

BAB IV

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah *eksperimental laboratory*, dengan menggunakan pendekatan *one-shot case study* yaitu desain perlakuan terhadap variabel independen. Pengujian menggunakan ekstrak daun bidara dengan varian konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

A. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Pengambilan Sampel

Sampel daun bidara (*Ziziphus mauritiana lam*) yang diteliti diperoleh dari wilayah Kambu, Kecamatan Kambu, Kota Kendari.

2. Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Haluoleo Kendari.

3. Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada 07 Juni sampai 04 Juli 2024

B. Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah Ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana lam*), Daun bidara yang dimaksud ialah daun bidara tua segar yang diperoleh dari Kecamatan Kambu, Kota Kendari. Pembuatan Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan konsentrasi yaitu : 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% yang kemudian diuji efektivitas ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana lam*) terhadap *Proteus mirabilis*.

C. Prosedur Pengambilan Data

Pengambilan data pada penelitian ini dikumpulkan dari awal penyusunan proposal. Data yang dikumpulkan berasal dari jurnal penelitian sebelumnya dan literatur yang mendukung. Kemudian dilakukan pengamatan efektifitas ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana Lam*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

D. Prosedur Penelitian

Pengujian daya hambat dalam penelitian ini ditentukan dalam tiga tahapan, yakni :

1. Pra Analitik

a. Persiapan Alat dan Bahan

1) Alat

Autoclave, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, gelas kimia, *incubator*, kawat ose, lampu spiritus, meserator, neraca analitik, rak tabung, corong, botol semprot, sendok tanduk, pinset, kasa/asbes, oven, pengaduk dan jangka sorong.

2) Bahan

Aluminium foil, antibiotik *gentamicin*, aquades steril, biakan murni *proteus mirabilis*, daun bidara, media MHA, Media NA, Etanol 96%, NaCl Fisiologis, *paper disc*, kapas, kertas label, kertas saring dan tisu.

b. Sterilisasi Alat Penelitian

1) Alat-alat yang terbuat dari kaca atau logam, dan memiliki tingkat ketelitian yang tinggi disterilkan didalam oven pada suhu 170°C selama 1 jam.

2) Alat yang terbuat dari kaca atau plastik dan memiliki tingkat ketelitian yang rendah disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

1) Media NA ditimbang sebanyak 5,6 gram.

2) Serbuk media NA yang sudah ditimbang dipindahkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan 200 ml aquades, lalu diaduk.

3) Larutan dihomogenkan dengan bantuan pemanasan, jangan sampai mendidih.

4) Media disterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

5) Media yang telah di sterilkan dituang dalam masing-masing

cawan petri steril secara aseptik (dibelakang lampu spiritus).

- 6) Media dibiarkan dalam cawan petri hingga memadat.
- 7) Jika sudah memadat dapat digunakan atau disimpan dalam lemari pendingin.

d. Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

- 8) Media MHA ditimbang sebanyak 11,4 gram.
- 9) Serbuk media MHA yang sudah ditimbang dipindahkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan 300 ml aquades, lalu diaduk.
- 10) Larutan dihomogenkan dengan bantuan pemanasan, jangan sampai mendidih.
- 11) Media disterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 12) Media yang telah di sterilkan dituang dalam masing-masing cawan petri steril secara aseptik (dibelakang lampu spiritus).
- 13) Media dibiarkan dalam cawan petri hingga memadat.
- 14) Jika sudah memadat dapat digunakan atau disimpan dalam lemari pendingin.

e. Pembuatan Stok Bakteri

- 1) Media NA yang telah dibuat dan disterilkan dari autoclave segera dimasukkan kedalam cawan petri sebanyak 25 ml, jika sudah memadat dapat digunakan.
- 2) Bakteri uji yang digunakan atau bakteri yang akan dimurnikan adalah *Proteus mirabilis*. Pembuatan stok ini dilakukan dengan menggunakan ose dan pengerjaannya harus dibelakang api bunsen, caranya dengan mengambil bakteri dengan menggoreskan pada media NA yang sudah memadat di cawan petri lalu diinkubasi didalam inkubator dengan suhu 37°C selama 1x24 jam.

f. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

- 1) Biakan bakteri diambil menggunakan kawat ose.
- 2) Kemudian disuspensikan dalam 5 ml NaCl 0,9 % dalam tabung reaksi steril dan dihomogenkan hingga terbentuknya kekeruhan setelah disuspensikan.

g. Pembuatan Antibiotik *Gentamicin* (Kontrol Positif)

- 1) Timbang serbuk *gentamicin* sebanyak 0,5 mg
- 2) Larutkan serbuk tersebut dalam 10 ml aquades steril
- 3) Campurkan larutan secara perlahan sehingga serbuk larut sepenuhnya
- 4) Tempatkan larutan dalam vial steril
- 5) Simpan di lemari pendingin pada suhu 2-8 derajat C.

h. Pembuatan Larutan Standar Mc Farland

- 1) Masukkan Barium Klorida (BaCl_2) 0,1 gram ke dalam 100 ml aquades dan homogenkan
- 2) Masukkan larutan asam sulfat (H_2SO_4) 1,1ml ke dalam 50 ml aquades dan homogenkan.
- 3) Campurkan kedua larutan yang telah dibuat dengan perbandingan 0,05 ml BaCl_2 dan 9,95 mL H_2SO_4 .
- 4) Lalu homogenkan untuk selanjutnya dijadikan pembanding suspensi bakteri, gunakan wadah gelap untuk melindungi dari cahaya yang dapat merusaknya.

i. Pembuatan Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana Lam*) metode meserasi

- 1) Bersihkan daun bidara segar kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60° selama 4 Jam.
- 2) Setelah kering, daun bidara dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan blender.
- 3) Timbang 500 gr serbuk daun bidara lalu masukkan kedalam bejana gelap.
- 4) Tambahkan 1000 ml pelarut etanol 96% lalu tutup rapat serta

terhindar dari matahari langsung. Proses perendaman selama 3 hari.

- 5) Campuran serbuk dan etanol diaduk setiap 6 jam sekali. Setelah 3 hari, campuran serbuk dan etanol diserkai sehingga diperoleh maserat.
- 6) Berikutnya buat ekstraksi daun bidara dalam 5 konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.
- 7) Volume ekstrak daun bidara yang diambil dihitung dengan rumus pengenceran sebagai berikut :

$$\% = \frac{b}{v} \times 100$$

Keterangan :

% : Variasi Konsentrasi (Konsentras Akhir)

b : Massa Ekstrak

v : Volume Pengenceran

Berdasarkan rumus pengenceran, ada 5 macam konsentrasi adalah sebagai berikut :

- 1) Konsentrasi 20%, yaitu 2 ml ekstrak dan ditambahkan 8 ml aquades kemudian dihomogenkan.
- 2) Konsentrasi 40% yaitu 4 ml ekstrak dan ditambahkan 6 ml aquades kemudian dihomogenkan.
- 3) Konsentrasi 60% yaitu 6 ml ekstrak dan ditambahkan 4 ml aquades kemudian dihomogenkan.
- 4) Konsentrasi 80% yaitu 8 ml ekstrak dan ditambahkan 2 ml aquades kemudian dihomogenkan.
- 5) Konsentrasi 100% yaitu 10 ml ekstrak tanpa aquades.

Tabel 1. Volume pengenceran konsentrasi ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana lam*)

NO	%	<i>b</i>	Volume Aquades	%	Volume Aquades
1.	100%	2 ml	8 ml	20%	10 ml
2.	100%	4 ml	6 ml	40%	10 ml
3.	100%	6 ml	4 ml	60%	10 ml
4.	100%	8 ml	2 ml	80%	10 ml
5.	100%	10 ml	0 ml	100%	10 ml

(Sumber : Data Primer)

2. Analitik

a. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana lam*) terhadap bakteri Uji.

Tujuan : Untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana lam*) terhadap Bakteri *Proteus mirabilis*.

Metode : Difusi Agar Kirby-Bauer.

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

b. Prosedur Kerja

- 1) Menyiapkan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)
- 2) Menyiapkan suspensi bakteri pada NaCl 0,9 %
- 3) Memberi label masing-masing cawan.

- 4) Menambahkan 5 ml suspensi bakteri pada media MHA dan diratakan menggunakan *drigalsky*.
- 5) Biarkan 5-10 menit agar biakan berdifusi kedalam media.
- 6) Mencilupkan masing-masing *paper disc* pada ekstrak daun bidara selama 10 menit pada masing masing konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.
- 7) Meletakkan paper disk dengan pinset, atur jarak antara masing masing *paper disc*.
- 8) Menggunakan kontrol positif menggunakan *Gentamicin* yang sudah diencerkan.
- 9) Menggunakan kontrol negatif menggunakan Aquades.
- 10) Bungkus cawan petri dengan menggunakan kertas, dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam.
- 11) Mengamati ada tidaknya zona bening pada daerah *paper disc*
- 12) Mengukur zona hambat ekstrak daun bidara terhadap pertumbuhan bakteri *Proteus mirabilis* menggunakan jangka sorong.

3. Pasca Analitik

a. Pencatatan hasil penelitian

Pencatatan hasil penelitian merupakan pencatatan suatu aktifitas dalam bentuk tulisan baik diketik maupun di tulis tangan atau dalam bentuk grafik dan gambar dari hasil pengamatan. Pencatatan hasil penelitian ditentukan dengan :

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

Keterangan :

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

Nilai zona hambat dianalisis secara deskriptif berdasarkan kategori respon hambat antibiotik *Gentamicin* :

- a) Zona hambat dalam batas *resistant* : ≤ 12 mm
- b) Zona Hambat dalam batas *intermediet* : 13 – 14 mm
- c) Zona Hambat dalam batas *sensitif* : ≥ 15 mm

(CLSI, 2021)

b. Dokumentasi Hasil Penelitian

Dokumentasi hasil penelitian merupakan kegiatan pengambilan hasil dalam bentuk foto atau gambar yang berhubungan dengan penelitian yang dilakukan mulai dari pra analitik hingga pasca analitik.

c. Pelaporan Hasil Penelitian

Pelaporan hasil penelitian merupakan kegiatan melaporkan hasil penelitian yang telah dilakukan yaitu hasil pengukuran dan hasil pengamatan selama penelitian berlangsung.

E. Instrumen Penelitian

Instrumen yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu :

1. Observasi
2. Catatan lapangan
3. Alat dokumentasi

F. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer adalah data yang diperoleh secara langsung dari lapangan melalui instrumen pengumpulan data yang digunakan berkaitan dengan bahan uji yang diteliti.

2. Data Sekunder

Data sekunder dalam penelitian ini merupakan data yang diperoleh dari berbagai buku, jurnal dan penelitian yang berhubungan dengan Daun

Bidara (*Ziziphus mauritiana lam*) dan Bakteri *Proteus mirabilis*.

G. Pengolahan Data

Proses pengolahan data yang dilakukan untuk penelitian ini adalah :

1. Pemeriksaan data bertujuan untuk pengecekan data yang telah diperoleh.
2. Pengkodean data bertujuan untuk memberikan kode pada setiap data yang terkumpul disetiap instrument penelitian. Kegiatan ini bertujuan untuk mempermudah dalam menganalisa dan menafsirkan data.
3. Metabulasi yaitu memasukkan data yang sudah dikelompokkan ke dalam tabel agar mudah untuk dipahami.

H. Analisis Data

Analisis data merujuk pada proses menganalisis data dengan Peneliti memperoleh data cara melakukan observasi langsung terhadap objek penelitian. Data tersebut kemudian dianalisis melalui pendekatan eksperimental untuk menilai kemampuan Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana lam*) terhadap *Proteus mirabilis*.

I. Penyajian Data

Penyajian data pada penelitian ini yaitu data yang didapatkan dari hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan penjelasan mengenai hasil yang telah didapatkan.