

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan metode eksperimen laboratorium dengan desain “*One-Shot Case Study*”. Metode eksperimen merupakan metode penelitian untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu. Hasil eksperimen yang merupakan variabel dependen tidak hanya di pengaruhi oleh variabel independen. Hal ini terjadi karena tidak adanya variabel kontrol dan sampel tidak dipilih secara random. *One-Shot Case Study* yaitu desain penelitian yang terdapat suatu kelompok diberi perlakuan/*treatment* lalu diamati hasilnya. Adapun desain penelitian *One-Shot Case Study* sebagai berikut :

Tabel 5
Pola Desain *One-Shot Case Study*

X	O
---	---

Keterangan :

X : Treatment yang diberikan (variabel independen)

O : Observasi (variabel dependen)

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Pengambilan Sampel

Tempat pengambilan sampel daun sintrong yaitu Kelurahan Ambalodangge Kecamatan Laeya Kabupaten Konawe Selatan Provinsi Sulawesi Tenggara. Sedangkan biakkan murni bakteri *Bacillus sp* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Haluoleo.

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 23 Mei s/d 23 Juni 2024.

C. Bahan Uji

1. Bakteri *Bacillus* sp

Bakteri *Bacillus* sp yang digunakan dalam penelitian ini merupakan biakan murni *Bacillus* sp yang di peroleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Haluoleo.

2. Daun Sintrong (*Crassocephalum crepidioides*)

Daun sintrong yang akan digunakan adalah daun sintrong yang telah diseleksi sesuai kriteria objektif dan ditimbang sebanyak 500 gram yang selanjutnya diolah menjadi ekstrak dan di buat menjadi lima konsentrasi yaitu 1,25%, 2,5%, 5%, 10% dan 20%.

D. Prosedur Penelitian

Pengujian daya hambat dalam penelitian ini dilakukan melalui tiga tahapan, yaitu :

1. Pra Analitik

a. Metode : Difusi Cakram (Kirby-Bauer) dan Dilusi cair

b. Prinsip

➤ Prinsip: Metode Kirby-Bauer adalah uji sensitivitas bakteri menggunakan metode difusi cakram. Bakteri yang akan diuji disuspensikan dalam standar dan diinokulasi ke permukaan *Mueller Hinton Agar* (MHA). Cakram kertas saring yang telah diberi konsentrasi antibiotik tertentu kemudian pada *Mueller Hinton Agar* dan diinkubasi pada 35°C selama semalaman (18-24 jam). Setelah inkubasi, zona hambat pertumbuhan bakteri di sekitar setiap cakram diukur dan ditentukan kerentanannya (Apriani dkk, 2023).

➤ Prinsip metode dilusi cair adalah pengenceran bahan uji untuk menghasilkan beberapa konsentrasi, yang kemudian masing-masing dicampur dengan suspensi bakteri (Saragih, 2023). Penentuan KHM ekstrak daun sintrong dapat diamati dari konsentrasi terendah pada tabung dengan hasil biakan

menunjukkan kejernihan (tidak ada pertumbuhan mikroba) (Fitriana dkk, 2020).

c. Persiapan alat dan bahan

Persiapan alat dan bahan adalah tahapan untuk menyiapkan berbagai alat dan bahan yang digunakan selama proses penelitian dari awal hingga selesai.

1) Alat

Autoklaf, oven, stirer, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, batang pengaduk, gelas kimia, neraca analitik, sendok tanduk, cawan porselin, lampu spirtus, *aluminium foil*, kapas, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose, mikropipet, kain kasa, spidol, inkubator, mortar, alu, dispenser cakram atau pinset, pensil penanda alat gelas, jembatan pewarnaan dan jangka sorong.

2) Bahan

Daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*), biakan murni *Bacillus sp*, *kloramfenikol*, kertas label, tisu, kertas saring, etanol 96%, media *Nutrient Agar* (NA), media *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), NaCl 0,9%, Mc Farland 0,5, cakram kertas saring, lugol, gentian violet, carbol fuchsin, alkohol 70% dan kapas bertangkai steril.

d. Sterilisasi Alat Penelitian

Alat penelitian yang akan digunakan harus dicuci terlebih dahulu kemudian dikeringkan dan disterilisasi. Untuk peralatan yang terbuat dari bahan gelas atau logam dengan tingkat ketelitian rendah akan disterilkan di dalam oven selama 1 jam pada suhu 180°C, sedangkan peralatan yang terbuat dari plastik atau kaca dengan tingkat keakuratan tinggi disterilkan di dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah proses sterilisasi selesai, peralatan didinginkan dan disimpan di tempat yang telah disiapkan.

- e. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- 1) Media MHA ditimbang sebanyak 9,5 gram menggunakan neraca analitik
 - 2) Selanjutnya media MHA dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan dilarutkan dengan 250 ml aquades
 - 3) Larutan di homogenkan menggunakan stirer sampai benar-benar homogen
 - 4) Media disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C
- f. Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)
- 1) Ditimbang 2,3 gram NA
 - 2) Selanjutnya NA dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan dilarutkan dengan 100 ml aquades
 - 3) Larutan di homogenkan menggunakan stirer
 - 4) Pelarutan harus sempurna hingga tidak ada kristal yang tersisa tetapi tidak boleh mendidih
 - 5) Larutan dituang ke dalam tabung reaksi steril kemudian ditutup dengan aluminium foil
 - 6) Sterilisasi media di dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C
 - 7) Media yang steril dibiarkan pada suhu ruangan selama 30 menit hingga media memadat pada kemiringan 30°.
- g. Pembuatan media *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B)
- 1) Ditimbang sebanyak 7,4 gram serbuk BHI-B
 - 2) Selanjutnya serbuk BHI-B dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan dilarutkan dengan 200 mL aquades
 - 3) Homogenkan sampai larutan merata
 - 4) Erlenmeyer kemudian ditutup dengan aluminium foil dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

h. Peremajaan Bakteri

- 1) Bakteri *Bacillus sp* di inokulasikan pada media NA miring menggunakan ose steril
- 2) Selanjutnya media yang berisi bakteri diinkubasi ke dalam inkubator selama 1x24 jam

i. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

- 1) Bakteri *Bacillus sp* yang telah diremajakan pada media *Nutrient Agar* miring diambil menggunakan jarum ose steril
- 2) Selanjutnya dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah diisi dengan 9 ml NaCl 0,9%
- 3) Kemudian homogenisasi menggunakan vortex lalu disesuaikan kekeruhannya dengan standar Mc Farland.

j. Pembuatan Antibiotik *Kloramfenikol* (Kontrol Positif)

- 1) *Kloramfenikol* ditimbang sebanyak 0,025 gram
- 2) Selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 5 mL aquades
- 3) Homogenkan sampai larutan merata
- 4) *Kloramfenikol* dengan konsentrasi 0,5% siap digunakan

k. Pembuatan ekstrak daun sintrong

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi (Malik dkk, 2020; Assauqi dkk, 2022).

- 1) Daun sintrong yang telah terkumpul dicuci bersih menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun. Setelah itu, dikeringkan menggunakan oven
- 2) Daun sintrong yang telah kering dihaluskan menggunakan blender kemudian diayak sampai diperoleh serbuk halus
- 3) Serbuk daun sintrong ditimbang sebanyak 500 gram kemudian di ekstraksi dengan metode maserasi yaitu serbuk daun sintrong dimasukkan ke dalam wadah lalu ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 2 liter

- 4) Wadah maserasi ditutup dan diamankan selama 3x24 jam sambil sesekali di aduk
 - 5) Selanjutnya disaring dan dipisahkan antara ampas dan filtrat sampel
 - 6) Ampas yang diperoleh pada hasil penyaringan pertama dimaserasi kembali menggunakan etanol 96% yang baru dengan jumlah yang sama sehingga diperoleh filtrat berikutnya
 - 7) Filtrat 1 & 2 dikumpulkan dalam wadah dan dicampur
 - 8) Dilakukan penguapan menggunakan rotary evaporator pada suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak etanol daun sintrong yang kental
 - 9) Ekstrak daun sintrong tersebut ditampung kedalam beker gelas steril lalu ditutup
 - 10) Selanjutnya ekstrak daun sintrong dibuat menjadi beberapa konsentrasi 1,25%, 2,5%, 5%, 10% dan 20%
1. Pembuatan larutan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram (Kirby-Bauer)

Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak daun sintrong dilakukan dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

V_1 : Volume sebelum pengenceran

M_1 : Konsentrasi sebelum pengenceran

V_2 : Volume setelah pengenceran

M_2 : Konsentrasi setelah pengenceran

Tabel 6
Volume Pengenceran Konsentrasi Ekstrak Daun Sintrong

No	Konsentrasi Stok (M1)	Volume Ekstrak Daun Sintrong (V1)	Volume Aquades Yang Ditambahkan	Konsentrasi Akhir (M2)	Volume Akhir (V2)
1	100%	2 ml	8 ml	20 %	10 ml
2	100%	1 ml	9 ml	10 %	10 ml
3	100%	0,5 ml	9,5 ml	5 %	10 ml
4	100%	0,25 ml	9,75 ml	2,5 %	10 ml
5	100%	0,125 ml	9,875 ml	1,25 %	

- m. Pembuatan larutan uji untuk penentuan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM)

Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak daun sintrong dilakukan dengan metode serial dilusi atau pengenceran bertahap sehingga diperoleh sejumlah konsentrasi. Ekstrak daun sintrong yang diambil untuk konsentrasi 20% dihitung dengan rumus :

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

Keterangan :

V_1 : Volume sebelum pengenceran

M_1 : Konsentrasi sebelum pengenceran

V_2 : Volume setelah pengenceran

M_2 : Konsentrasi setelah pengenceran

- 1) Siapkan 6 tabung reaksi steril
- 2) Tabung 1 diisi dengan ekstrak daun sintrong sebanyak 0,4 ml kemudian ditambahkan 1,6 ml aquades. Larutan ini merupakan larutan awal.
- 3) Tabung 2-6 diisikan media BHI-B sebanyak 1 ml ke setiap tabungnya
- 4) Selanjutnya 1 ml larutan dari tabung 1, dicampur ke dalam tabung 2 sampai tercampur sempurna sehingga didapatkan konsentrasi 20%.

- 5) Kemudian 1 ml larutan dari tabung 2, dicampur ke dalam tabung 3 hingga diperoleh konsentrasi 10%.
 - 6) Hal serupa dikerjakan sampai tabung ke-6 (konsentrasi 1,25%). Pada tabung ke-6 dibuang 1 ml larutan.
- n. Identifikasi bakteri melalui pewarnaan gram
- 1) Buat preparat.
 - 2) Fiksasi diatas api bunsen sampai kering.
 - 3) Genangi dengan gentian violet selama 1 menit, bilas dengan air mengalir.
 - 4) Genangi dengan lugol selama 1 menit, bilas dengan air mengalir.
 - 5) Genangi dengan alkohol hingga jernih, bilas dengan air mengalir.
 - 6) Genangi dengan carbol fuchsin selama 1 menit, bilas dengan air mengalir.
 - 7) Keringkan dan amati pada pembesaran 100x.

2. Analitik

- a. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram (Kirby-Bauer)
- 1) Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga menjadi padat
 - 2) Suspensi bakteri *Bacillus sp* ditambahkan ke media MHA yang telah padat dan disebarakan menggunakan batang segitiga
 - 3) Kertas cakram direndam ke dalam masing-masing konsentrasi
 - 4) Setelah kering, kertas cakram diletakkan pada permukaan agar yang sudah diinokulasi bakteri
 - 5) Lakukan kontrol positif dan kontrol negatif
 - Kontrol positif = media MHA + *kloramfenikol*
 - Kontrol Negatif = media MHA + aquades
 - 6) Selanjutnya proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C
 - 7) Amati zona bening yang terbentuk pada daerah sekitar kertas cakram (Aviany dan Pujiyanto, 2020).

b. Penentuan nilai KHM

Tujuh tabung reaksi steril disiapkan untuk setiap bakteri uji. Masing-masing ditandai dengan label 1-7, kemudian lanjutkan ke tahap sebagai berikut :

- 1) Tabung 1-5 merupakan larutan konsentrasi uji yang telah disiapkan
- 2) Pada tabung no.6 yaitu kontrol positif, yakni berisi suspensi bakteri *Bacillus sp* dan media BHIB sedangkan tabung no.7 merupakan kontrol negatif yaitu berisi ekstrak daun sintrong dan media BHIB.
- 3) Setiap tabung reaksi 1-5 yang berisi ekstrak daun sintrong ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 1 ml kemudian homogenisasi
- 4) Setelah itu, diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
- 5) Diamati kekeruhan dan dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif.

3. Pasca Analitik

a. Pencatatan Hasil Penelitian

Pencatatan hasil penelitian mencakup dokumentasi aktivitas berupa tulisan tangan atau ketikan, serta grafik atau gambar yang mencerminkan hasil pengamatan dan pengukuran yang telah dilakukan dalam penelitian.

- Berikut rumus pencatatan hasil pengukuran diameter zona hambat yaitu :

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

Keterangan.:

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

- Konsentrasi hambat minimum ditentukan dengan positif (+) terjadi kekeruhan berarti ada pertumbuhan bakteri dan negatif (-) tidak terjadi kekeruhan yang berarti tidak ada pertumbuhan bakteri.

b. Pengolahan Data Hasil Penelitian

- Diameter zona hambat

Hasil penelitian dianggap efektif jika terbentuk zona bening dengan tiga kategori, yaitu :

- 1) Zona bening dalam batas *resistant* : ≤ 14 mm
- 2) Zona bening dalam batas *intermediate* : 15-19 mm
- 3) Zona bening dalam batas *susceptible* : ≥ 20 mm

Hasil penelitian tersebut dianggap tidak efektif jika tidak terbentuk zona bening.

- Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) memerlukan perhatian terhadap tingkat kekeruhan larutan uji sebagai parameter penting. KHM ditetapkan sebagai konsentrasi terkecil pada larutan yang masih mempertahankan kejernihan (Rollando, 2019).

c. Dokumentasi Hasil Penelitian

Pendokumentasian hasil penelitian dilakukan dengan mengambil foto atau gambar yang terkait dengan kegiatan pra-analitik, analitik dan pasca-analitik dalam suatu penelitian.

d. Pelaporan Hasil Penelitian

Melaporkan hasil penelitian adalah kegiatan menyampaikan informasi mengenai hasil penelitian setelah melakukan observasi dan pengukuran.

E. Prosedur Pengumpulan Data

Pengumpulan data sangat penting dilakukan karena berkaitan erat dengan informasi yang akan diperoleh selama penelitian berlangsung. Proses pengumpulan data dimulai dari pengumpulan jurnal dan studi literatur yang

relevan dengan penelitian ini. Kemudian berlanjut pada pengamatan secara langsung terhadap objek yang diteliti.

F. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian mencakup penjelasan mengenai karakteristik dari instrumen, alat atau media yang akan digunakan selama proses pengumpulan data. Beberapa instrumen yang akan digunakan dalam penelitian ini, yaitu :

1. Catatan harian penelitian (*logbook*)
2. Lembar hasil pengamatan

G. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer merupakan data yang diperoleh secara langsung melalui hasil penelitian uji daya hambat daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) terhadap bakteri *Bacillus sp.*

2. Data Sekunder

Data sekunder merupakan data yang berasal dari jurnal, buku dan berbagai penelitian terdahulu yang telah dipublikasikan dan kemudian dijadikan sebagai landasan teori.

H. Pengolahan Data

Data yang telah dikumpulkan dari hasil penelitian akan melalui beberapa tahapan pengolahan, yang mencakup :

1. *Editing* (Pemeriksaan data), yakni langkah untuk memeriksa kelengkapan dan konsistensi data yang telah terkumpul.
2. *Coding* (pengkodean data), merupakan kegiatan pemberian kode atau identitas pada data agar mempermudah proses analisis data.
3. *Tabulating* (mentabulasi), merupakan proses pengelompokkan data dalam bentuk tabel berdasarkan karakteristik yang sesuai dengan tujuan penelitian.

I. Analisis Data

Analisis data dilaksanakan untuk mengevaluasi distribusi data dari variabel yang sedang dianalisis, yakni variabel bebas (ekstrak daun sintrong) dan variabel terikat (diameter zona hambat dan nilai KHM). Metode analisis

diameter zona hambat menggunakan metode deskriptif berdasarkan kategori zona hambat yaitu *resistant* (≤ 14 mm), *intermediate* (15-19 mm) dan *susceptible* (≥ 20 mm). Sedangkan metode analisis nilai konsentrasi hambat minimum didasarkan oleh observasi tingkat kekeruhan pada media. Informasi yang terkumpul dari variasi konsentrasi yang berbeda kemudian disusun dalam tabel dan dianalisis untuk mendapatkan kesimpulan.

J. Penyajian Data

Data yang telah dianalisis akan disajikan dalam bentuk gambar dan tabel, kemudian akan dinarasikan.

K. Etika Penelitian

Penelitian ini mengikuti prinsip-prinsip etika penelitian yang telah ditetapkan dan dalam penelitian ini tidak ada penggunaan hewan uji atau manusia sebagai sampel.