

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *eksperimental laboratories* dengan desain yang digunakan adalah *one-shot case study*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Kendari

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada 4 Juni – 26 Juni 2020

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian ini adalah sari daun pegagan (*Centella asiatica*)

2. Objek Penelitian adalah biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*

D. Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah sari daun pegagan dimana daun pegagan yang digunakan adalah daun yang tua yang memiliki batang berwarna hijau dan diperoleh dari Lorong BLK, Desa Lamong Jaya, Kecamatan Laeya, Kab. Konseil Kota Kendari. Daun pegagan dicuci hingga bersih lalu dikeringkan. Setelah kering, daun pegagan ditimbang sebanyak 500 gram dan dimasukkan kedalam alat pengggerus (mortar), lalu digerus menggunakan alu. Daun pegagan yang telah digerus kemudian di peras dengan menggunakan kain dan disaring dengan kertas saring hingga didapatkan sari daun pegagan yang murni sebanyak \pm 150 ml. Sari daun pegagan kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer. Sari daun pegagan siap dibuat dalam 4 konsentrasi yaitu 40%, 60%, 80% dan 100%.

E. Prosedur Pengumpulan Data

Data yang digunakan dikumpulkan berasal dari jurnal-jurnal peneliti sebelumnya dan literatur-literatur yang mendukung penelitian ini.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat

Autoclave, alu, *ball filler*, batang pengaduk, cawan petri, cawan porselin, corong, *drigalsky*, erlenmeyer, gelas ukur, inkubator, kertas saring, mikropipet, mistar, mortar, neraca digital, ose bulat, oven, pinset, pipet ukur, pipet tetes, rak tabung, sendok tanduk, spidol, tabung reaksi, dan tip (biru dan kuning).

2. Bahan

Aluminium foil, antibiotik *ampicillin*, aquadest, biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*, daun pegangan, kertas label, kertas saring, media NA (*Nutrient Agar*), NaCl 0,9%, *paper disc*, dan tissue.

G. Prosedur Penelitian

1. Pra Analitik :

a. Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode cawan kertas (*paper disc*).

b. Prinsip

Cakram yang berisi agen antimikroba diletakkan diatas media agar yang telah ditanami mikroorganismenya, kemudian berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganismenya oleh agen antimikroba pada permukaan agar.

c. Persiapan Alat dan Bahan

1. Sterilisasi Alat Penelitian

Alat-alat yang terbuat dari kaca atau logam, dan memiliki tingkat ketelitian yang tinggi disterilkan didalam oven pada suhu 100°C selama 1 jam. Sedangkan alat yang terbuat dari kaca atau plastik, dan memiliki tingkat ketelitian yang rendah disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

2. Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

1) Alat dan bahan disiapkan

- 2) Media NA ditimbang sebanyak 2,5 gram
 - 3) Serbuk media NA yang sudah ditimbang dipindahkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 105 ml aquadest, lalu diaduk.
 - 4) Larutan dihomogenkan dengan bantuan pemanasan, jangan sampai mendidih.
 - 5) Media disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - 6) Media yang telah disterilisasi dituang ke dalam masing-masing cawan petri steril secara aseptik (dibelakang lampu spiritus)
 - 7) Media dibiarkan dalam cawan petri hingga memadat
 - 8) Media yang telah memadat dimasukkan ke dalam incubator ($\pm 37^{\circ}\text{C}$), selama ± 24 jam untuk uji kualitas media, posisi cawan petri terbalik.
3. Pembuatan Larutan Standar
Mc Farland

Larutan standar Mc Farland dibuat dengan cara mencampurkan 9,5 ml larutan H_2SO_4 1% dengan 0,5 ml larutan BaCl_2 1% sehingga volume menjadi 10 ml. Larutan dikocok hingga homogen dan siap digunakan sebagai standar untuk membandingkan suspensi bakteri (Sutton, 2011).

4. Pembuatan Stok Bakteri

Media *Nutrient Agar* (NA) yang telah dibuat dan telah disterilkan dari *auto clave* segera dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5mL, lalu dimiringkan hingga memadat. Bakteri uji yang digunakan atau bakteri yang akan dimurnikan adalah *Staphylococcus aureus*. Pembuatan stok bakteri ini dilakukan dengan menggunakan ose dan pengerjaanya harus dibelakang lampu spiritus. Caranya dengan mengambil bakteri menggunakan ose kemudian ditanam atau diinokulasikan dengan menggoreskan pada media NA yang sudah dimiringkan tadi lalu diinkubasi didalam *inkubator* dengan suhu 37°C selama 1x24 jam.

5. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji.

Pembuatan suspensi bakteri diambil bakteri uji dengan menggunakan kawat ose steril kemudian disuspensikan dalam 2 mL NaCl 0,9% dalam tabung reaksi steril dan dihomogenkan sesuai standar Mc. Farland 0,5 yang ditandai dengan terbentuknya kekeruhan setelah disuspensikan.

6. Pembuatan Antibiotik *Ampicillin* sebagai kontrol positif

Dibuat konsentrasi 10% dengan menimbang *Ampicilin* sebanyak 1 gram, lalu dilarutkan kedalam 9 mL aquadest steril sehingga diperoleh konsentrasi 10%.

7. Pembuatan Sari Daun Pegagan (*Centella asiatica*)

- Daun pegagan diambil sebanyak 500 gram lalu dicuci dan ditiriskan
- Daun pegagan dimasukkan kedalam ulekan untuk diulek
- Daun pegagan yang telah diulek kemudian diperas menggunakan kain
- Larutan yang didapatkan disaring menggunakan kertas saring
- Cairan yang telah disaring ditampung dalam gelas beker steril lalu ditutup
- Sari daun pegagan diperoleh 100% murni (tanpa penambahan larutan lain)

8. Pembuatan Konsentrasi

- a) Alat dan bahan disiapkan

Tabel 1. Tabel Volume Sari Daun Pegagan dan Volume Aquadest

NO	Konsentrasi (M2)	Volume Sari Daun Pegagan (V1)	Volume Aquadest Yang Ditambahkan	Volume Akhir
1	40 %	4 ml	6 ml	10 ml
2	60%	6 ml	4 ml	10 ml
3	80%	8 ml	2 ml	10 ml
4	100%	10 ml	-	10 ml

- b) Sari daun pegagan dan aquadest dipipet sesuai dengan volume yang tercantum pada tabel
- c) Larutan dihomogenkan lalu diberi label

2. Analitik

a. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembiakan bakteri dilakukan sebanyak 1-2 ose dan disuspensikan kedalam 5 ml NaCl 0,9% sampai diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5 McFarland atau sebanding dengan jumlah bakteri 10^8 (CFU)/ml.

b. Metode *Difusi Agar (Disk Diffusion Method)*

1. Biakan bakteri *Staphylococcus aureus* disiapkan
2. Suspensi bakteri dibuat dengan cara menginokulasi biakan bakteri pada NaCl 0,9%.
3. Suspensi bakteri ditambahkan sebanyak 0,1 mL pada media NA dan diratakan menggunakan *drigalsky*.
4. Biakan dibiarkan 5 menit agar terdifusi kedalam media.
5. Masing-masing *paper disk* dicelupkan pada sari daun pegagan selama 10 menit pada masing-masing konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100%.
6. Kertas *paper disk* diletakkan dengan pinset steril
7. Kontrol positif dilakukan dengan menggunakan *Ampicillin*
8. Cawan petri dibungkus dengan menggunakan kertas, lakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam
9. Zona bening diamati pada daerah sekitar *paper disk*.

3. Pasca Analitik

Berdasarkan hasil pengukuran yang dijadikan sebagai hasil penelitian.

- 1) Positif (+) : Terbentuk zona hambat (daerah jernih) sekitar *paper disc*.
- 2) Negatif (-) : Tidak terbentuk zona hambat (daerah jernih) sekitar *paper disc*.

Nilai diameter dari zona hambat yang dianalisa secara deskriptif dapat dikategorikan menjadi :

- 1) *Resistance* : ≤ 12 mm
- 2) *Intermediate* : 13-16 mm
- 3) *Sensitive* : ≥ 17 mm

H. Pengolahan Data

Proses pengolahan data yaitu mentabulasi (*tabulating*) dimana tabulasi merupakan proses untuk mengelompokkan data ke dalam suatu data tertentu menurut sifat-sifat yang dimiliki sesuai dengan tujuan penelitian.

I. Analisis Data

Untuk mengetahui kemampuan daya hambat dari sari daun pegagan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, diperoleh data hasil penelitian analisis deskriptif. Analisis deskriptif merupakan metode analisis yang digunakan untuk menganalisis data dengan menggambarkan data-data yang telah dikumpulkan seadanya tanpa ada maksud membuat generalisasi dari hasil penelitian. Dimana analisis deskriptif dilakukan dengan melihat ragam besar konsentrasi sari daun pegagan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

J. Penyajian Data

Data yang telah dianalisis disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian dijelaskan dalam bentuk narasi.