

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian *eksperimental laboratories* dengan desain yang di gunakan *post-test only control group design*. Desain penelitian ini menggunakan dua kelompok yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Kelompok eksperimen mendapat perlakuan, sedangkan kelompok kontrol tidak mendapat perlakuan. Pada kelompok desain ini, kedua kelompok dibandingkan untuk menilai efektivitas dari perlakuan tersebut.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

##### 1. Tempat Penelitian

Penelitian ini telah di lakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Haluoleo Kendari.

##### 2. Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan 03 Juni – 01 Juli 2024.

#### **C. Bahan Uji**

Bahan uji yang di gunakan dalam penelitian ini adalah daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) yang Jl. Poros Andolo-Baruga, Boro-Boro, Kecamatan. Ranomeeto, Kabupaten Konawe Selatan, Sulawesi Tenggara. Daun sintrong di gunakan sebanyak 1,5kg kemudian diolah menjadi ekstrak daun sintrong dan di buat kan 5 macam konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

#### **D. Prosedur Penelitian**

##### 1. Pra Analitik

- a. Sampel: Daun sintrong segar
- b. Metode: *Well diffusion* (sumuran)

c. Prinsip kerja: Metode sumur dilakukan dengan membuat lubang tegak lurus pada media agar padat yang telah diinokulasi bakteri.

d. Persiapan alat dan bahan

Dalam penelitian ini, beberapa alat digunakan, yaitu:

Kertas label, Mikropipet, Vortex, Tabung durham, Tabung reaksi, Korek api, Spatula besi, Cawan petri, Rak rabung, Inkubator, Blender, *Rotary evaporator*, Jangka sorong, Gelas kimia, Gelas ukur, *Erlenmeyer* 100ml, Ose, Sendok tanduk, Oxford, Neraca analitik, *Laminar air flow*, *Autoclave*, Hot plate, Pinset, Rak mikropipet, Batang pengaduk, Mikroskop, Spoid 5ml dan *Colony Counter*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

Aquades steril, Media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA), Ekstrak daun sintrong, Etanol 96%, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), Biakan bakteri *Klebsiella pneumonia*, Antibiotik *Tetracycline* 500 mg, Spirtus/Bunsen, Kertas saring, NaCl 0,9%, Aluminium foil, Kapas, Tip kuning, Objek glass, dan Larutan pewarnaan gram (gentian violet, lugol, alcohol, dan fuchsin).

e. Sterilisasi Alat dan Bahan

- 1) Alat yang tahan terhadap suhu tinggi sebaiknya diautoklaf pada suhu 121°C dan 2 atmosfer selama 15 menit.
- 2) Alat yang tidak tahan suhu tinggi sebaiknya disterilkan dengan merendamnya dalam etanol 70%.
- 3) Alat-alat logam disterilkan dengan cara dipanaskan langsung dengan lampu Bunsen hingga menyala.
- 4) Alat-alat yang digunakan harus dicuci dan dikeringkan terlebih dahulu.
- 5) Cawan petri dan ujung mikropipet dibungkus kertas.
- 6) Alat dibungkus dengan kapas steril, kemudian dibungkus dengan aluminium foil.
- 7) Ose dan pingset disterilkan dengan cara di flambir/pemijaran.

- 8) Bahan yang digunakan adalah media EMBA, akuades NaCl 0,9 n, dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer*, lalu disumbat dengan kapas, lalu ditutup dengan aluminium foil.
  - 9) Selanjutnya alat dan bahan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.
- f. Pembuatan Media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA)
- 1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
  - 2) Media EMBA yang digunakan dihitung dengan rumus sebagai berikut: EMBA 35,96 gram/liter, atau 250 ml  

$$\text{gram EMBA} = \frac{0,03596 \text{ gram} \times 250 \text{ ml}}{1000} = 8,99 \text{ gram}$$
  - 3) Serbuk media EMBA di timbang sebanyak 8,99 gram
  - 4) Serbuk medium EMBA yang ditimbang dilarutkan dalam labu erlenmeyer dengan 250 ml aquades.
  - 5) Kemudian panaskan di atas hot plate sambil diaduk hingga larut sempurna, jangan sampai mendidih.
  - 6) Selanjutnya tutup labu erlenmeyer dengan kapas dan aluminium foil.
  - 7) Kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.
  - 8) Terakhir masukkan 15 sampai 20 ml media ke dalam cawan petri dan biarkan hingga padat.
- g. Pembuatan Ekstrak Daun Sintrong
- 1) Menimbang sebanyak 1,5 kg pada neraca analitik dan cuci bersih terlebih dahulu.
  - 2) Kemudian keringkan, di remas dan di haluskan sampai menjadi serbuk.
  - 3) Timbang serbuk sebanyak 500gram lalu Serbuk di rendam dalam etanol 96% sebanyak 600 ml selama 3x24 jam, melalui penyaringan filtrat daun sintrong ini di dapatkan.
  - 4) Aduk tiap 6 jam sekali selama 5 menit.

- 5) Setelah 3x24 jam hasil maserasi disaring menggunakan corong untuk memisahkan ampas dan filtrat sehingga menghasilkan ekstrak cair.
  - 6) Lalu ekstrak daun sintrong di uap menggunakan rotary evaporator dengan suhu 60°C selama 1 jam hingga di peroleh ekstrak kental.
  - 7) Kemudian di buat dalam konsentrasi yang berbeda yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.
- h. Pembuatan Konsentrasi Daun Sintrong
- 1) Konsentrasi 20% sebanyak 2gram ekstrak daun sintrong + 8 ml pelarut DMSO.
  - 2) Konsentrasi 40% sebanyak 4gram ekstrak daun sintrong + 6 ml pelarut DMSO.
  - 3) Konsentrasi 60% sebanyak 6gram ekstrak daun sintrong + 4 ml pelarut DMSO.
  - 4) Konsentrasi 80% sebanyak 8gram ekstrak daun sintrong + 2 ml pelarut DMSO.
  - 5) Konsentrasi 100% sebanyak 10gram ekstrak daun sintrong tanpa pelarut DMSO.

Dengan rumus pengenceran:

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

Keterangan:

%: Varian konsentrasi

B: Massa ekstrak daun

V: Volume pelarut

i. Peremajaan Bakteri

Sumber bakteri ini dirancang untuk memperbanyak dan meremajakan bakteri, dengan cara menginokulasi bakteri *Klebsiella pneumonia* strain murni ke dalam media *Eosin Methylene Blue Agar*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator.

j. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Tambahkan 10 ml larutan NaCl 0,9% ke dalam tabung reaksi. Suspensikan bakteri dengan ose steril pada tabung yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9% steril. Buat suspensi bakteri hingga mencapai kekeruhan yang memenuhi standar kekeruhan *Mac Farland*.

k. Pembuatan Antibiotik *Tetracycline* (kontrol positif)

- 1) *Tetracycline* 500 mg dibuat dengan konsentrasi 5%
- 2) Timbang 0,5gram *Tetracycline*.
- 3) Dan larutkan dengan pelarut DMSO sebanyak 5 ml.

2. Analitik

- 1) Siapkan alat dan bahan
- 2) Bakteri diencerkan dengan mencampurkan 1 dosis suspensi *Klebsiella pneumonia* ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl.
- 3) Bakteri dimasukkan ke dalam media EMBA.
- 4) Membuat lubang pada media EMBA yang telah diinokulasi bakteri dengan menggunakan tabung yang diameternya dapat disesuaikan seperti piring.
- 5) Kemudian dimasukkan ekstrak daun sintrong konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, ke dalam setiap lubang pada media EMBA.
- 6) Diinkubasi dalam inkubator bersuhu 37°C selama 24 jam.
- 7) Setelah 24 jam, amati dan ukur diameter zona transparan yang terbentuk disekitar lubang dengan menggunakan jangka sorong.

### 3. Pasca Analitik

Efektif bila di peroleh daerah zona hambat sangat kuat (zona hambat  $\geq$  19 mm) dan tidak efektif bila zona hambat berada pada kategori resisten dan intermediet. Adapun kriteria zona hambat, meliputi:

- a) Resisten (zona hambat  $\leq$  14 mm),
- b) Intermediet (zona hambat 15-18 mm) dan,
- c) Sensitif (zona hambat  $\geq$  19 mm) (CLSI; Yunus *et al.*, 2022).

## E. Instrument Penelitian

Instrument penelitian yang di gunakan pada penelitian ini adalah logbook (buku harian penelitian), pulpen, kamera, dan lembar hasil pengamatan yang di gunakan saat melakukan penelitian.

## F. Jenis Data

### 1. Data Primer

Data primer berasal dari uji daya hambat daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) terhadap bakteri *Klebsiella pneumonia* yang di inkubasi selama 1x24 jam pada setiap konsentrasi ekstrak daun sintrong. Data dicatat dalam bentuk tabel.

### 2. Data Sekunder

Data sekunder berasal dari literatur perpustakaan dan dari pihak terkait dengan subjek penelitian.

## G. Pengolahan Data

Penggolongan data dilakukan dengan cara sebagai berikut

1. *Editing*: Pemeriksaan data bertujuan untuk memperoleh data-data dari pengukuran yang telah di teliti yaitu pemeriksaan kelengkapan dan konsentrasi yang tersedia.
2. *Coding*: Pengkodean data melibatkan pengolahan data yang diperoleh dari hasil observasi dengan menggunakan komputer.
3. *Tabulating*: menyajikan data dalam sesuai dengan tujuan penelitian yang dilakukan, penyajian data dalam bentuk tabel agar mudah untuk di analisis.

## H. Analisa Data

Dalam penelitian ini, analisis data yang digunakan adalah analisis deskriptif berdasarkan kategori efektif dan tidak efektif dari ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) terhadap pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Dilanjutkan dengan analisis data dari penentuan hasil menggunakan rumus zona hambat yaitu:

Rumus Pengukuran Diameter Zona Hambat

$$\frac{(D_v - D_c) + (D_h - D_c)}{2}$$

Keterangan:

$D_v$  = Diameter vertikal

$D_c$  = Diameter cakram/sumur

$D_h$  = Diameter horizontal

## I. Penyajian Data

Data penelitian ini data yang di peroleh disajikan dalam bentuk gambar dan tabel kemudian dideskripsikan.