

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental. Menurut Latipun, (2002) menyatakan bahwa penelitian eksperimen merupakan penelitian yang dilakukan dengan melakukan manipulasi yang bertujuan untuk mengetahui akibat manipulasi terhadap perilaku individu yang diamati. Penelitian eksperimen pada prinsipnya dapat didefinisikan sebagai metode sistematis guna membangun hubungan yang mengandung fenomena sebab akibat. Pada Penelitian ini digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri perendaman kulit bawang merah (*Allium cepa L*) pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan difusi cakram.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Ma Chung, pada tanggal 24 Januari – 8 Februari 2022.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat – alat yang digunakan yaitu beaker glass, Erlenmeyer, labu ukur, cawan petri, pipet tetes, mikropipet, Bunsen, spatula, pinset, ose, autoklaf, oven, incubator, kulkas, LAF, neraca analitik, alumunium foil, hot plate, waterbath, gelas ukur, kapas, tabung reaksi.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu kulit bawang merah, media Nutrient Agar (NA), aquades, etanol 96%, HCl pekat, FeCl₃ 1%, logam Mg, Kloramfenikol, NaCl 0,9%, Bakteri *Escherichia coli*.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Independen (Bebas)

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak kulit bawang merah yang dilakukan secara maserasi.

3.4.2 Variabel Dependen (Terikat)

Variable terikat pada penelitian ini yaitu aktivitas antibakteri pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

3.5 Definisi Operasional

No	Nama Variabel	Definisi	Satuan dan Alat pengukuran	Skala Nominal
1.	Aktivitas antibakteri	Kemampuan perendaman kulit bawang merah (<i>Allium cepa L.</i>) yang berupa diameter hambat, untuk menghambat pertumbuhan bakteri E.coli. Dengan kategori sebagai berikut : - Daya hambat lemah : ≤ 5 mm. - Daya hambat sedang : 5 – 10 mm. - Daya hambat kuat : 11 – 20 mm. - Daya hambat sangat kuat : ≥ 21 mm.	-	Ordinal
2.	Kulit bawang merah	Bagian terluar dari tanaman bawang merah yang dapat digunakan sebagai antibakteri dan mengandung senyawa kimia seperti, flavonoid, saponin, dan tannin.	Gram, neraca analitik	Nominal
3.	Ekstrak kulit bawang merah	Hasil ekstraksi kulit bawang merah, diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.	mL, labu ukur	Rasio
4.	Zona hambat pertumbuhan bakteri Escherichia coli	Zona bening yang terdapat pada media Nutrient Agar (NA)	mm, jangka sorong/penggaris	Rasio

5.	Konsentrasi ekstrak kulit bawang merah	Cairan yang diperoleh dari ekstrak kulit bawang merah (<i>Allium cepa L.</i>) dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30%.	mL dan μL , pipet ukur dan mikropipet	Ordinal
----	--	---	--	---------

3.6 Cara Kerja

3.6.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua peralatan yang terbuat dari kaca dan bahan (kecuali ekstrak) yang digunakan disterilkan dalam autoklaf selama 30 menit dengan tekanan 15 dyne/cm³ (1 atm) dan suhu 121°C setelah dicuci, lalu dikeringkan dan dibungkus kertas (Sherman, 2001).

3.6.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Bawang Merah

Sebanyak 50 g kulit bawang merah dikeringkan dengan sinar matahari. Jika sudah kering dipotong kecil – kecil dan dihaluskan dengan blender. Selanjutnya diayak dengan ayakan No. 100. Kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca untuk dilakukan maserasi. Lalu ditambahkan etanol 96% sebanyak 500 mL ke dalam botol kaca. Tutup dengan aluminium foil dan diaduk selama 3 x 24 jam sesekali dalam 10 menit. Setelah diperoleh maserat, dipekatkan menggunakan waterbath pada suhu 60°C.

3.6.3 Skrining Fitokimia

1. Uji Flavonoid

Uji Flavonoid 1-2 tetes lapisan air diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan sedikit logam Magnesium (Mg) dan 1-2 tetes asam klorida pekat. Positif flavonoid apabila terbentuk warna kuning-jingga sampai merah.

2. Uji Saponin

Uji Saponin Lapisan bagian atas (air) ditambahkan air panas dan dikocok kuat di dalam tabung reaksi selama beberapa saat. Positif saponin apabila terbentuk busa selama 3-5 menit.

3. Uji Tanin

Pengujian tanin dilakukan dengan memasukkan 10 ml ekstrak ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan FeCl_3 1% apabila terbentuk endapan kuning mengindikasikan adanya tanin.

3.6.4 Kultur Bakteri *Escherichia coli*

Diambil bakteri uji yang telah diinokulasi dengan menggunakan kawat ose steril, lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 3 mL larutan NaCl 0,9% hingga di peroleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland.

3.6.5 Preparasi Antibiotik

Sebanyak 300 mg kloramfenikol ditimbang dengan menggunakan neraca analitik. Kemudian ditambahkan dengan aquades steril sebanyak 10 mL dan divortex hingga diperoleh konsentrasi 30 mg/mL. Pengenceran selanjutnya dilakukan dengan cara memipet 1 mL larutan kloramfenikol 30 mg/mL, lalu ditambahkan dengan aduadest sebanyak 9 mL lalu divortex selama 1 menit. Maka diperoleh konsentrasi sebesar 3 mg/mL, kemudian diteteskan pada paper disk sebanyak 10 μL hingga diperoleh konsentrasi kloramfenikol 30 $\mu\text{g}/\text{disk}$ (WHO, 2003).

3.6.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Bakteri uji diremajakan terlebih dahulu, kemudian dibuat suspensi mikroba. Ekstrak kulit bawang merah diuji dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30% terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Biakan bakteri yang akan diuji ditanam pada media NA, kemudian diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Kertas cakram dengan diameter 0,6 cm dicelupkan ke dalam ekstrak kulit bawang merah. Kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media dan biakan tersebut, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona terang yang terbentuk di sekeliling kertas cakram diukur menggunakan penggaris dan dengan bantuan kaca pembesar (Brooks et. Al, 2005, Matasyoh, 2007).

3.6.6 Pengamatan dan Pengukuran

Pertumbuhan mikroba diamati dan zona bening yang terbentuk di sekeliling cakram diukur menggunakan jangka sorong atau penggaris. Sebagai perbandingan, digunakan cakram kosong yang ditetesi 10 μL aquadest untuk kontrol negatif dan kontrol positif cakram antibiotik kloramfenikol 30 μg untuk bakteri *Escherichia coli*.