

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental secara *in vitro* dengan rancangan *post-test only control group design*. Rancangan ini dipilih karena sesuai untuk menilai efek perlakuan tanpa melakukan pengukuran awal (pre-test), sehingga hasil penelitian hanya didasarkan pada perbedaan respon antara kelompok perlakuan, kontrol positif, dan kontrol negatif (Janitra dkk., 2024). Bentuk rancangan pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel:

Tabel 3
Bentuk Rancangan

Kelompok	Perlakuan	Post-test
R1 (Kelompok eksperimen)	X	O1
R2 (Kelompok kontrol)	Kontrol	O2

Keterangan:

R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen dalam penelitian ini yaitu berbagai konsentrasi dari ekstrak etanol bawang putih konsentrasi 15%, 35%, 55%, 75%.

R2 (Random 2) : Kelompok kontrol, dalam penelitian ini adalah blank disk untuk kontrol negatif dan antibiotik kloramfenikol untuk kontrol positif.

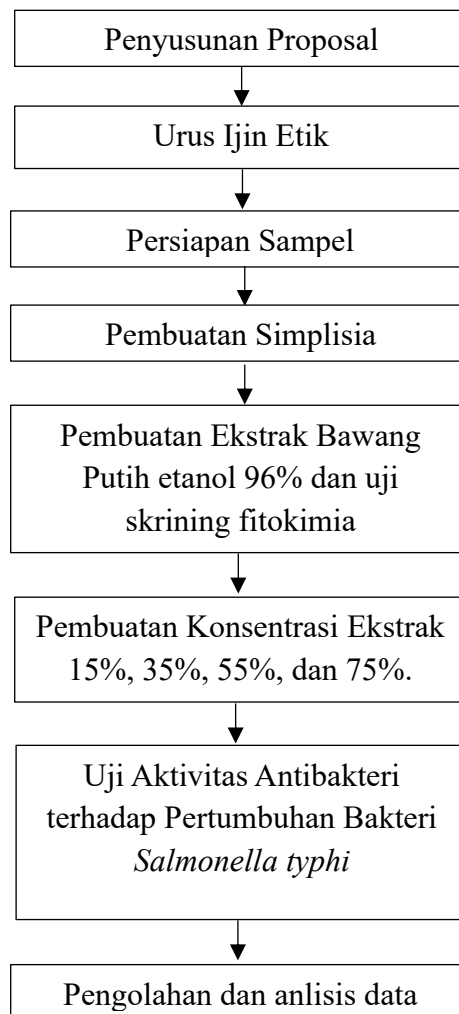
X (Exposure) : Perlakuan (Intervensi)

Observasi (O1) : Diameter zona hambat bakteri *Salmonella typhi*

Observasi (O2) : Diameter zona hambat kontrol positif dan negatif.

B. Alur Penelitian

Alur penelitian pada penelitian ini terdapat pada tabel dibawah ini:



Gambar 4 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Tempat dilaksanakannya penelitian ini yaitu dilakukan di Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO) Karangasem dan Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2025-April 2026.

D. Sampel Penelitian

1. Unit Analisis

Unit analisis pada penelitian ini yaitu diameter zona hambat pertumbuhan *Salmonella typhi* di setiap variasi konsentrasi ekstrak etanol bawang putih yang meliputi konsentrasi 15%, 35%, 55%, dan 75%.

2. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak dari bawang putih yang diperoleh dari Perkebunan Desa Trunyan, Kintamani, Bangli.

3. Jumlah dan besar sampel

a. Besar sampel

Untuk menguji aktivitas antibakteri dari bawang putih, diperlukan ekstrak pekat yang akan diencerkan dengan etanol 96% dalam perbandingan tertentu menjadi beberapa variasi konsentrasi yaitu 15%, 35%, 55%, dan 75%. Antibiotik kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan blank disk berfungsi sebagai kontrol negatif.

Dalam pelaksanaan percobaan di laboratorium, setiap pengujian perlu dilakukan pengulangan. Tujuannya adalah untuk meningkatkan tingkat ketelitian hasil penelitian. Semakin banyak jumlah pengulangan, semakin tinggi pula akurasi data yang diperoleh.

Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam suatu percobaan ditentukan berdasarkan rumus Federer.

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

Gambar 5 Rumus Federer

Keterangan:

t: Jumlah Perlakuan

r: Jumlah Ulangan

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

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Penelitian ini melibatkan enam jenis perlakuan yang terdiri atas empat perlakuan eksperimen dan dua perlakuan kontrol. Dengan memasukkan jumlah perlakuan (t) ke dalam persamaan Federer, diperoleh nilai jumlah ulangan (r) sebesar ≥ 4 . Dengan demikian, setiap perlakuan diulang sebanyak empat kali, sehingga menghasilkan 16 data pada kelompok eksperimen dan 8 data pada kelompok kontrol. Jumlah sampel keseluruhan pada penelitian ini adalah 24 sampel.

4. Kriteria sampel

a. Kriteria inklusi

- 1) Bawang putih dalam kondisi segar, tidak layu, tidak keriput, serta tekstur padat saat ditekan.
- 2) Bawang putih dipanen dalam musim panen yang sama dan digunakan dalam rentang waktu ≤ 7 hari setelah pembelian.
- 3) Siung masih menyatu dalam satu buah bawang.
- 4) Tidak terdapat jamur.
- 5) Tidak berlendir

b. Kriteria eksklusi

- 1) Bawang putih yang menunjukkan perubahan bau menyengat tidak khas bawang putih setelah pengupasan.
- 2) Bawang putih yang sudah berkecambah.
- 3) Bawang putih yang menghasilkan cairan berlebihan saat diiris, menandakan degradasi jaringan internal.
- 4) Bawang putih yang mengalami oksidasi cepat (perubahan warna coklat gelap) setelah pengirisan.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang dikumpulkan dalam penelitian ini terdiri dari data primer dan data sekunder. Data primer mengacu pada data yang telah dikumpulkan secara langsung (Hardani dkk., 2020). Pada penelitian ini, data primer diperoleh dari hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan *Salmonella typhi* pada berbagai

konsentrasi ekstrak bawang putih. Sedangkan data sekunder berasal dari beragam referensi dan literatur yang relevan dengan topik penelitian ini.

2. Teknik pengumpulan data

Metode pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan melalui observasi, yaitu dengan melakukan uji fitokimia dan mengukur diameter zona hambat pertumbuhan *Salmonella typhi* pada berbagai konsentrasi ekstrak bawang putih. Hasil pengukuran tersebut menggambarkan aktivitas penghambatan bakteri, yang dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

3. Instrumen pengumpulan data

Dalam penelitian ini, instrument yang digunakan dalam pengumpulan data yaitu jangka sorong, alat tulis, kamera dan alat laboratorium.

F. Alat Bahan dan Prosedur Kerja

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah mikropipet 20-200 dan 100 µl, batang pengaduk, magnetic stirer, tabung erlenmeyer, rak tabung reaksi, tabung reaksi, neraca analitik, spatula, jangka sorong, ose bulat, api bunsen, pinset, tabung vial, cawan petri, rotary evaporator, Biosafety Cabinet, oven, incubator, autoclaf, densitometer.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah bawang putih (*Allium sativum*), MHA (Mueller Hinton Agar), larutan NaCl fisiologis 0,9%, standard McFarland, aluminium foil, blue tip, yellow tip, tisu, kertas saring, cotton swab, bakteri *Salmonella typhi*, kloramfenikol, etanol 96%.

3. Prosedur Kerja

a. Pembuatan serbuk simplisia

- 1) Sebanyak 3 kg bawang putih yang telah diperoleh ditimbang, selanjutnya dilakukan sortasi basah bahan alam dengan memperhatikan keseragaman jenis, ukuran, dan warna.
- 2) Bahan dicuci menggunakan air mengalir hingga bersih.
- 3) Setelah bersih dari pengotor, bawang putih ditiriskan.
- 4) Diiris tipis bawang putih dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.
- 5) Dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk.
- 6) Diayak serbuk menggunakan ayakan hingga halus.

b. Pembuatan ekstraksi (Asiyah & Turahman, 2021)

- 1) Proses ekstraksi serbuk simplisia bawang putih dilakukan melalui metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, dengan perbandingan serbuk simplisia dan pelarut sebesar 1:10 hingga bahan terendam sepenuhnya.
- 2) Tahap perendaman dilakukan selama 3 hari, dengan pengadukan rutin sebanyak 4 kali per hari.
- 3) Sampel disaring menggunakan kertas saring, kemudian filtrat dievaporasi dengan rotary evaporator pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental.
- 4) Ekstrak kental ditimbang menggunakan neraca analitik dan dicatat
- 5) Dilakukan perhitungan kadar rendemen dari ekstrak yang diperoleh untuk mengetahui besarnya ekstrak yang dihasilkan dari proses ekstraksi menggunakan masing-masing pelarut. Kadar rendemen ekstrak dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\frac{\text{Bobot ekstrak kental (gr)}}{\text{Bobot simplisia yang di ekstraksi}} \times 100\%$$

c. Uji Fitokimia

1) Identifikasi alkaloid (Baruni dkk., 2025)

- a) 1 ml sampel ekstrak bawang putih dipipet, kemudian ditambahkan beberapa tetes asam sulfat 2N atau asam klorida 2N.
- b) Tambahkan 2-3 tetes reagen reagen dragendorf
- c) Amati perubahan yang terjadi jika terbentuk endapan merah kecoklatan pada reagen dragendorf maka hasil dinyatakan positif.

2) Identifikasi Flavonoid (Baruni dkk., 2025)

- a) 1 ml sampel ekstrak bawang putih dipipet kemudian ditambah 3 tetes larutan H_2SO_4
- b) Amati perubahan yang terjadi
- c) Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi oranye.

3) Identifikasi tanin (Baruni dkk., 2025)

- a) 1 ml sampel ekstrak bawang putih dipipet kemudian ditambah 2-3 tetes larutan $FeCl_3$.
- b) Kocok perlahan, amati perubahan warna yang terjadi.
- c) Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan.

4) Identifikasi saponin (Baruni dkk., 2025)

- a) 1 ml sampel ekstrak bawang putih dipipet kemudian ditambahkan 5-10 mL aquades, panaskan dengan hotplate.
- b) Kocok kuat-kuat campuran selama 2 menit.
- c) Amati perubahan yang terjadi, jika hasil positif busa yang terbentuk tidak hilang.

- d. Tahap pembuatan seri konsentrasi ekstrak bawang putih (Hardiati dkk., 2023)
- 1) Dibuat 4 seri konsentrasi dari ekstrak kental bawang putih (15%, 35%, 55% dan 75%) dengan pelarut etanol 96%.
 - 2) Larutan uji dengan konsentrasi 15% dibuat dengan mengambil 1,5 gram ekstrak kental bawang putih, kemudian ditambah etanol 96% secukupnya hingga mencapai volume akhir 10 ml.
 - 3) Larutan uji dengan konsentrasi 35% dibuat dengan mengambil 3,5 gram ekstrak kental bawang putih, kemudian ditambahkan etanol 96% secukupnya hingga mencapai volume akhir 10 ml.
 - 4) Larutan uji dengan konsentrasi 55% dibuat dengan mengambil 5,5 gram ekstrak kental bawang putih, kemudian ditambahkan etanol 96% secukupnya hingga mencapai volume akhir 10 ml.
 - 5) Larutan uji dengan konsentrasi 75% dibuat dengan mengambil 7,5 gram ekstrak kental bawang putih, kemudian ditambahkan etanol 96% secukupnya hingga mencapai volume akhir 10 ml.
- e. Pembuatan suspensi bakteri (Baruni dkk., 2025)
- 1) Diambil koloni *Salmonella typhi* dari biakan murni dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl fisiologis 0,9 %.
 - 2) Suspensi diukur dengan menggunakan McFarland densitometer.
- f. Pembuatan media mueller hinton agar (MHA) (Baruni dkk., 2025)
- 1) Bubuk media Mueller Hinton Agar (MHA) ditimbang sebanyak 8,4 gram menggunakan neraca analitik dan setelah proses penimbangan bubuk media dipindahkan kedalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 400 ml diaduk hingga larut.

- 2) Dipanaskan menggunakan hotplate sambil diaduk sampai serbuk benar-benar larut dan tercampur dengan sempurna.
- 3) Setelah bubuk media larut sempurna dan homogen, lalu disterilkan media menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.
- 4) Media yang telah disterilisasi, didiamkan sampai suhu media turun menjadi $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$.
- 5) Tuangkan kedalam cawan petri masing-masing plate sebanyak 20 ml, kemudian didiamkan hingga memadat.
- 6) Cawan petri dibalik setelah media memadat. Apabila tidak langsung dipakai, media yang sudah dituangkan pada cawan petri atau sisa media dalam tabung Erlenmeyer dapat dibungkus dengan kertas buram dan disimpan dalam refrigerator.

g. Tahap pemeriksaan (Asiyah & Turahman, 2021)

- 1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan, kemudian sterilisasi area kerja menggunakan alkohol 70%.
- 2) Lalu suspensi bakteri *Salmonella typhi* dengan kepekatan Mc Farland 0,5% disiapkan.
- 3) Kemudian cotton swab steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri.
- 4) Setelah suspensi bakteri meresap, cotton swab steril diangkat dan diperas dengan cara menekan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar.
- 5) Cotton swab yang telah dicelupkan tadi disebar dengan cara digores-goreskan pada permukaan media MHA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dan merata hingga menutup seluruh permukaan media dengan goresan-goresan.
- 6) Media MHA didiamkan 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap kedalam.

- 7) Cakram disk kosong disiapkan dan cakram disk ini diteteskan masing-masing 20 µl pada konsentrasi 15%, 35%, 55%, dan 75% hingga seluruh cairan meresap kedalam cakram disk.
- 8) Cakram antibiotik kloramfenikol yang berfungsi sebagai control positif dan blank disk yang telah dijenuhkan dengan aquades sebagai control negatif ditempelkan pada media MHA.
- 9) Atur jarak cakram ± 15 mm antara cakram yang lainnya dan cakram yang sudah ditempelkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan.
- 10) Media yang telah ditanami cakram diinkubasi di incubator selama 24 jam dengan posisi terbalik pada suhu 37°C.
- 11) Setelah proses inkubasi, zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm), selanjutnya digunakan untuk menentukan kategori kekuatan aktivitas antibakterinya.

h. Penentuan aktivitas antibakteri

Penentuan aktivitas antibakteri ekstrak bawang putih dilakukan melalui perbandingan antara diameter zona hambat ekstrak uji dan diameter zona hambat kontrol positif berupa kloramfenikol. Nilai aktivitas antibakteri masing-masing perlakuan kemudian dihitung berdasarkan rumus berikut.

$$E = \frac{D}{Da} \times 100\%$$

Keterangan:

E: Aktivitas antibakteri

D: Diameter zona hambat ekstrak (mm)

Da: Diameter zona hambat control positif (mm)

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh dari pengujian aktivitas antibakteri ekstrak bawang putih terhadap pertumbuhan *Salmonella typhi* pada berbagai konsentrasi, yang diukur dalam satuan milimeter (mm), selanjutnya dianalisis melalui teknik pengolahan data secara tabulasi dan deskripsi naratif.

2. Analisis data

Analisis data dalam penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif yang diolah melalui uji statistik dengan bantuan perangkat lunak komputer. Proses analisis dilakukan melalui beberapa tahapan, antara lain:

- a. Pengujian normalitas data dilakukan menggunakan uji Shapiro-Wilk untuk menentukan apakah data berdistribusi normal atau tidak.
- b. Perbedaan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* pada pemberian ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 15%, 35%, 55%, dan 75% diidentifikasi melalui analisis menggunakan uji *One Way* ANOVA apabila data memenuhi asumsi distribusi normal.
- c. Perbedaan diameter zona hambat pada setiap konsentrasi ekstrak yang berpotensi menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi* diketahui melalui analisis lanjutan menggunakan uji LSD (Least Significant Difference) apabila data berdistribusi normal.

H. Etika Penelitian

Pada pelaksanaan penelitian ini, pengetahuan mengenai etika penelitian menjadi hal yang sangat penting bagi peneliti. Penerapan etika penelitian memiliki

tujuan utama untuk menjaga dan menghormati hak setiap subjek yang terlibat dalam penelitian. Terdapat sejumlah prinsip yang dijadikan landasan dalam pelaksanaan etika penelitian, antara lain:

1. Prinsip penghormatan terhadap martabat manusia (*respect for persons*)

Prinsip ini menegaskan bahwa setiap individu harus diperlakukan dengan penuh hormat karena memiliki kemampuan untuk menentukan pilihan secara mandiri dan bertanggung jawab atas keputusan yang dibuatnya.

2. Prinsip berbuat baik (*beneficence*) dan tidak merugikan (*non-maleficence*)

Prinsip ini mengutamakan pemberian manfaat yang terbesar bagi subjek penelitian, dengan tetap memastikan bahwa risiko yang mungkin timbul dibuat serendah mungkin. Prinsip ini juga bertujuan agar subjek tidak mengalami kerugian dan tidak digunakan untuk kepentingan yang tidak sesuai dengan etika penelitian.

3. Prinsip keadilan (*justice*)

Prinsip ini menegaskan bahwa setiap individu berhak menerima perlakuan yang adil dan setara. Segala bentuk kepentingan dan hak subjek harus dijaga serta dilindungi secara layak sesuai dengan norma dan nilai moral yang berlaku.