

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Dalam penelitian “Daya Hambat Perasan Umbi Bawang Merah terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*”, jenis penelitian yang digunakan adalah *True Experimental* dengan menggunakan rancangan penelitian yaitu *Posttest Only Control Group Design* yang bertujuan untuk mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Noor, 2012). Berikut merupakan rancangan *Posttest Only Control Group Design* :

Kelompok Uji	Perlakuan	Posttest
R _E	X	O ₂
R _K		O ₂

Gambar 5. Rancangan *Posttest Only Control Group Design*

Keterangan :

R_E (Kelompok experiment) : Perasan umbi bawang merah dengan konsentrasi 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%

R_K (Kelompok kontrol) : Kontrol yang digunakan adalah aquadest steril

X : Perlakuan atau experiment

O₂ (Observent) : Hasil setelah perlakuan

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan dari bulan Februari sampai bulan Mei 2019.

2. Tempat penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan, Politeknik Kesehatan Denpasar, Jalan Sanitasi No.1, Sidakarya.

C. Sampel Penelitian

1. Populasi sampel

Populasi sampel dalam penelitian ini adalah bawang merah dengan nama ilmiah (*Allium cepa L.*) yang didapat dari produsen bawang merah di daerah Baturiti Tabanan.

2. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah perasan umbi bawang merah yang diperoleh dari umbi bawang merah dengan kriteria inklusi bawang berukuran 3-4 cm, umbu bawang merah yang masih segar, berwarna merah dan tidak terdapat kulit yang kering yang masih melapisi umbi bawang merah, sedangkan kriteria eksklusi yaitu umbi bawang merah yang tidak segar, bawang merah yang busuk dan berwarna coklat dan masih ada kulit yang melapisi bawang merah yang tidak sesuai dengan kriteria inklusi.

3. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah *purposive sampling* dikarenakan sampel perasan bawang merah yang diperoleh dari umbi bawang merah sudah memiliki kriteria yang sudah dipertimbangkan oleh peneliti.

4. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat perasan umbi bawang merah terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan 5 jenis perlakuan konsentrasi yaitu 40%, 50%, 60%, 70%, dan 80%. Konsentrasi ini dipilih untuk mengetahui konsentrasi yang paling efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Kelompok kontrol dalam penelitian ini menggunakan aquadest steril.

5. Besar sampel

Pada penelitian ini yang menjadi sampel penelitian adalah perasan umbi bawang merah dengan konsentrasi 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%. Besar sampel yang diperlukan yaitu 1000 µl pada konsentrasi 40% dengan perbandingan 400 µl perasan umbi bawang merah 100% dan 600 µl aquadest, konsentrasi 50% dengan perbandingan 500 µl perasan umbi bawang merah 100% dan 500 µl aquadest, konsentrasi 60% dengan perbandingan 600 µl umbi bawang merah 100% dan 400 µl aquadest, konsentrasi 70% dengan perbandingan 700 µl perasan umbi bawang merah 100% dan 300 µl aquadest untuk konsentrasi 80% dengan perbandingan 800 µl perasan umbi bawang merah 100% dan 200 µl aquadest. Pada penelitian ini menggunakan kelompok kontrol yaitu menggunakan aquadest steril. Kontrol berfungsi sebagai data pembanding dengan perlakuan dan untuk mengkonfirmasi bahwa pelarut yang digunakan memiliki atau tidak memiliki pengaruh terhadap bakteri uji.

Menurut Hanafiah (2016) dalam penentuan pengulangan dapat dihitung berdasarkan jumlah konsentrasi yang digunakan dan jumlah kelompok kontrol. Dalam penelitian ini digunakan 5 perlakuan konsentrasi dan 1 perlakuan kontrol. Sehingga total perlakuan dalam penelitian ini adalah 6 perlakuan. Dalam penelitian ini masing-masing perlakuan diulang dengan jumlah yang dapat ditentukan dari persamaan berikut:

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

Keterangan:

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, pengulangan yang dapat dilakukan dalam penelitian ini adalah ≥ 4 kali. Menurut Hanafiah, (2016) jumlah ulangan suatu perlakuan tergantung pada derajat ketelitian yang diinginkan oleh peneliti terhadap kesimpulan hasil percobaan. Semakin banyak jumlah pengulangan yang dilakukan, maka derajat ketelitian juga akan semakin tinggi.

Pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah empat kali

pengulangan, sehingga diperoleh jumlah pemeriksaan sebesar 20 sampel dan jumlah data yang didapat sebesar 20 data. Syarat minimal jumlah pengulangan yang bisa dilakukan untuk percobaan laboratorium adalah cukup 3 kali pengulangan, maka pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini sudah memenuhi syarat (Hanafiah, 2016).

D. Alat dan Bahan

1. Alat

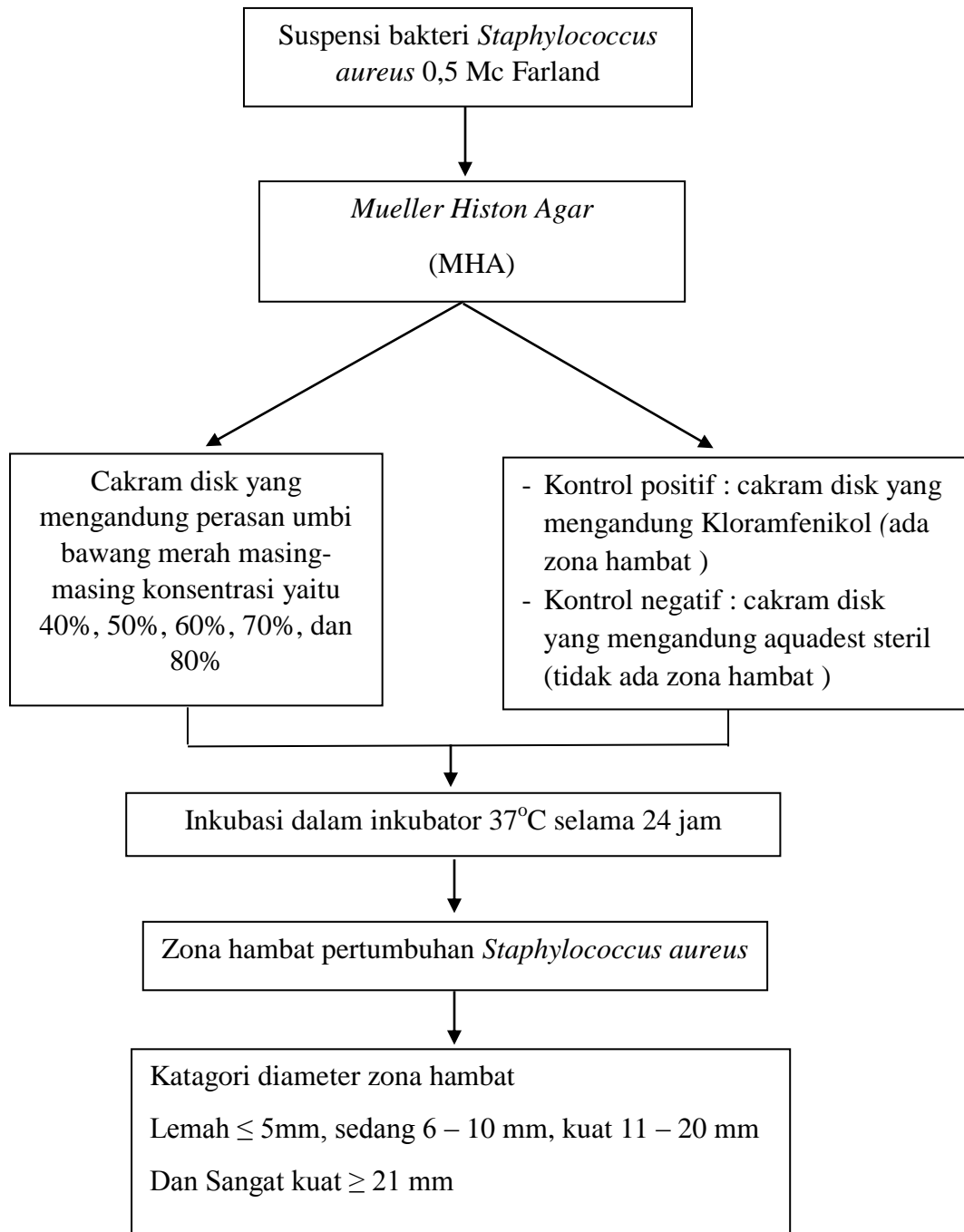
Alat yang digunakan dalam diantaranya 1 alat pemeras bawang merah, 1 buah gunting, 1 buah tempat sampel, 1 buah kaca arloji, 1 buah neraca analitik (*Radwag*), 1 buah gelas ukur (*Pyrex*), 3 buah Erlenmeyer (*Pyrex*), 1 buah hotplate stirrer (*Jisico*), 1 buah autoclave (*Tomy Sx- 500*), 1 buah cawan petri steril, 2 buah tabung reaksi steril (*Pyrex*), 4 buah pipet ukur steril (*Pyrex*), 1 buah oven (*Wagtech*), 1 buah rak tabung reaksi, 1 buah Biosafety Cabinet (*Biobase*), 1 buah Mc Farland densitometer (*Biosan*), 1 buah ose bulat, 4 buah mikropipet (*secorex*), 2 buah pinset, 1 buah api bunsen, 1 buah inkubator (*Esco*), 1 buah ball pipet (b&n ballpipet), dan 1 buah jangka sorong, petridisk (10 buah), dan lidi kapas steril (2 buah).

2. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 200 ml perasan umbi bawang merah, 2 liter aquadest steril, 1 buah koloni *Staphylococcus aureus*, media *Mueller Hinton Agar*, standar Mc Farland 0,5%, larutan NaCl fisiologis 0,85%, cakram disk kosong, Kloramfenikol, swab kapas steril, aluminium foil, kasa steril.

E. Kerangka dan Prosedur Kerja

1. Kerangka kerja



Gambar 6. Kerangka kerja uji daya hambat
Keterangan :

Bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasikan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA), kemudian masing-masing cakram disk yang mengandung perasan umbi bawang merah dengan berbagai konsentrasi (40%, 50%, 60%, 70% dan 80%), kontrol positif (Kloramfenikol) dan kontrol negatif (aquadest steril) ditempelkan pada permukaan media, setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk berupa zona bening di sekitar cakram disk dihitung dan dinyatakan dalam mm (milimeter).

2. Prosedur kerja

a. Pembuatan umbi perasan bawang merah

- 1) Umbi bawang merah yang telah dipilih, dicuci menggunakan air bersih dan ditiriskan airnya
- 2) Ditimbang umbi bawang merah sebanyak 1 kilogram.
- 3) Umbi bawang merah dihaluskan kemudian diperas hingga diperoleh sari bawang merah.
- 4) Hasil perasan kemudian ditampung ke dalam tabung Erlenmeyer sambil disaring menggunakan kertas saring.
- 5) Diperoleh konsentrasi bawang merah 100% tanpa penambahan larutan apapun.

b. Pengenceran perasan umbi bawang merah

- 1) Diencerkan sampel perasan umbi Bawang Merah dalam konsentrasi 40%, 50%, 60%, 70%, dan 80% dari perasan bawang merah 100%.
- 2) Digunakan rumus pengenceran sebagai berikut :

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

Keterangan rumus :

- V_1 : volume umbi perasan bawang merah yang akan diencerkan dari konsentrasi 100%.
- V_2 : volume perasan umbi bawang merah yang akan dibuat yaitu 10 ml.
- M_1 : konsentrasi perasan umbi bawang merah yang akan diencerkan, yaitu 100%.
- M_2 : konsentrasi perasan umbi bawang merah yang akan dibuat.

Tabel. 4
Penentuan Konsentrasi perasan umbi bawang merah

No	V_1 (μ l)	M_1	V_2 (μ l)	M_2	Aquadest steril (μ l)
1	400	100 %	1000	40%	600
2	500	100 %	1000	50%	500
3	600	100 %	1000	60%	400
4	700	100 %	1000	70%	300
5	800	100 %	1000	80%	200

c. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

- 1) Diambil koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakan murni dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl fisiologis 0,85%.
- 2) Suspensi dibandingkan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5%.
- 3) Suspensi diukur dengan menggunakan Mc Farland densitometer.

d. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

- 1) Bubuk media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 9,5 gram menggunakan neraca analitik dan setelah proses penimbangan bubuk media dipindahkan kedalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuadest sebanyak 250 mL (etiket media 38,0 g medium disuspensikan ke dalam 1 L aquadest)
- 2) Medium dipanaskan selama satu menit pada hotplate sambil diaduk sampai serbuk benar-benar larut dan tercampur dengan sempurna
- 3) Setelah bubuk media larut sempurna dan homogen, diukur pH media dengan menggunakan pH stick (pH optimal $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C)
- 4) Erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan aluminium foil
- 5) Media disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dihitung dari tercapainya suhu 121°C
- 6) Media yang telah disterilisasi, didiamkan sampai suhu media turun menjadi $\pm 40 - 50^{\circ}\text{C}$.
- 7) Tuangkan ke dalam cawan petri (*Plate*) masing-masing plate sebanyak sebanyak 15 ml, kemudian didiamkan hingga memadat
- 8) Setelah media memadat, cawan petri dibalik, dan apabila tidak langsung digunakan media yang sudah dituangkan pada cawan petri atau sisa media dalam tabung Erlenmeyer dapat dibungkus dengan kertas buram dan disimpan didalam refrigerator.

- e. Uji daya hambat (Vandeppite, dkk., 2011).
- 1) Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kepekatan Mc Farland 0,5% disiapkan
 - 2) Swab kapas steril disiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah suspensi bakteri meresap, swab kapas steril diangkat dan diperas dengan cara menekan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar
 - 3) Swab kapas yang telah dicelupkan disebar dengan cara digores-goreskan pada permukaan media MHA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan-goresan. Goresan dilakukan dengan merata hingga menutup seluruh permukaan media.
 - 4) Media MHA didiamkan 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam.
 - 5) Cakram *disk* kosong disiapkan dan cakram disk ini diteteskan 20µl masing-masing konsentrasi perasan umbi bawang merah yaitu konsentrasi 40%, 50%, 60%, 70%, 80% hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram disk
 - 6) Masing-masing cakram yang telah jenuh dengan konsentrasi perasan bawang merah kemudian ditempelkan pada permukaan media MHA yang telah digoreskan suspensi bakteri dan sedikit ditekan dengan pinset sampai melekat sempurna
 - 7) Cakram antibiotik Kloramfenikol yang berfungsi sebagai kontrol positif dan cakram disk yang telah dijenuhkan dengan aquadest steril sebagai kontrol negatif ditempelkan pada media MHA

- 8) Atur jarak cakram ± 15 mm antara cakram yang lainnya dan cakram yang sudah ditempelkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan ataupun digeser.
- 9) Media yang telah ditanami cakram diinkubasi di inkubator selama 24 jam dengan posisi terbalik pada suhu 37°C
- 10) Setelah diinkubasi diukur zona bening yang terbentuk dengan mistar dan dikonversi ke satuan mm (milimeter).

f. Pelaporan hasil

- 1) Adanya zona hambat dilihat dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong (dalam satuan mm).
- 2) Diameter zona hambat yang diukur yaitu daerah jernih sekitar cakram disk (tidak ada pertumbuhan bakteri) diukur dari ujung satu keujung yang lain melalui tengah-tengah cakram disk.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data yang dikumpulkan adalah data primer. Sumber data primer adalah sumber data yang langsung memberikan data kepada pengumpul data (Sugiyono, 2012). Data primer meliputi data diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi perasan umbi bawang merah, yang diperoleh dari penelitian di laboratorium.

2. Teknik pengumpulan data

Cara pengumpulan data yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan melakukan pengukuran dengan alat ukur melalui eksperimen. Pengukuran

dilakukan pada diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai variasi konsentrasi perasan umbi bawang merah. Hasil pengukuran diameter zona hambat tersebut menunjukkan adanya aktivitas penghambatan yang dinyatakan dalam milimeter (mm).

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen pengujian daya hambat perasan umbi bawang merah terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang dinyatakan dalam satuan mm (millimeter) diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating data yaitu data yang disajikan dalam bentuk tabel naratif.

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis kuantitatif, dilakukan dengan uji statistik menggunakan bantuan perangkat lunak komputer. Analisis data dilakukan dengan beberapa tahap, antara lain:

- a. Uji *kolmogorov smirnov* digunakan untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak normal.
- b. Uji *one way anova* digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan perasan umbi bawang merah antara konsentrasi 40%, 50%, 60%, 70%, dan 80%. Apabila data berdistribusi normal.
- c. Uji *kruskal wallis* digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan

menggunakan perasan umbi bawang merah antara konsentrasi 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%. Apabila data berdistribusi tidak normal.

- d. Uji statistik LSD (*Least Significant Deference*) digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*. Apabila data berdistribusi normal.
- e. Uji statistik *Mann-Whitney* digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Apabila data berdistribusi tidak normal.