

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *true experimental*, yaitu rancangan penelitian yang memungkinkan peneliti mengendalikan seluruh variabel yang dapat memengaruhi hasil penelitian. Sampel pada kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol, yang terdiri atas kontrol positif dan kontrol negatif, dipilih secara acak (*random*) dari populasi yang telah ditentukan (Abdullah *et al.*, 2022). Desain penelitian yang digunakan adalah *Posttest Only Control Group Design*. Dalam rancangan ini, subjek penelitian dibagi secara acak ke dalam dua kelompok, yaitu kelompok eksperimen yang diberikan perlakuan (*treatment*) dan kelompok kontrol yang terdiri atas kontrol positif serta kontrol negatif. (Abdullah *et al.*, 2022). Bentuk rancangan pada penelitian berikut dapat dilihat pada table berikut:

Tabel 3
Rancangan Penelitian

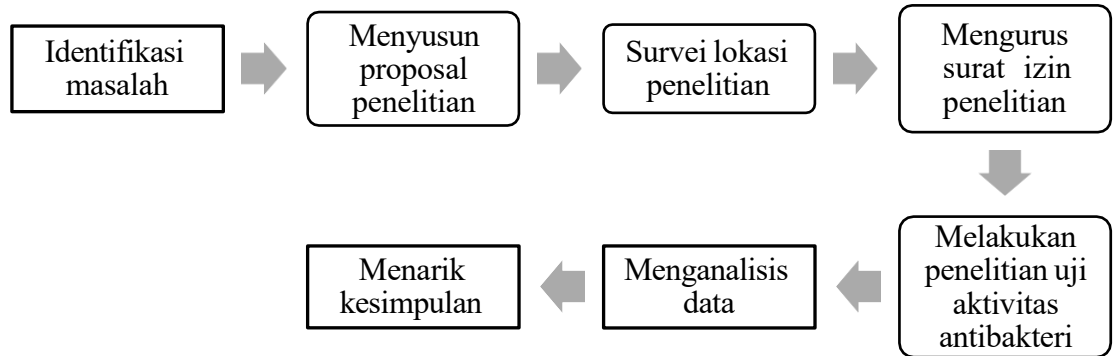
Perlakuan		Posstest
R1 (Kelompok Eksperimen)	X	02
R2 (Kelompok Kontrol)	-	02

Keterangan:

- R1 (Random 1): Kelompok eksperimen, didalam penelitian berikut yakni konsentrasi minuman tuak kelapa yaitu 50%, 40%, 30% dan 20%.
- R2 (Random 2): Kelompok kontrol, didalam penelitian berikut ialah aquades dan *Gentamicin*.
- X (*Exposure*): Perlakuan (Intervensi).
- 02 (Observasi): Diameter zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus*.

B. Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 3. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada Januari 2026 – Mei 2026.

D. Populasi dan Sampel

1. Unit analisis

Unit Analisa dari penelitian ini yaitu diameter zona hambat yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi minuman Tuak kelapa dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah minuman Tuak kelapa dibedakan menjadi 4 kelompok berdasarkan perbedaan konsentrasi perlakuan konsentrasi

50%, 40%, 30% dan 20%, di lain sisi juga ditambahkan kontrol negatif dan positif. Pada kontrol positif yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* yang dilakukan dengan antibiotic Gentamicin, di sisi lain kontrol negatif dilakukan dengan aquades. Adapun kriteria sampel pada penelitian berikut yaitu:

a. Kriteria inklusi

Kriteris inklusi pada penelitian ini adalah tuak yang berasal nira kelapa yang fermentasi dengan proses produksi yang jelas. Sampel diambil dari penjual atau produsen yang bersedia memberikan informasi waktu panen atau waktu fermentasinya. Sampel diambil dalam kondisi segar, dan disimpan selama 7 hari pada suhu ruang, Sampel tuak tidak diberikan bahan tambahan kimia industri yang dapat mempengaruhi hasil uji antibakteri.

b. Kriteria eksklusi

Sedangkan kriteria eksklusi yaitu sampel tuak dengan bau, warna atau bau busuk yang jelas menunjukkan pembusukan kontaminan (diluar fermentasi normal). Sampel yang sudah disimpan lebih dari 7 hari di suhu ruang tanpa pendinginan atau penyimpanan yang tidak dapat diverifikasi. Sampel yang mengandung alcohol komersial atau zat adiktif lainnya. Dan juga sampel yang berasal dari sumber yang menolak memberikan informasi dasar.

3. Jumlah dan besar sampel

Dalam pelaksanaan percobaan laboratorium, setiap pengujian atau perlakuan perlu dilakukan secara berulang. Pengulangan tersebut bertujuan untuk meningkatkan tingkat ketelitian dan keandalan hasil percobaan yang diperoleh. Semakin banyak jumlah pengulangan yang dilakukan, maka semakin tinggi pula tingkat ketelitian serta keakuratan hasil penelitian. Sampel yang diuji berupa minuman Tuak dengan konsentrasi 50%, 40%, 30%

dan 20%, yang diperoleh dengan mengencerkan sampel menggunakan aquades. Sebagai control positif digunakan antibiotic *gentamicin*, sedangkan control negative menggunakan aquades. Berdasarkan rancangan penelitian tersebut, jumlah seluruh perlakuan yang digunakan adalah enam perlakuan. Penentuan jumlah pengulangan pada setiap perlakuan dalam penelitian ini dilakukan berdasarkan rumus Federer. (Indratama and Yenita, 2019).

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

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

r = jumlah pengulangan

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

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini sebanyak empat kali. Pada penelitian ini menggunakan enam perlakuan dengan konsentrasi 50%, 40%, 30% dan 20%, kontrol negatif, dan kontrol positif, jadi total keseluruhan sampel adalah 24 sampel.

4. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi autoklaf, oven, cawan petri, jangka sorong, pipet tetes, mikropipet, swab steril, inkubator, gelas ukur, erlenmeyer, *Biosafety Cabinet* (BSC), kertas saring, kertas cakram, tabung reaksi, *vortex mixer*, batang pengaduk, standar McFarland, dan ose steril.

b. Bahan

Didalam penelitian berikut, adapun bahan yang diterapkan yakni: minuman Tuak (*cocos nucifera*) dengan konsentrasi 50%, 40%, 30% dan 20%, antibiotic *gentamicin* , media MHA, NaCl 0,9%, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, aquades.

5. Prosedur kerja

a. Sterilisasi alat

Menurut (Wulandari dkk,2021) prosedur sterilisasi alat yaitu:

- 1) Seluruh peralatan laboratorium dibersihkan terlebih dahulu, kemudian dikeringkan sebelum dilakukan proses sterilisasi.
- 2) Cawan petri dibungkus menggunakan kertas koran, sedangkan tabung reaksi dan pipet tetes ditutup dengan kapas, kemudian masing-masing dibungkus secara terpisah menggunakan kertas koran.
- 3) Selanjutnya, peralatan tersebut disterilkan menggunakan oven pada suhu 160°C selama 1 jam.
- 4) Erlenmeyer dan gelas ukur ditutup bagian mulutnya menggunakan kapas, kemudian dibungkus dengan kertas koran sebelum disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15lbs.

b. Pembuatan Media MHA

Menurut (Wulandari dkk,2021) pembuatan media MHA adalah sebagai berikut:

- 1) Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) dilarutkan dalam akuades, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih dan homogen.
- 2) Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) dilarutkan dalam akuades, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih dan homogen.
- 3) Setelah proses sterilisasi selesai, media didinginkan hingga mencapai suhu sekitar 45°C, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptik.

c. Preparasi sampel

Pada penelitian ini konsentrasi yang digunakan sebanyak 5 taras yaitu minuman tuak kelapa 0% sebagai control, minuman tuak kelapa 50%, minuman tuak kelapa 40%, minuman tuak kelapa 30% dan minuman tuak kelapa 20%. Pembuatan konsentrasi minuman tuak kelapa di buat 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 perhitungan konsentrasi minuman tuak dapat dilihat di bawah ini :

Tabel 4
Perhitungan konsentrasi

No	Konsentrasi	Volume sampel Tuak	Volume pengencer (aquades)
1	2	3	4
1	50%	2,5 ml	2,5 ml
2	40%	2 ml	3 ml
3	30%	1,5 ml	3,5 ml
4	20%	1 ml	4 ml

- 1) Pembuatan larutan uji dilakukan dengan mengencerkan minuman tuak kelapa dengan aquades dengan seri konsentrasi 50%, 40%, 30% dan 20%
- 2) Konsentrasi 50% dibuat dengan menambahkan 2,5 ml minuman tuak kelapa dan ditambahkan aquades sebanyak 2,5 ml, lalu dihomogenkan.
- 3) Konsentrasi 40% dibuat dengan menambahkan 2 ml minuman tuak kelapa dan ditambahkan aquades sebanyak 3 ml, lalu dihomogenkan
- 4) Konsentrasi 30% dibuat dengan menambahkan 1,5 ml minuman tuak kelapa dan ditambahkan aquades sebanyak 3,5 ml, lalu dihomogenkan
- 5) Konsentrasi 20% dibuat dengan menambahkan 1 ml minuman tuak kelapa dan ditambahkan aquades sebanyak 4 ml, lalu dihomogenkan
- 6) Selanjutnya teteskan setiap konsentrasi pada cakram sebanyak 20 ul lalu biarkan hingga kering.

d. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Menurut (Apriani dkk., 2021) prosedur pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu:

- 1) Koloni bakteri diinokulasikan ke dalam larutan NaCl fisiologis yang telah disiapkan dalam tabung reaksi steril.
- 2) Suspensi bakteri kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex*.

- 3) Tingkat kekeruhan suspensi selanjutnya disesuaikan dengan membandingkannya terhadap standar McFarland 0,5. (Apriani *et al.*, 2023).

e. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram dilakukan dengan cara:

- 1) *Cotton swab* steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri hingga seluruh bagian kapas terbasahi.
- 2) Selanjutnya, *cotton swab* diputar pada dinding tabung.
- 3) *Cotton swab* yang telah mengandung suspensi bakteri kemudian dioleskan secara merata pada seluruh permukaan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA). Selanjutnya, media didiamkan selama 5–15 menit pada suhu ruang agar suspensi bakteri terserap dengan baik ke dalam media.
- 4) Kertas cakram yang telah ditetesi 20 μL sampel pada masing-masing konsentrasi 50%, 40%, 30%, dan 20% kemudian ditempatkan pada media.
- 5) Kertas cakram yang berisi kontrol positif dan kontrol negatif juga diletakkan.
- 6) Selanjutnya, media diinkubasi dalam posisi terbalik pada suhu 37°C selama 18–24 jam menggunakan inkubator.
- 7) Setelah proses inkubasi selesai, aktivitas antibakteri dievaluasi dan kemudian diameter zona tersebut diukur menggunakan jangka sorong dan .

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data primer yaitu data diperoleh secara langsung yang dilakukan oleh peneliti. Data primer pada penelitian ini berupa diameter zona hambat

pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada sejumlah konsentrasi minuman Tuak yang didapat dari pengukuran di laboratorium.

b. Data sekunder

Data sekunder merupakan data yang diperoleh secara tidak langsung oleh peneliti melalui berbagai sumber yang mendukung pelaksanaan penelitian, seperti literatur dan dokumentasi (Sugiyono, 2020). Pada penelitian ini, data sekunder meliputi hasil penelitian terdahulu, data statistik, data kualitatif, artikel ilmiah, jurnal, serta buku yang relevan dengan topik penelitian.

2. Teknik pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan metode pengumpulan data berdasarkan pemeriksaan laboratorium. Pengujian daya minuman Tuak dilakukan dengan metode difusi cakram *Kirby-Bauer*. Pengukuran diameter zona hambat untuk setiap variasi konsentrasi dilakukan menggunakan jangka sorong, dan hasil pengukuran tersebut dinyatakan dalam satuan milimeter (mm)

3. Instrument pengumpulan data

Instrumen - instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Alat Tulis
- b. Kamera
- c. Alat Pelindung Diri (APD)
- d. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan aplikasi perangkat lunak statistik dengan beberapa tahapan yang meliputi:

- a. *Editing* yaitu melakukan pemeriksaan terhadap data secara menyeluruh.
- b. *Coding* yaitu memberikan kode tertentu untuk data dan hasil pemeriksaan.
- c. *Entry data* yaitu memasukkan data hingga membentuk data dasar.
- d. *Cleaning* yaitu mengelompokkan atau mengurutkan data.

2. Analisis Data

a. Uji *Shapiro-wilk*

Uji normalitas data dilakukan menggunakan uji *Shapiro-wilk* untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal. Data dinyatakan berdistribusi normal apabila sig. > 0,05 dan data tidak berdistribusi normal apabila sig. < 0,05.

b. Uji *Lavene test*

Uji homogenitas dilakukan menggunakan *Lavene test* untuk mengetahui kesamaan varians antar kelompok. Data dinyatakan homogen apabila sig. > 0,05.

c. Uji *One-Way anova*

Data yang memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan rata-rata antara kelompok perlakuan.

d. Uji lanjutan

Uji lanjutan dilakukan untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan signifikan. Uji Post Hoc Games-Howell digunakan apabila data tidak homogen, sedangkan uji Post Hoc LSD digunakan apabila data homogen.

G. Etika Penelitian

Pengambilan data yang dilakukan harus tetap memperhatikan etika penelitian. Etika penelitian adalah pedoman perilaku penelitian dalam

melaksanakan aktivitas penulisan proposal, pelaksanaan, pelaporan, dan publikasi hasil penelitian (Kurniawan dan Agustini, 2021).

1. *Beneficenc*

Prinsip *beneficence* bertujuan untuk memberikan manfaat yang sebesar-besarnya serta meminimalkan kemungkinan terjadinya kerugian bagi orang lain atau subjek penelitian.

2. *Non-maleficence*

Prinsip *non-maleficence* bertujuan untuk memastikan bahwa subjek penelitian tidak diperlakukan semata-mata sebagai objek penelitian, serta dilindungi dari segala bentuk risiko, bahaya, dan kemungkinan terjadinya penyalahgunaan selama proses penelitian berlangsung (Masturoh dan Tamesvari, 2018).