

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan *eksperimental laboratory*, dengan menggunakan desain *one shot case study* yaitu desain penelitian dengan perlakuan terhadap variabel *independent*. Dimana dalam penelitian ini, dilakukan pengujian terhadap ekstrak daun bakau (*Rhizophora sp.*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% menggunakan antibiotik sebagai kontrol positif yaitu *tetracycline* dengan kriteria resisten ≤ 14 , intermediate 15-18 mm dan sensitifitas ≥ 19 mm.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Pengambilan Sampel

Tempat pengambilan sampel yaitu Dermaga Kelurahan Lalowaru, Kec. Moramo Utara, Kab. Konawe selatan, Sulawesi Tenggara. Sedangkan biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Bina Husada Kendari.

2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Bina Husada Kendari.

3. Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada 30 Maret s/d 25 Mei 2023.

C. Bahan Uji

1. Bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang dimaksud dalam penelitian ini merupakan biakan murni *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Bina Husada Kendari.

2. Daun Bakau (*Rhizophora sp.*)

Daun bakau yang akan digunakan adalah daun bakau telah yang telah ditimbang sebanyak 500 gr yang kemudian diolah menjadi ekstrak dan dibuatkan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

D. Prosedur Penelitian

1. Pra Analitik

- a. Persiapan alat dan bahan
- b. Metode *Kirby Bauer* (Difusi disk)
- c. Prinsip

Siapkan media agar yang telah ditanami mikroorganisme, kemudian letakkan cakram yang berisi agen antimikroba di atasnya. Selanjutnya akan terjadi difusi pada media tersebut. Daerah yang jernih menandakan ada hambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme yang disebabkan agen antimikroba di permukaan agar.

- d. Persiapan alat dan bahan dalam penelitian ini yaitu mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan selama proses penelitian dari awal hingga selesai.

1) Alat:

Neraca analitik, autoclave, oven, cawan petri, pengaduk, gelas ukur, erlenmeyer, incubator, gelas kimia, pipet ukur, ose jarum, pinset, driglasky, rak tabung, tabung reaksi, kain kasa, mistar, spidol, jangka sorong, Maserator, lampu spirtus, mortar dan alu.

2) Bahan

Daun bakau (*Rhizophora sp.*), biakan murni *Staphylococcus aureus*, aquadest, kertas label, kertas saring, kapas, tissue, *Tetracycline*, Etanol 96%, media Nutrient Agar (NA), media Mueller Hinton Agar (MHA) dan NaCl 0,9%.

e. Sterilisasi Alat Penelitian

Sterilisasi dilakukan pada alat-alat yang terbuat dari bahan gelas maupun logam yang mempunyai tingkat ketelitian rendah didalam oven selama 1 jam dengan suhu 180 °C, adapun alat-alat yang dibuat dari plastic atau kaca yang mempunyai tingkat keakuratan tinggi disterilkan dalam autoclave selama 15 menit dengan suhu 121 °C.

f. Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

- 1) Sebanyak 2,8 gr ditimbang media Nutrient Agar (NA)
- 2) Serbuk Nutrient Agar (NA) dipindahkan kegelas kimia, kemudian ditambahkan sebanyak 140 mL aquadest, pindahkan kedalam Erlenmeyer
- 3) Larutan di homogenkan dengan diaduk dan pemanasan
- 4) Pelarutan tidak boleh hingga mendidih (pelarutan harus sempurna sehingga tidak ada kristal yang tersisa)
- 5) Lakukan pengecekan pH larutan aquades sesuai dengan petunjuk pada media
- 6) Sterilisasi media dengan autoclave selama 15 menit dengan suhu 121 °C
- 7) Dituangkan kedalam cawan petri steril yang telah disediakan
- 8) Media yang dituang kedalam cawan petri dibiarkan hingga padat
- 9) Kemudian masukkan kedalam inkubator (+ 37°C) selama kurang lebih 24 jam guna uji kualitas media dengan posisi cawan petri terbalik.

g. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)

Media MHA dibuat dengan cara menimbang sebanyak 9,5 gram dan dimasukkan kedalam erlenmeyer lalu dilarutkan dengan 250 mL aquadest yang dihomogenkan diatas lampu spiritus hingga semua komponen media larut. Setelah semua komponen larut, media di sterilkan di dalam autoclave selama 15 menit pada suhu

121 °C. Media lalu dituang kedalam cawan petri (+ 20 mL) atau hingga permukaan plate tertutup, dilakukan dalam keadaan aseptik. Media dibiarkan beberapa saat hingga mengagar didalam cawan petri. Setelah mengagar, media dibungkus dengan kertas dengan posisi plate terbalik, diberi label lalu disimpan dilemari pendingin.

h. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dalam keadaan aseptis didepan api bunsen dengan menggunakan ose. Media NA yang telah disterilkan dengan autoclave dituang kedalam tabung reaksi sebanyak + 5 mL lalu dimiringkan hingga memadat. Selanjutnya, bakteri *Staphylococcus aureus*, dari biakan murni diambil 1 ose dan diinokulasikan dengan metode gores (Streak Plate) pada media NA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam sehingga diperoleh bakteri murni.

i. Pembuatan Suspensi Bakteri

Ambil koloni bakteri dengan ose lalu suspensikan kedalam tabung yang berisikan 9 mL NaCl 0,9%. Lakukan homogenisasi.

j. Pembuatan Antibiotik *Tetracycline* (Kontrol Positif)

Tetracycline 500 mg dibuat dalam konsentrasi 5% dengan cara menimbang 0,5 gram *Tetracycline* dan dilarutkan menggunakan aquadest sebanyak 5 mL.

k. Pembuatan Ekstrak Daun Bakau (*Rhizophora sp.*)

- 1) Daun bakau dicuci bersih menggunakan air mengalir agar kotoran yang menempel dapat dihilangkan. setelah itu, dikeringkan lalu dijemur dibawa sinar matahari hingga mengering.
- 2) Daun bakau yang telah mengering ditimbang sebanyak 500 gram kemudian digerus hingga halus sampai membentuk serbuk.

- 3) Kemudian dilakukan proses ekstraksi menggunakan teknik maserasi dimana daun bakau yang kering dimasukkan kedalam maserator lalu ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 1000 mL. 6 jam pertama lakukan pengadukan kemudian diamkan lagi selama 3x24 jam, hingga di dapatkan maserat dari hasil perendaman.
- 4) Selanjutnya dilakukan penguapan dengan tujuan memisahkan ekstrak dengan larutan perendaman selama 1x24 jam sehingga diperoleh ekstrak yang kental.
- 5) Setelah didapatkan ekstrak tanaman bakau kemudian, ditampung kedalam beaker glass steril lalu ditutup.
- 6) Ekstrak daun bakau kemudian dibuat dengan beberapa konsentrasi yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

1. Pembuatan konsentrasi

Ekstrak daun bakau dibuat dengan 5 konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% dengan masing masing konsentrasi memiliki volume total 10 mL. Ekstrak daun bakau yang diambil kemudian dihitung dengan rumus

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

Keterangan :

V_1 : Volume larutan stok

M_1 : Konsentrasi larutan.stok

V_2 : Volume larutan perlakuan

M_2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan

Berdasarkan rumus pengenceran yang dihitung, maka pembuatan dari 5 konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% ekstrak daun bakau (*Rhizophora apiculata*) yaitu :

- 1) Konsentrasi 20% dibuat dengan 2 mL ekstrak daun bakau kemudian ditambahkan 8 mL aquadest lalu dihomogenisasi

- 2) Konsentrasi 40% dibuat dengan 4 mL ekstrak daun bakau kemudian ditambahkan 6 mL aquadest lalu dihomogenisasi
- 3) Konsentrasi 60% dibuat dengan 6 mL ekstrak daun bakau kemudian ditambahkan 4 mL aquadest lalu dihomogenisasi
- 4) Konsentrasi 80% dibuat dengan 8 mL ekstrak daun bakau kemudian ditambahkan 2 mL aquadest lalu dihomogenisasi
- 5) Konsentrasi 100% dibuat dengan 10 mL ekstrak daun bakau lalu dihomogenisasi.

Tabel 1. Perbandingan Volume Konsentrasi Ekstrak Daun bakau dalam 10 mL

No	Konsentrasi	Volume Ekstrak	Volume Aquadest	Vol. Akhir
1.	20%	2 mL	8 mL	10 mL
2.	40%	4 mL	6 mL	10 mL
3.	60%	6 mL	4 mL	10 mL
4.	80%	8 mL	2 mL	10 mL
5.	100%	10 mL	0 mL	10 mL

2. Analitik

- 1) Siapkan biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*
- 2) Buat suspensi bakteri dengan cairan okulasi biakan pada NaCl 0,9%
- 3) Tambahkan 0,1 mL suspensi bakteri pada media MHA dan kemudian ratakan menggunakan *drigal sky*
- 4) Selanjutnya diamkan 5-10 menit agar biakan terdifusi kedalam media
- 5) Celupkan masing-masing paper disk pada ekstrak daun bakau pada masing-masing konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%
- 6) Letakkan paper disk dengan pinset steril ditengah media MHA
- 7) Lakukan Control positif dan negatif

- a. Control positif = media *Mueller Hinton Agar* + *Tetracycline*
Control negatif = media *Mueller Hinton Agar* + aquadest
- 8) Bungkus cawan petri menggunakan kertas, lakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 1x24 jam
- 9) Amati ada tidaknya zona bening yang terjadi pada daerah sekitar paper disk.

3. Pasca Analitik

a. Pencatatan hasil penelitian

Pencatatan hasil penelitian merupakan pencatatan hasil yang dilakukan berupa aktivitas dalam bentuk tulisan baik ditulis tangan/diketik, atau berbentuk grafik/gambar dari hasil pengukuran dan pengamatan yang telah dilakukan. Berikut rumus pencatatan hasil penelitian yaitu :

$$\frac{(DV - DC) + (DH - DC)}{2}$$

Keterangan.:

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal.

DC : Diameter Cakram

b. Pengolahan data hasil penelitian

Hasil penelitian dikatakan efektif jika terbentuk zona hambat dengan tiga kategori, yaitu :

- 1) Zona hambat dalam batas resisten : ≤ 14 milimeter
- 2) Zona hambat dalam batas intermediate: 15-18 milimeter
- 3) Zona hambat dalam batas sensitif : ≥ 19 milimeter

Hasil penelitian tersebut dikategorikan tidak efektif jika tidak terbentuk zona hambat.

c. Dokumentasi hasil penelitian

Dokumentasi hasil penelitian adalah kegiatan dalam mengambil hasil suatu penelitian berupa foto/gambar yang

berkaitan dengan kegiatan pra analitik, analitik dan pasca analitik dalam suatu penelitian.

d. Pelaporan hasil penelitian

Pelaporan hasil penelitian merupakan kegiatan dalam melaporkan suatu hasil penelitian setelah melakukan pengamatan dan pengukuran hasil penelitian harus dilaporkan berdasarkan hasil pengukuran dan pengamatan yang telah didapatkan.

E. Prosedur Pengumpulan Data

Pengumpulan data sangat penting dilakukan karena berhubungan erat dengan data-data yang akan diperoleh selama penelitian berlangsung. Data yang digunakan berasal dari jurnal atau buku peneliti yang telah dilakukan sebelumnya.

F. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian memuat uraian terkait dengan, spesifikasi dari instrumen/alat/media dalam penelitian yang hendak digunakan saat pengumpulan data, yaitu :

1. Logbook (laporan harian penelitian).
2. Lembar hasil pengamatan.

G. Jenis Data

1. Data primer

Data primer merupakan data yang didapati langsung melalui hasil penelitian uji daya hambat daun bakau (*Rhizophoda sp.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

2. Data sekunder

Data sekunder merupakan data yang dikumpulkan dari buku, jurnal dan penelitian-penelitian terdahulu yang dipublikasikan yang kemudian dijadikan landasan teoritis.

H. Pengolahan Data

Data yang diperoleh akan diproses dengan beberapa tahapan sebagai berikut :

1. *Editing* (Pemeriksaan data), merupakan pengecekan atau pemeriksaan kelengkapan dan konsistensi data yang telah dikumpulkan.
2. *Coding* (Pengkodean data), merupakan kegiatan memberikan identitas pada data sehingga memudahkan dalam menganalisis data.
3. *Tabulating* (Mentabulating), merupakan pengelompokkan data dalam bentuk tabel atas sifat-sifat yang sebanding dengan tujuan penelitian.

I. Analisi Data

Dalam penelitian ini akan dianalisis dengan metode deskriptif berdasarkan kategori zona hambat yaitu resisten ≤ 14 mm, *intermediate* 15-18 mm, dan *sensitive* ≥ 19 mm.

J. Penyajian Data

Penyajian data pada penelitian ini akan disajikan dalam bentuk gambar dan tabel, dan selanjutnya akan dinarasikan.

K. Etika Penelitian

Etika penelitian adalah suatu pedoman etika yang berlaku untuk setiap kegiatan penelitian yang melibatkan pihak peneliti dengan pihak yang diteliti dan masyarakat yang akan memperoleh dampak hasil penelitian tersebut. Pengambilan data dapat diambil dengan etika sebagai berikut:

1. *Anonymity* (Tanpa nama)

Dilakukan dengan cara tidak memberikan nama responden pada lembar data, dan hanya memberikan kode pada lembar pengambilan data.

2. *Informed Consent* (Lembar persetujuan)

Lembar persetujuan diberikan pada responden yang akan diteliti yang memenuhi kriteria inklusi. Bila subjek menolak, maka peneliti tidak memaksa dan tetap menghormati hak-hak subjek.

3. *Confidentiality* (Kerahasiaan)

Menjamin kerahasiaan hasil penelitian baik informasi maupun masalah-masalah lainnya. Informasi yang dikumpulkan dijamin kerahasiaannya oleh peneliti, hanya kelompok dan data tertentu yang akan dilaporkan pada hasil pemeriksaan.