertentu (Abdullah *et al.*, 2022).

2. Desain penelitian

Desain penelitian yang diterapkan ialah Posttest Only Control Group Design. Terdapat dapat dua jenis kelompok yang dipilih secara random didalam penelitian berikut, yakni pada kelompok eksperimen yang dimana kelompok ini akan diberikan treatment/perlakuan khusus dan kelompok kontrol berupa kontrol positif dan negatif (Abdullah *et al.*, 2022). Bentuk rancangan pada penelitian berikut dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 2
Rancangan Penelitian

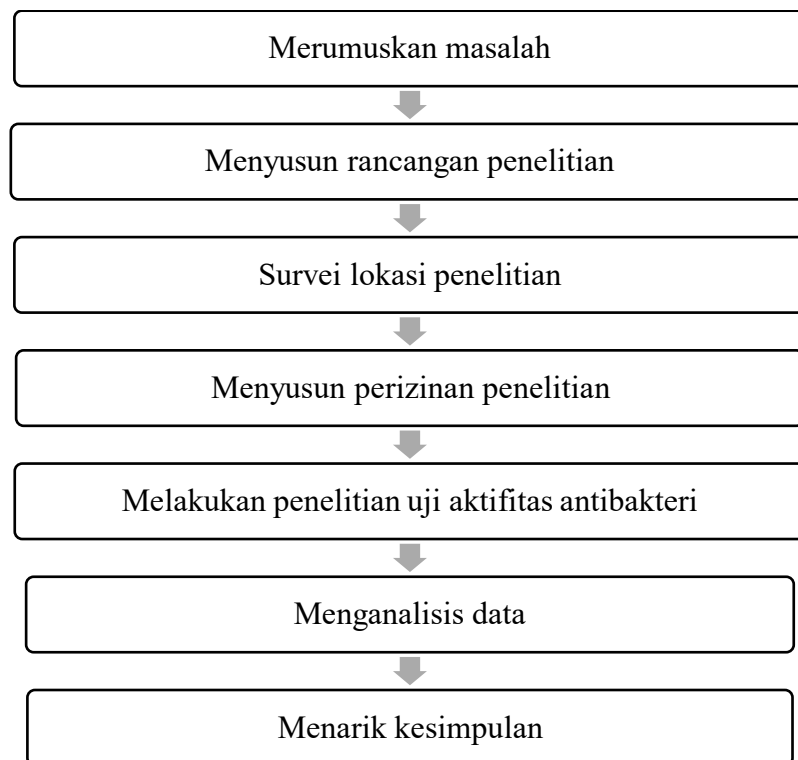
Perlakuan		Posstest
R1 (Kelompok Eksperimen)	X	02
R2 (Kelompok Kontrol)	-	02

Keterangan :

- R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen, didalam penelitian berikut yakni air perasan jeruk nipis dan *hand sanitizer*

- R2 (Random 2) : Kelompok kontrol, didalam penelitian berikut ialah aquadest dan kloramfenikol
- X (Exposure) : Perlakuan (Intervensi)
- 02 (Observasi) : Diameter zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus*

B. Alur penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes
Denpasar bagian Bakteriologi.

2. Waktu penelitian

Penelitian berikut dilakukan pada bulan September 2024 sampai bulan April
2025

D. Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Unit analisis didalam penelitian berikut ialah zona hambat bakteri
Staphylococcus aureus yang dihasilkan oleh perlakuan air perasan jeruk nipis
dan *hand sanitizer*.

2. Sampel

Sampel didalam penelitian berikut yakni buah jeruk nipis yang tumbuh di
kota Denpasar Selatan dan hand sanitaize yang dijual pada supermarket di
Denpasar Selatan. Adapun kriteria sampel pada penelitian berikut yakni:

a. Kriteria inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian berikut yakni buah jeruk nipis yang segar,
dalam kondisi baik, memiliki warna kulit hijau segar tanpa noda kekuningan
ataupun tanda-tanda pembusukan, berasal dari tumbuhan yang sama, memiliki
ukuran diameter buah berkisar diantara 4-5 cm, dipanen 1 hari sebelum
penelitian untuk menjaga kesegaran, dan belum mengalami pengolahan kimia.
Sedangkan untuk *hand sanitizer* yakni memiliki kandungan alkohol minimal
70% ataupun formula yang sesuai untuk pembunuhan bakteri ataupun virus,

merek yang sudah diakui dan lulus uji Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM).

b. Kriteria eksklusi

Sedangkan kriteria eksklusi yakni buah jeruk nipis yang mengindikasikan tanda-tanda kerusakan fisik, pembusukan, sudah melalui proses pengawetan ataupun perlakuan kimia lainnya, dan berasal dari lokasi berbeda. Untuk *hand sanitizer* yakni memiliki kandungan alkohol di bawah 70%, ataupun yang tidak memiliki bahan aktif pengganti yang cukup efektif, produk yang tidak memiliki izin dari BPOM ataupun lembaga pengawas terkait yang diakui, dan produk yang sudah melewati tanggal kadaluarsa, yang berpotensi menurunkan efektivitas bahan aktif.

3. Besar Sampel

Dalam melakukan percobaan laboratorium, diperlukan suatu pengulangan terhadap pengujian ataupun percobaan yang dilakukan. Hal ini bertujuan agar percobaan yang dilakukan memiliki ketelitian yang tinggi. Semakin banyak pengulangan, maka akan semakin tinggi juga ketelitian percobaan tersebut. Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam suatu percobaan ditentukan berdasarkan rumus Federer (Indratama and Yenita, 2019).

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

Keterangan:

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan yang sudah dilakukan maka diketahui pada penelitian berikut diperlukan minimal pengulangan 4 kali pada setiap variasi sampel. Didalam penelitian berikut menerapkan 6 perlakuan sampel, yakni air perasan jeruk nipis konsentrasi 45%, 60%, 75%, dan *hand sanitizer* konsentrasi 45%, 60%, 75%. Dengan perhitungan diatas, maka dapat disimpulkan jumlah total pada penelitian berikut yakni 24 sampel.

4. Alat dan Bahan

a. Alat

Didalam penelitian berikut, adapun alat yang diterapkan yakni: autoklaf, oven, cawan petri, jangka sorong, pipet tetes, mikropipet, swab steril, inkubator, gelas ukur, erlenmeyer, Bio Safety Cabinet (BSC), kertas saring, kertas cakram, tabung reaksi, vortex mixer, batang pengaduk, Mc. Farland, ose steril.

b. Bahan

Didalam penelitian berikut, adapun bahan yang diterapkan yakni: air perasan jeruk nipis konsentrasi 45%, 60%, 75%, *hand sanitizer* konsentrasi 45%, 60%, 75%, kloramfenikol, media MHA, NaCl 0,9%, bakteri *Staphylococcus aureus*, akuades

5. Prosedur kerja

a. Sterilisasi alat

Peralatan laboratorium terlebih dahulu dibersihkan dan dikeringkan sebelum proses sterilisasi. Cawan petri dibungkus menerapkan kertas koran,

sementara tabung reaksi dan pipet tetes ditutup dengan kapas, lalu dibungkus satu per satu dengan kertas koran. Selanjutnya, alat-alat tersebut disterilkan dalam oven pada suhu 160°C selama satu jam. Untuk Erlenmeyer dan gelas ukur, mulutnya ditutup dengan kapas dan dibungkus kertas koran sebelum disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 lbs (Wulandari *et al.*, 2021).

b. Pembuatan media MHA

Media Mueller-Hinton Agar (MHA) dilarutkan dalam akuades, lalu dipanaskan sambil diaduk hingga mencapai titik didih. Sesudah itu, media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sesudah sterilisasi selesai, media didinginkan hingga suhu mencapai 45°C sebelum dituangkan ke dalam cawan petri (Wulandari *et al.*, 2021)

c. Preparasi sampel

Buah jeruk nipis yang masih segar dikumpulkan dan dipilih secara selektif. Sesudah itu, buah dicuci hingga bersih, lalu dipotong menjadi dua bagian. Proses ekstraksi dilakukan dengan memeras buah menerapkan alat perasan jeruk, kemudian air perasan disaring menerapkan kertas saring. Larutan perasan jeruk nipis ini selanjutnya disiapkan dalam berbagai konsentrasi, yakni 45%, 60%, dan 75%. Begitupun dengan *hand sanitizer* disiapkan dalam berbagai konsentrasi 45%, 60%, dan 75%. Kertas cakram kemudian direndam dalam larutan perasan jeruk nipis dan *hand sanitizer*. Pembuatan konsentrasi air perasan jeruk nipis dibuat menerapkan rumus (Wibisono *et al.*, 2023):

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan:

M_1 : Konsentrasi awal

V_1 : Volume sampel yang dicari

M_2 : Konsentrasi yang dicari

V_2 : Volume akhir yang diinginkan

Maka Perhitungannya sebagaimana dibawah:

Tabel 3
Perhitungan konsentrasi

No	Konsentrasi	Rumus dan Perhitungan	Keterangan
1	2	3	4
1	Konsentrasi 45%	$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ $100\% \times V_1 = 45\% \times 10 \text{ ml}$ $V_1 = \frac{45\% \times 10 \text{ ml}}{100\%} = 4,5 \text{ ml}$	Pembuatan konsentrasi 45% sebanyak 10 ml diperlukan 4,5 ml sampel dan 5,5 ml aquades
2	Konsentrasi 60%	$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ $100\% \times V_1 = 60\% \times 10 \text{ ml}$ $V_1 = \frac{60\% \times 10 \text{ ml}}{100\%} = 6 \text{ ml}$	Pembuatan konsentrasi 60% sebanyak 10 ml diperlukan 6 ml sampel dan 5,5 ml aquades
3	Konsentrasi 75%	$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ $100\% \times V_1 = 75\% \times 10 \text{ ml}$ $V_1 = \frac{75\% \times 10 \text{ ml}}{100\%} = 7,5 \text{ ml}$	Pembuatan konsentrasi 75% sebanyak 10 ml diperlukan 7,5 ml sampel dan 2,5 ml aquades

d. Pembuatan kontrol positif dan negatif

Pembuatan kontrol positif menggunakan antibiotik kloramfenikol yang dimana satu kapsul kloramfenikol dengan dosis 250 mg dilarutkan dalam 20 mL etanol 96% untuk menghasilkan larutan stok dengan konsentrasi 12.500 µg/mL. Larutan ini kemudian diteteskan sebanyak 2,4 µL ke atas cakram kertas steril menggunakan mikropipet, sehingga tiap cakram mengandung dosis akhir sebesar 30 µg kloramfenikol. Cakram kemudian dikeringkan di cawan petri steril sebelum digunakan dalam uji zona hambat. Kemudian untuk kontrol negatif dibuat dengan meneteskan aquades steril sebanyak 2,4 µL ke atas

cakram kertas steril, tanpa penambahan zat antibakteri. Cakram kemudian dikeringkan di cawan petri steril dan digunakan sebagai pembanding untuk memastikan bahwa zona hambat yang dihasilkan pada perlakuan lain benar-benar disebabkan oleh aktivitas antibakteri zat uji, bukan oleh pelarut atau media cakram itu sendiri.

e. Pembuatan suspensi bakteri

Koloni bakteri dimasukkan ke dalam larutan NaCl fisiologis dalam tabung reaksi steril. Larutan tersebut kemudian dihomogenkan menerapkan vortex mixer. Kekeruhan suspensi diukur dengan membandingkannya terhadap standar McFarland 0,5% (Apriani *et al.*, 2023)

f. Uji daya hambat

Suspensi bakteri diinokulasikan secara merata ke permukaan media MHA menggunakan cotton swab steril. Kertas cakram yang sudah ditetaskan dalam larutan perasan jeruk nipis dan *hand sanitizer* kemudian diletakkan di atas media. Sesudah itu, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram diukur menerapkan jangka sorong (Apriani *et al.*, 2023).

g. Analisis data

Data diameter zona hambat dari masing-masing perlakuan dianalisis menerapkan twoway anova untuk menentukan perbedaan signifikan diantara air perasan jeruk nipis dan *hand sanitizer* dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang diterapkan didalam penelitian berikut ialah data primer, yakni data yang diperoleh secara langsung melalui observasi oleh peneliti. Data primer didalam penelitian berikut mencakup pengukuran zona hambat yang dihasilkan oleh air perasan jeruk nipis dan *hand sanitizer* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

2. Cara pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan melalui metode observasi. Peneliti mengamati dan mencatat zona hambat yang terbentuk akibat paparan air perasan jeruk nipis dan *hand sanitizer* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

3. Instrumen pengumpul data

Instrumen yang diterapkan didalam penelitian berikut meliputi alat tulis, kamera untuk dokumentasi, serta berbagai alat laboratorium yang diperlukan dalam proses uji antibakteri.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian di laboratorium diolah dengan teknik tabulasi, di mana data disajikan dalam bentuk tabel untuk mempermudah analisis. Selain itu, data juga dianalisis secara deskriptif untuk memberikan gambaran mengenai pengaruh air perasan jeruk nipis dan *hand sanitizer* terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

2. Analisis Data

Analisis data dapat diartikan sebagai proses pengolahan data hasil penelitian menjadi informasi yang berguna dalam pengambilan kesimpulan (Abdullah *et al.*, 2022). Didalam penelitian berikut, uji normalitas dilakukan untuk memastikan distribusi data yang diperoleh sesuai dengan asumsi statistik yang diterapkan (Quraisy, 2022).

a. Uji *Shapiro-wilk*

Uji normalitas didalam penelitian berikut menerapkan metode *Shapiro-Wilk*, yang dikembangkan oleh *Shapiro* dan *Wilk*. Metode ini ialah teknik yang valid dan efektif untuk menganalisis distribusi data dalam sampel kecil (kurang dari 50 sampel) (Quraisy, 2022). Oleh sebab itu, Uji *Shapiro-Wilk* disarankan untuk diterapkan pada data dengan jumlah sampel di bawah 50 ($N < 50$). Data dikatakan berdistribusi normal apabila nilai signifikansi yang diperoleh lebih besar dari 0,05 (sig. $> 0,05$). Jika data berdistribusi normal dilanjutkan dengan *Uji Two Away Anova* dan jika data tidak berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji non-parametrik, yaitu *Friedman Test* dan *Kruskal-Wallis Test*

b. Uji *two-way anova*

Two-Way ANOVA adalah sebuah teknik statistik yang digunakan untuk menguji pengaruh dari dua faktor atau variabel bebas (independen) terhadap satu variabel dependen (response variable). Teknik ini memungkinkan untuk mengevaluasi efek masingmasing faktor secara individual serta interaksi antara kedua faktor tersebut terhadap variabel dependen. Hasil *Two-Way ANOVA* memberikan informasi tentang apakah terdapat efek signifikan dari masing-

masing faktor secara individual, serta apakah terdapat interaksi antara kedua faktor tersebut yang signifikan terhadap variabel dependen (Dianty *et al.*, 2024).

G. Etika Penelitian

Etika berasal dari bahasa Yunani *ethos*, yang dalam pengertian etimologis berarti kebiasaan ataupun peraturan perilaku yang diterapkan dalam suatu masyarakat. Dalam konteks penelitian, etika berfungsi sebagai pedoman dalam menentukan aspek yang diperbolehkan ataupun tidak, serta membedakan tindakan yang dianggap baik ataupun buruk. Etika penelitian mencakup prinsip moral yang membantu menilai kelayakan suatu penelitian. Tindakan yang dianggap melanggar etika penelitian meliputi fabrikasi (pembuatan data palsu), falsifikasi (manipulasi data), dan plagiarisme (pengambilan karya orang lain tanpa izin ataupun tanpa menyebutkan sumbernya). Beberapa prinsip dasar dalam etika penelitian ilmiah meliputi: kejujuran, objektivitas, integritas, ketelitian, ketepatan, verifikasi, penghargaan, tanggung jawab sosial, publikasi yang terpercaya, kompetensi, dan legalitas (Saidin and Jailani, 2023).