

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental untuk menguji variasi konsentrasi perasan daun bawang terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella thypi*. Rancangan penelitian ini dimodifikasi dari Notoatmodjo (2005) sebagai berikut :

	Perlakuan	Postes
R(Kontrol negatif)	X(-)	O(-)
R(Kontrol positif)	X(+)	O(+)
R(Kelompok Ekperimental)	Xa	O1
R(Kelompok Ekperimental)	Xb	O2
R(Kelompok Ekperimental)	Xc	O3
R(Kelompok Ekperimental)	Xd	O4
R(Kelompok Ekperimental)	Xe	O5

Gambar 3.1 Rancangan penelitian dengan metode *Postest Only*

***Control Group design* (Notoatmodjo S, 2005)**

Keterangan :

- R : Random
- X(-) : Perlakuan tanpa perasan 0%
- X(+) : Perlakuan dengan pemberian antibiotik amoksisilin
- Xa : Perlakuan dengan pemberian perasan daun bawang dengan konsentrasi 20%
- Xb : Perlakuan dengan pemberian perasan daun bawang dengan konsentrasi 40%
- Xc : Perlakuan dengan pemberian perasan daun bawang dengan konsentrasi 60%
- Xd : Perlakuan dengan pemberian perasan daun bawang dengan konsentrasi 80%
- Xe : Perlakuan dengan pemberian perasan daun bawang dengan konsentrasi 100%
- O(-) : Observasi pertumbuhan *Salmonellathypi* tanpa pemberian perasan 0%
- O(+): Observasi pertumbuhan *Salmonella thypi* setelah pemberian antibiotik amoksisilin
- O1 : Observasi pertumbuhan *Salmonella thypi* setelah pemberian perasan daun bawang konsentrasi 20%
- O2 : Observasi pertumbuhan *Salmonella thypi* setelah pemberian perasan daun bawang konsentrasi 40%
- O3 : Observasi pertumbuhan *Salmonella thypi* setelah pemberian perasan daun bawang konsentrasi 60%
- O4 : Observasi pertumbuhan *Salmonella thypi* setelah pemberian perasan daun bawang konsentrasi 80%
- O5 : Observasi pertumbuhan *Salmonella thypi* setelah pemberian perasan daun bawang konsentrasi 100%

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi penelitian

Populasi penelitian adalah bakteri *Salmonella thypi* yang berasal dari biakan murni ATCC *Salmonella thypi* yang didapat dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Kota Surabaya.

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel untuk penelitian ini adalah *Salmonella thypi*. Dalam penelitian ini setiap perlakuan dilakukan dengan 4 pengulangan didasarkan dari rumus (Muntaha, *et al.*, 2015)

$(n-1)(k-1) \geq 15$, maka akan diperoleh jumlah sebagai berikut :

$$(n-1)(7-1) \geq 15$$

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 21/6$$

$$n \geq 3,5 \approx 4$$

Jadi jumlah replikasi sebanyak ≥ 4 kali setiap kelompok.

Keterangan :

n = jumlah pengulangan

K = jumlah kelompok

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Kota Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Desember 2017 sampai bulan Juni 2018, sedangkan untuk pemeriksaan dilakukan pada bulan April 2018 selama 1 minggu.

3.4 Variabel Penelitian dan Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut :

1. Variabel bebas : Konsentrasi perasan daun bawang (*Allium fistulosum*)
2. Variabel terikat : Zona hambat pertumbuhan bakteri *Salmonella thypi*.
3. Variabel kontrol : Waktu inkubasi, jumlah suspensi kuman, suhu, jenis media.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini sebagai berikut :

1. Perasan daun bawang (*Allium fistulosum*) dihasilkan dari proses penghancuran daun bawang tanpa penambahan aquadest dan kemudian diperas dan disaring dengan kasa steril.

Konsentrasi perasan daun bawang dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu : 100%, 80%, 60%, 40%, 20% dan 0% (tanpa pemberian perasan).

2. Zona hambat adalah daerah dimana terhambatnya pertumbuhan bakteri *Salmonella thypi* pada media agar oleh konsentrasi perasan daun bawang yang ditandai dengan adanya zona hambat yang dapat diukur menggunakan penggaris dengan satuan sentimeter (mm). Pengamatan zona hambat bakteri dilakukan dengan metode difusi.

3.5 Persiapan Media dan Perasan

Pengumpulan data zona hambat dilakukan dengan menguji secara laboratorium (dengan cara observasi hasil pemeriksaan laboratorium).

3.5.1. Prosedur Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)

1. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Menghitung media MH yang akan digunakan dengan rumus :

MH 34 gram/liter, Membuat MH sebanyak 15 plate @ 20 ml

$$\text{gram MHA} = \frac{34\text{gr} \times 300\text{ml}}{1000\text{ml}} = 10,2 \text{ gr}$$

3. Serbuk media MH ditimbang sebanyak 10,2 gr
4. Aquadest yang dibutuhkan sebanyak 300 ml dan diukur menggunakan gelas ukur
5. Media yang sudah ditimbang tadi dilarutkan dengan aquadest yang sudah diukur kedalam Erlenmeyer

6. Larutan dipanaskan diatas api spiritus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih dan didinginkan dengan air mengalir sampai kondisi suam – suam
7. Mengukur pH dengan kertas pH, jika media terlalu asam maka ditambahkan NaOH 0,1 N dan jika media terlalu basa maka ditambahkan HCl 0,1 N sampai pH mencapai 7,2
8. Larutan di erlenmeyer ditutup menggunakan kapas yang terbungkus kasa dan Koran serta dikat dengan karet dan dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C.
9. Setelah selesai dari autoklaf, media dituang pada plate yang sudah disteril dengan volume media 15 – 20 ml kedalam plate, dan biarkan memadat setelah dingin media disimpan di lemari es (Kusuma, 2010).

3.5.2. Persiapan Perasan Daun Bawang

Alat yang dibutuhkan mortal, timbangan, wadah, beaker glass, kasa, pisau, talenan. Bahan yang akan di gunakan adalah daun bawang yang masih segar, yang bagus dan ukuran panjang daunnya sama.

Prosedur :

1. Memilih daun bawang yang masih segar dan utuh serta ukurannya yang sama (agar komposisi yang terdapat pada daun bawang tersebut sama).
2. Membersihkan kotoran daun serta membuang daun yang tidak sempurna dengan pisau.

3. Menimbang daun bawang dengan timbangan sebanyak 1 kg, kemudian pisahkan antara daun bawang dengan bawangnya.
4. Selanjutnya daun bawang yang sudah dipisah ditimbang kembali.
5. Mencuci daun bawang dengan air mengalir sampai bersih.
6. Daun bawang dipotong kecil – kecil lalu dihaluskan menggunakan mortal yang sudah disteril menggunakan alkohol.

2.5.3. Prosedur Pembuatan Konsentrasi Daun Bawang

1. Perasan dengan Konsentrasi 100%

Alat yang akan digunakan adalah Erlenmeyer 100 ml, filler, pipet ukur, corong, kertas saring dan kasa.

Bahan yang digunakan adalah daun bawang yang sudah dihaluskan.

Prosedur :

Daun bawang yang sudah dihaluskan kemudian diperas dengan menggunakan kasa steril lalu saring menggunakan kertas saring dan ditampung pada Erlenmeyer (Tanpa adanya pemberian aquadest).

2. Perasan dengan Konsentrasi 80%

Alat yang digunakan adalah Erlenmeyer 100 ml, filler, pipet ukur.

Bahan yang digunakan adalah perasan daun bawang dengan Konsentrasi 100% atau perasan murni, aquadest steril.

Rumus Pengenceran :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$100\text{ml} \times 80\% = V_2 \times 100\%$$

$$V2 = \frac{100\text{ml} \times 80\%}{100\%}$$

$$V2 = 80\text{ml}$$

Prosedur :

- a) Memipet 80 ml perasan daun bawang murni lalu dituang ke dalam Erlenmeyer.
 - b) Tambahkan aquadest sebanyak 20 ml kemudian tuang ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi perasan.
 - c) Larutan dihomogenkan agar perasan dan aquadest tercampur sempurna.
3. Perasan dengan Konsentrasi 60%

Alat yang digunakan adalah Erlenmeyer 100 ml, filler, pipet ukur.

Bahan yang digunakan adalah perasan daun bawang dengan Konsentrasi 100% atau perasan murni, aquadest steril.

Rumus Pengenceran :

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$100\text{ml} \times 60\% = V2 \times 100\%$$

$$V2 = \frac{100\text{ml} \times 60\%}{100\%}$$

$$V2 = 60\text{ml}$$

Prosedur :

- a) Memipet 60 ml perasan daun bawang murni lalu dituang ke dalam Erlenmeyer.
- b) Tambahkan aquadest sebanyak 40 ml kemudian tuang ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi perasan.

c) Larutan dihomogenkan agar perasan dan aquadest tercampur sempurna.

4. Perasan dengan Konsentrasi 40%

Alat yang digunakan adalah Erlenmeyer 100 ml, filler, pipet ukur.

Bahan yang digunakan adalah perasan daun bawang dengan Konsentrasi 100% atau perasan murni, aquadest steril.

Rumus Pengenceran :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$100\text{ml} \times 40\% = V_2 \times 100\%$$

$$V_2 = \frac{100\text{ml} \times 40\%}{100\%}$$

$$V_2 = 40\text{ml}$$

Prosedur :

- a) Memipet 40 ml perasan daun bawang murni lalu dituang ke dalam Erlenmeyer.
- b) Tambahkan aquadest sebanyak 60 ml kemudian tuang ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi perasan.
- c) Larutan dihomogenkan agar perasan dan aquadest tercampur sempurna.

5. Perasan dengan Konsentrasi 20%

Alat yang digunakan adalah Erlenmeyer 100 ml, filler, pipet ukur.

Bahan yang digunakan adalah perasan daun bawang dengan Konsentrasi 100% atau perasan murni, aquadest steril.

Rumus Pengenceran :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$100\text{ml} \times 20\% = V_2 \times 100\%$$

$$V_2 = \frac{100\text{ml} \times 20\%}{100\%}$$

$$V_2 = 20\text{ml}$$

Prosedur :

- a) Memipet 20 ml perasan daun bawang murni lalu dituang ke dalam Erlenmeyer.
- b) Tambahkan aquadest sebanyak 80 ml kemudian tuang ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi perasan.
- c) Larutan dihomogenkan agar perasan dan aquadest tercampur sempurna.

2.5.4. Pembuatan Suspensi Kuman Dengan Metode McFarland 0,5

Pembuatan suspensi kuman dengan metode McFarland 0,5 sebagai berikut :

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi dan yang 1 untuk standart McFarland 0,5 .
2. Prosedur membuat standart McFarland 0,5 yaitu :
 - a. Membuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄ 1%
 - b. Memipet 0,05 ml BaCl 1% + 9,95 ml H₂SO₄
 - c. Homogenkan dengan cara mengocok secara perlahan
 - d. Standart McFarland 0,5 ini sama dengan tiap 1 ml nya mengandung 150 juta kuman.

- e. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu :
 - a. Mengisi tabung steril dengan pz \pm 5 ml.
 - b. Mengambil kuman dari biakan *Salmonella thypi* murni yang mudah ditanam ke media MH dengan ose steril.
 - c. Menyelupkan ose steril yang sudah ada kuman nya pada tabung yang berisi Pz.
 - d. Bandingkan warna suspensi kuman dengan McFarland 0,5.
 - e. Apabila warna kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan ose steril dan apabila terlalu keruh tambahkan Pz hingga kekeruhannya sama dengan standart McFarland 0,5

2.5.5. Prosedur Pemberian Perasan dan pengamatan

Alat yang digunakan adalah api spirtus, swab steril, ose, ring steril, inklubator, penggaris.

Bahan yang digunakan adalah media Mueller Hinton Agar (MHA), bakteri *Salmonella thypi* yang sudah disuspensi, perasan daun bawang.

Prosedur :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
2. Menyalakan api spirtus untuk mempertahankan sterilisasi.
3. Suspensi kuman diinokulasikan ke media Mueller Hinton Agar (MHA) dengan teknik gesek hingga merata keseluruhan.

4. Menempelkan 2 Ring yang sudah steril pada 1 media MHA dan ditempatkan pada permukaan media MHA dengan jarak yang sama rata (1 media MHA untuk 2 pengulangan dan untuk 1 perlakuan membutuhkan 2 media MHA).
5. Perasan daun bawang dipipet sesuai konsentrasinya sebanyak $\pm 10\mu\text{l}$ lalu ditetaskan ditengah-tengah ring yang ada pada media MHA.
6. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan posisi tidak terbalik.

Pengamatan :

1. Mengambil ring yang tertempel pada permukaan media MHA menggunakan penjepit steril.
2. Zona hambat yang terbentuk ditiap konsentrasi diukur menggunakan penggaris (mm).
3. Pengukuran zona hambat dimulai dari titik pemberian perasan sampai zona bening.
4. Setiap sisi kanan, kiri, atas dan bawah ring diukur sampai zona bening dan dibuat rata-rata setiap 1 perlakuan.
5. Mencatat hasil pengamatan dan dibuat sebagai data.

3.6 Standart diameter zona hambat resistensi kontrol positif *Amoksisilin*

Tabel 3.2 Standart diameter sensitifitan antibiotik *Amiksisilin*

(Clinicaland laboratory Standards Institute, 2012)

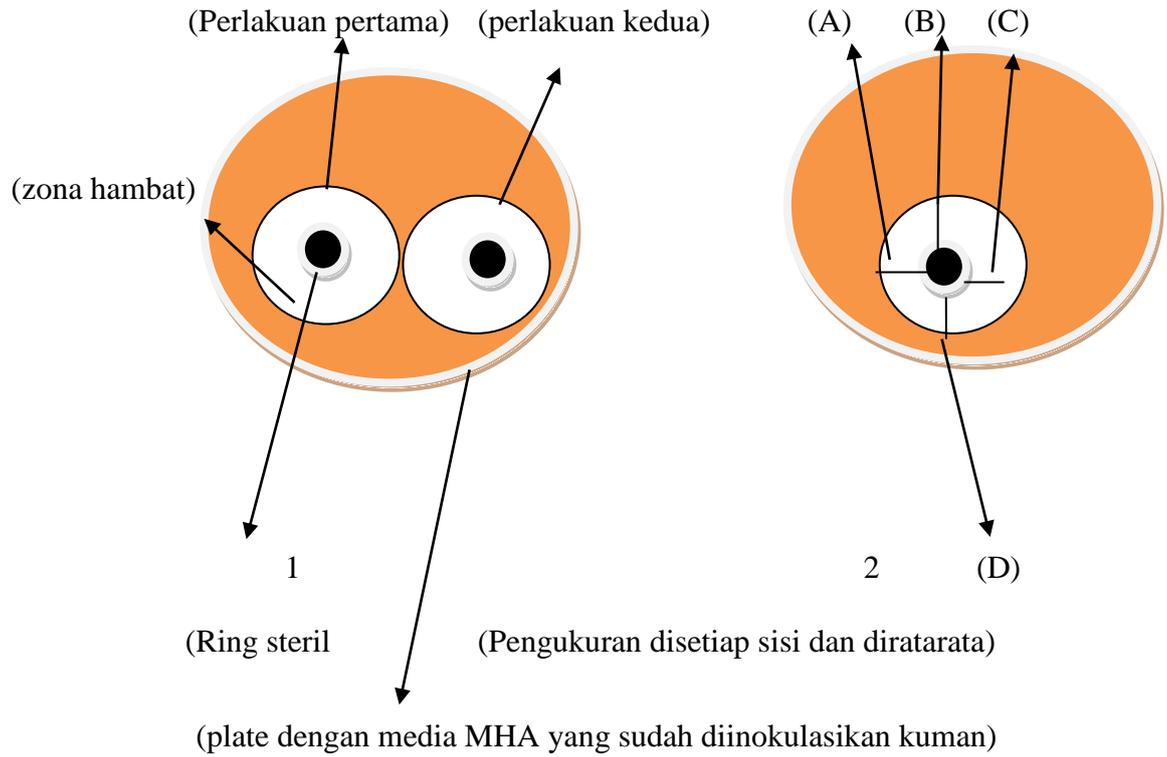
Diameter zona hambat tiap kategori		
Resistensi (mm)	Intermediet (mm)	Sensitive (mm)
≤ 13	14-17	≥ 18

3.7 Pengumpulan dan Analisa Data

3.7.1 Metode Pengumpulan Data

Untuk memperoleh data yang mempunyai kualitas dan validalitas yang tinggi, maka penelitian dilakukan dengan eksperimen laboratorium yang hasilnya ditabulasikan.

Pemeriksaan zona hambat adalah zona dimana bakteri tidak tumbuh pada media MHA yang ditandai dengan daerah bening.



Gambar : (1) zona hambat, (2) pengukuran zona hambat

Tabel 3.3 Tabulasi Data

No	R	Diameter zona hambat (mm)						
		Pada konsentrasi perasan daun bawang (<i>Allium fistulosum</i>)						
		Kontrol negatif (0%)	20%	40%	60%	80%	100%	Kontrol positif (Amoksisilin)
1.	R1							
2.	R2							
3.	R3							
4.	R4							
Jumlah								
Rata-rata								
SD								

Keterangan :

R : Pengulangan / Replikasi

3.6 Metode Analisa Data

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk tabel, data kemudian dianalisa menggunakan uji ANOVA untuk mengetahui perasan daun bawang dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).