

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif dengan desain *True Experimental Design*. *True Experimental Design* adalah jenis desain penelitian eksperimen yang melibatkan penerapan perlakuan pada kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, di mana peneliti dapat mengendalikan semua variabel eksternal yang berpotensi mempengaruhi hasil eksperimen. (Sugiyono, 2016). Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Posttest-Only Control Design*. Bentuk rancangan penelitian adalah sebagai berikut :

Tabel 2
Rancangan Penelitian

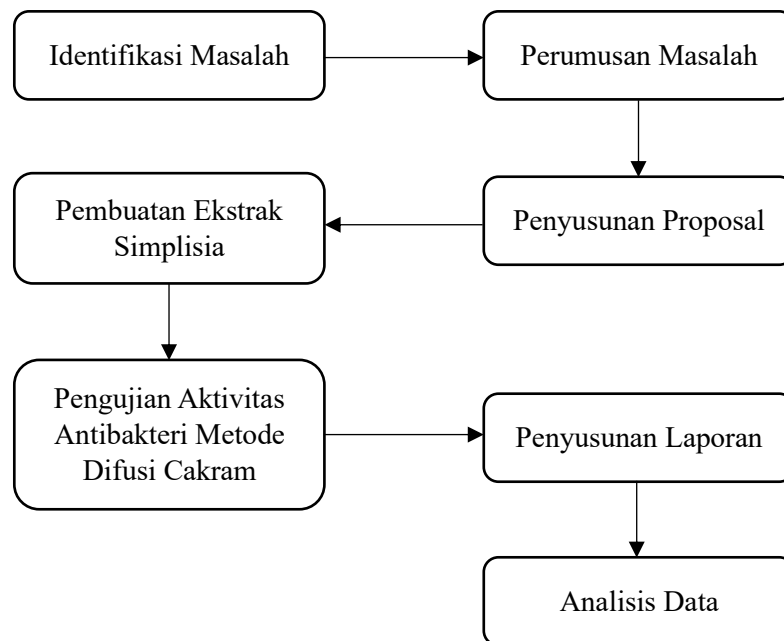
Kelompok	Perlakuan	<i>Posttest</i>
R ₁	X	O ₁
R ₂	Kontrol	O ₂

Keterangan :

- R₁ (*Random 1*) : Kelompok eksperimen. Dalam penelitian ini kelompok eksperimennya adalah ekstrak etanol bawang putih dengan konsentrasi 10, 15, 20 dan 25%.
- R₂ (*Random 2*) : Kelompok kontrol. Dalam penelitian ini kelompok kontrolnya adalah etanol 96% sebagai kontrol negatif dan antibiotik kloramfenikol sebagai kontrol positif
- X (*Exposure*) : Perlakuan

- O₁ : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada kelompok eksperimen.
- O₂ : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada kelompok control.

B. Alur Penelitian



Gambar 5 Alur penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Udayana.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2024 - Mei 2025.

D. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bawang putih yang didapatkan di daerah Kintamani, Bangli.

2. Unit analisis

Unit analisis dari penelitian ini adalah zona hambat yang muncul sebagai respon dari pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* terhadap berbagai variasi konsentrasi ekstrak etanol bawang putih yang dibuat dalam empat konsentrasi yaitu 10, 15, 20 dan 25%.

3. Teknik pengambilan sampel

Bawang putih yang dipilih berdasarkan kriteria yang telah ditetapkan oleh peneliti yaitu :

a. Kriteria inklusi

Kriteria inklusi dalam penelitian ini mencakup bawang putih yang segar dan berkualitas baik, tanpa adanya kerusakan fisik seperti busuk atau bercak. Bawang putih yang digunakan harus dalam kondisi matang, karena kandungan *allicin* yang lebih tinggi pada bawang putih matang dapat memengaruhi daya hambat. Selain itu, bawang putih yang digunakan harus bebas dari pengawet untuk memastikan tidak ada bahan kimia yang memengaruhi hasil penelitian.

b. Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi dalam penelitian ini mencakup bawang putih yang busuk, bawang putih yang disimpan terlalu lama, bawang putih yang mengalami kerusakan fisik, dan bawang putih yang masih terlalu muda

4. Jumlah dan besar sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 3 kilogram bawang putih, kemudian disortasi basah, dikeringkan menggunakan oven lalu diblender sehingga diperoleh serbuk simplisia. Kemudian serbuk simplisia dilarutkan dengan etanol 96% lalu dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* untuk memperoleh ekstrak pekat

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol bawang putih dengan konsentrasi 10%, 15%, 20%, dan 25%, yang diperoleh melalui pengenceran stok sampel dengan konsentrasi 100% menggunakan pelarut etanol 96%. Dengan demikian, total perlakuan yang dilakukan berjumlah tiga perlakuan.

Untuk pengulangan tiap perlakuan, penulis melakukan pengulangan empat kali pengulangan. Menurut Hanafiah, (2016). jumlah minimal pengulangan untuk percobaan laboratorium adalah cukup tiga kali pengulangan, dengan demikian maka pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sudah memenuhi syarat.

5. Alat dan bahan

a. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri, autoklaf, mikropipet, gelas ukur, gelas beaker, labu erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, bunsen spiritus, ose, pinset, blender, neraca analitik, hotplate, magnetic stirrer, McFarland densitometer, inkubator, biosafety cabinet, dan rotary evaporator.

b. Bahan

Bawang putih, etanol 96%, bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, cakram disk kosong, kertas saring, cakram kloramfenikol, aluminium foil, NaCl 0,9%, media MHA, media NA, aquadest steril. lidi kapas steril, alkohol 70%

6. Prosedur kerja

a. Pembuatan simplisia

Berikut adalah prosedur pembuatan simplisia bawang putih yang diadaptasi dari (Dewi dkk., 2021)

- 1) Menyiapkan 3 kilogram bawang putih, kemudian dibersihkan dan dikupas dari kulit luar.
- 2) Bawang putih dipotong kecil-kecil dan kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C hingga benar-benar kering.
- 3) Setelah proses pengeringan selesai, simplisia yang telah kering diblender dan disaring untuk memperoleh serbuk yang halus.

b. Pembuatan ekstrak pekat 100%

Berikut adalah prosedur pembuatan ekstrak bawang putih dengan cara maserasi, yang diadaptasi dari (Rajab S dkk., 2021) :

- 1) Sebanyak 300 g serbuk simplisia bawang putih dimasukkan ke dalam Erlenmeyer.
- 2) Serbuk simplisia direndam dengan 1,5 L larutan etanol 96%, kemudian wadah ditutup dengan aluminium foil.
- 3) Larutan tersebut dibiarkan selama 3 x 24 jam sambil sesekali diaduk.
- 4) Setelah waktu perendaman selesai, sampel disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan ampas.

- 5) Filtrat tersebut kemudian diuapkan menggunakan evaporator untuk memperoleh ekstrak kental bawang putih.
 - 6) Setelah penguapan, ekstrak yang dihasilkan ditimbang dan disimpan dalam wadah gelas tertutup.
 - 7) Ekstrak disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C sebelum digunakan untuk pengujian.
- c. Pembuatan ekstrak konsentrasi 10, 15, 20 dan 25%

Tabel 3

Pengenceran Konsentrasi Ekstrak

Konsentrasi	Ekstrak pekat (gr)	Etanol 96% (ml)
10%	0,2	1,8
15%	0,3	1,7
20%	0,4	1,6
25%	0,5	1,5

- d. Pembuatan media MHA

Berikut adalah prosedur pembuatan media MHA (Mueller Hinton Agar)

- 1) Menimbang sebanyak 5,7 g bubuk media MHA menggunakan neraca analitik.
- 2) Bubuk media yang telah ditimbang dipindahkan ke dalam Erlenmeyer, kemudian dilarutkan dengan 150 mL aquades.
- 3) Larutan media dipanaskan menggunakan hotplate hingga mendidih.
- 4) Larutan media disterilkan dengan cara diautoklaf pada suhu 121°C selama 25 menit.
- 5) Media dibiarkan mendingin hingga suhu mencapai 40°C.

- 6) Menuangkan larutan media yang telah didinginkan ke dalam cawan petri steril dengan volume sekitar 15 mL, kemudian biarkan hingga media memadat.
- 7) Cawan petri diletakkan dalam posisi terbalik dan, jika tidak langsung digunakan, bungkus dengan kertas buram dan simpan di dalam lemari pendingin (refrigerator).

e. Pembuatan media *Nutrient Agar*

- 1) Ditimbang media NA 2,8 gr dan larutkan dalam 100 mL akuades
- 2) Dipanaskan di atas hotplate hingga homogen, kemudian sterilkan pada autoklaf suhu 121°C selama 1 jam
- 3) Setelah sterilisasi, media dituang secara aseptis pada cawan petri steril untuk penggunaan. Sebelum menuang media, tunggu suhu media $\pm 40^{\circ}\text{C}$
- 4) dibiarkan pada suhu ruang hingga media memadat dengan sempurna (Rizki dkk., 2021).

f. Peremajaan bakteri *Escherichia coli*

- 1) Sediaan bakteri uji *Escherichia coli* yang didapat disiapkan
- 2) Koloni tunggal yang tumbuh pada media diambil menggunakan ose
- 3) Ose digoreskan pada media *Nutrient Agar*
- 4) Inkubasi media yang telah diinokulasikan bakteri pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam (Rizki dkk., 2021).

g. Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli*

Berikut adalah prosedur yang lebih terperinci untuk mengambil koloni bakteri dari biakan murni dan menyiapkan suspensi bakteri dengan konsentrasi yang sesuai:

- 1) Koloni bakteri diambil dari biakan murni menggunakan ose, kemudian suspensikan dalam tabung yang berisi 5 mL NaCl 0.9% steril.
- 2) Mengukur kekeruhan suspensi bakteri menggunakan McFarland densitometer. Konsentrasi 0,5 McFarland setara dengan $1,5 \times 10^8$ *Colony Forming Unit* (CFU)/mL.

Konsentrasi 0,5 McFarland ini sangat penting karena merupakan standar yang sering digunakan dalam berbagai eksperimen mikrobiologi untuk memastikan konsentrasi bakteri yang konsisten di setiap percobaan. (Aviany & Pujiyanto, 2020)

h. Pengujian daya hambat bakteri *Escherichia coli* terhadap ekstrak etanol bawang putih

- 1) Menyiapkan ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 10, 15 20 dan 25%, serta kloramfenikol sebagai kontrol positif dan etanol 96% sebagai kontrol negatif.
- 2) Merendam cakram disk kosong dalam masing-masing larutan ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 10, 15, 20 dan 25%.
- 3) Mencelupkan swab kapas steril ke dalam suspensi bakteri *Escherichia coli* yang memiliki kekeruhan 0,5 McFarland.
- 4) Mengusapkan swab kapas yang telah dicelupkan secara merata pada permukaan media Mueller Hinton Agar (MHA), lalu diamkan agar bakteri dapat tersebar dengan baik.
- 5) Secara aseptis, letakkan cakram disk yang telah jenuh dengan ekstrak bawang putih pada permukaan media MHA dengan jarak antar cakram minimal 15 mm untuk menghindari interaksi antar zona hambatan.

- 6) Menempatkan cakram disk yang berisi kloramfenikol sebagai kontrol kerja pada media MHA.
- 7) Menginkubasi media pada suhu 37°C selama 24 jam untuk memungkinkan pertumbuhan bakteri dan pembentukan zona hambatan.
- 8) Setelah inkubasi selesai, mengamati hasil untuk menentukan efektivitas masing-masing konsentrasi ekstrak bawang putih (10, 15, 20 dan 25%) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, serta perbandingannya dengan kontrol positif (kloramfenikol) dan kontrol negatif (etanol 96%).
- 9) Mengamati dan ukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang terbentuk. Zona bening yang muncul diukur menggunakan jangka sorong untuk mengetahui sejauh mana ekstrak dapat menghambat pertumbuhan bakteri. (Aviany & Pujiyanto, 2020)

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

a) Data primer

Data primer dalam penelitian ini mencakup pengukuran diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* pada berbagai variasi konsentrasi ekstrak bawang putih.

b) Data sekunder

Data sekunder dalam penelitian ini terdiri dari referensi-referensi yang relevan dengan topik penelitian, seperti jurnal, buku, dan e-book.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasi dan penelitian di laboratorium menggunakan metode difusi cakram

3. Instrumen pengumpulan data

Alat atau instrument adalah alat yang digunakan peneliti dalam membantu proses pengumpulan data. Penelitian dan alat ukur yang digunakan berhubungan satu sama lain, dimana hasil penelitian bergantung kepada kualitas alat dari segi ketepatan alat yang digunakan. Data yang terkumpul menjadi hal penting dari suatu hasil penelitian. Adapun instrument pengolahan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Alat tulis
- b. Kamera
- c. Laptop
- d. Alat laboratorium

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Data yang telah diperoleh dari penelitian yang dilakukan kemudian dicatat, dikumpulkan, diolah dan disajikan dalam tabulasi yaitu berupa bentuk tabel dan narasi.

2. Analisis data

a. *Shapiro – Wilk*

Uji *Shapiro - Wilk* adalah sebuah metode atau rumus perhitungan sebaran data yang dibuat oleh shapiro dan wilk. Metode *Shapiro - Wilk* adalah metode uji normalitas yang efektif dan valid digunakan untuk sampel berjumlah kecil. *Shapiro – Wilk* digunakan dalam uji normalitas apabila nilai sampel < 50 . (Quraisy, 2020)

b. *One Way- ANOVA*

Setelah memeriksa normalitas data, *ANOVA* dapat digunakan untuk menganalisis perbedaan antara lebih dari dua kelompok. Dalam konteks ini, *ANOVA* digunakan untuk menguji apakah ada perbedaan signifikan dalam daya hambat antara berbagai konsentrasi ekstrak bawang putih serta membandingkannya dengan kontrol positif dan kontrol negatif. *ANOVA* akan memberikan informasi mengenai apakah terdapat perbedaan signifikan antar kelompok berdasarkan ukuran zona hambat. (Wijaya dkk., 2024)

c. *Kruskal Wallis*

Uji *Kruskal-Wallis* merupakan metode statistik non-parametrik yang digunakan untuk menganalisis data dari sampel yang bersifat independen. Metode ini diterapkan ketika tujuan penelitian adalah untuk membandingkan dua atau lebih variabel yang diukur. Uji ini sangat berguna terutama ketika asumsi normalitas data tidak terpenuhi, sehingga prosedur statistik parametrik tidak dapat digunakan dengan tepat. *Kruskal-Wallis* memungkinkan peneliti untuk menguji apakah terdapat perbedaan signifikan antara dua kelompok atau lebih, meskipun data tersebut tidak mengikuti distribusi normal (Ostertagová dkk., 2015).

G. Etika Penelitian

Dalam penelitian ini, setiap langkah yang diambil harus dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah. Artinya, semua prosedur dan metode yang digunakan harus dapat dijelaskan secara rasional dan berbasis pada teori serta bukti yang relevan. Peneliti harus memastikan bahwa setiap keputusan yang diambil selama proses penelitian didasarkan pada pertimbangan yang matang dan sesuai dengan standar ilmiah yang berlaku.

1. Prinsip keadilan (*Justice*)

Prinsip ini berfokus pada kewajiban untuk memberikan perlakuan yang adil dan setara kepada setiap individu, dengan mempertimbangkan hak-hak mereka sesuai dengan moral yang benar, untuk memastikan bahwa mereka memperoleh apa yang layak mereka terima.

2. Prinsip bermanfaat (*Beneficence*) dan Tidak Merugikan (*Non-maleficence*)

Prinsip manfaat menekankan pentingnya memberikan manfaat sebesar-besarnya kepada seseorang dengan meminimalkan kerugian sejauh mungkin, sementara itu prinsip tidak merugikan melarang tindakan yang dengan sengaja dapat menyebabkan kerugian pada subjek penelitian.

3. Prinsip menghormati martabat manusia (*Respect for Persons*)

Prinsip ini menekankan pentingnya menghormati hak dan martabat setiap individu sebagai pribadi yang memiliki kebebasan untuk memilih dan menentukan kehendak mereka, serta bertanggung jawab penuh atas keputusan yang mereka buat.

4. Kerahasiaan (*Confidentiality*)

Kerahasiaan (*confidentiality*) merujuk pada upaya untuk tidak mengungkapkan identitas responden atau informasi apapun yang terkait dengan mereka. Data yang diperoleh selama penelitian dijaga dengan ketat dan hanya dapat diakses oleh pihak yang berwenang, tanpa melibatkan pihak luar.