

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. Desain ini, kedua kelompok dibandingkan untuk menilai efektivitas dari perlakuan tersebut.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini di lakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Halu Oleo.

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 di ambil 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 seri konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

D. Prosedur Pengumpulan Data

Pengumpulan data berdasarkan dari jurnal penelitian sebelumnya dan literatur yang mendukung penelitian ini. Data yang di peroleh dari hasil penelitian akan diolah, di hitung, dan dicatat.

E. 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

1) Alat

Dalam penelitian ini, beberapa alat digunakan, yaitu:

- | | |
|-----------------------------|---------------------------|
| 1) Kertas label | 26) Mikroskop |
| 2) Mikropipet | 27) <i>Colony counter</i> |
| 3) Vortex | 28) Spoid 5ml |
| 4) Tabung reaksi | |
| 5) Korek api | |
| 6) Spatula besi | |
| 7) Cawan petri | |
| 8) Rak rabung | |
| 9) Inkubator | |
| 10) Blender/mortar | |
| 11) Rotary evaporator | |
| 12) Jangka sorong | |
| 13) Gelas kimia | |
| 14) Gelas ukur | |
| 15) <i>Erlenmeyer</i> 100ml | |
| 16) Ose | |
| 17) Sendok tanduk | |
| 18) Oxford | |
| 19) Neraca analitik | |
| 20) <i>Laminar air flow</i> | |
| 21) <i>Autoclave</i> | |
| 22) Hot plate | |
| 23) Pinset | |
| 24) Rak mikropipet | |
| 25) Batang pengaduk | |

2) Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

- 1) Aquades steril
- 2) Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- 3) Media *Nutrient Agar* (NA)
- 4) Ekstrak daun sintrong
- 5) Etanol 96%
- 6) Standart *Mc Farland* 0,5
- 7) *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO)
- 8) Biakan bakteri *Salmonella typhi*
- 9) Antibiotik *Kloramfenikol* 250 mg
- 10) Spirtus/Bunsen
- 11) NaCl 0,9%
- 12) Kapas
- 13) Tip kuning
- 14) Objek glass
- 15) 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 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 alumunium foil.
- 7) Ose dan pingset disterilkan dengan cara di flambir/pemijaran.

- 8) Bahan yang digunakan adalah media MHA, media NA, akuades, NaCl 0,9%, dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer*, lalu disumbat dengan kapas, lalu ditutup dengan kapas.
 - 9) Selanjutnya alat dan bahan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.
- f. Pembuatan Standar Kekeruhan *Mc Farland* 0,5
- 1) Siapkan 0,05 ml larutan BaCl₂ 1%.
 - 2) Campur dengan 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1%.
 - 3) Homogenkan larutan hingga homogen dan tampak keruh.
- g. Pembuatan Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)
- 1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
 - 2) Media MHA yang digunakan dihitung dengan rumus sebagai berikut: MHA 38 gram/liter, atau 300 ml

$$\text{gram MHA} = \frac{38 \text{ gram} \times 300 \text{ ml}}{1000} = 11,4 \text{ gram}$$
 - 3) Serbuk media MHA di timbang sebanyak 11,4 gram
 - 4) Serbuk medium MHA yang ditimbang dilarutkan dalam labu erlenmeyer dengan 300 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 25 ml media ke dalam cawan petri dan biarkan hingga padat.
- h. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)
- 1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
 - 2) Media NA yang digunakan dihitung dengan rumus sebagai berikut: NA 28 gram/liter, atau 200 ml

$$\text{gram NA} = \frac{28 \text{ gram} \times 200 \text{ ml}}{1000} = 5,6 \text{ gram}$$

- 3) Serbuk media NA di timbang sebanyak 5,6 gram
 - 4) Serbuk medium NA yang ditimbang dilarutkan dalam labu erlenmeyer dengan 200 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 20 ml media ke dalam cawan petri dan biarkan hingga padat.
- i. Pembuatan Ekstrak Daun Sintrong
- 1) Menimbang sebanyak 1,5 kg pada neraca analitik dan cuci bersih terlebih dahulu.
 - 2) Kemudian keringkan, lalu di haluskan menggunakan blender sampai menjadi serbuk.
 - 3) Timbang serbuk daun yang sudah di haluskan sebanyak 500 gram
 - 4) Serbuk di rendam dalam etanol 96% sebanyak 3 liter selama 3x24 jam, melalui penyaringan filtrat daun sintrong ini di dapatkan.
 - 5) Aduk tiap 6 jam sekali selama 5 menit.
 - 6) Setelah 3x24 jam hasil maserasi disaring menggunakan corong untuk memisahkan ampas dan filtrat sehingga menghasilkan ekstrak cair.
 - 7) Lalu ekstrak daun sintrong di uap menggunakan rotary evaporator dengan suhu 60°C selama 1 jam hingga di peroleh ekstrak kental.
 - 8) Kemudia ekstrak di buat dalam konsentrasi yang berbeda yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dalam 10ml.
- j. 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

k. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Tambahkan 5 ml larutan NaCl 0,9% ke dalam tabung reaksi. Suspensikan bakteri dengan ose steril pada tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl 0,9% steril. Buat suspensi bakteri hingga mencapai kekeruhan yang memenuhi standar kekeruhan *Mac Farland*.

l. Peremajaan Bakteri

Sumber bakteri ini dari Universitas Halu Oleo Kendari yang dirancang untuk memperbanyak dan meremajakan bakteri, dengan cara menginokulasi bakteri *Salmonella typhi* strain murni ke dalam media *Nutrient Agar*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator.

m. Pewarnaan Gram Bakteri

Setelah di lakukan peremajaan di buat preparat bakteri dengan diameter 2-3cm. kemudian di fiksasi di atas bunsen, lalu di genangi

larutan gentian violet selama 3menit lalu bilas di bawah air mengalir, lalu genangi dengan larutan lugol selama 2menit kemudian genangi dengan alcohol hingga jernih lalu bilas di bawah air mengalir, kemudian genangi dengan larutan fuchsin selama 1menit lalu bilas di bawah air mengalir kemudian keringkan dan amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x.

n. Pembuatan Antibiotik *Kloramfenikol* (kontrol positif)

- 1) *Kloramfenikol* 250 mg dibuat dengan konsentrasi 5%
- 2) Timbang 0,50gram *Kloramfenikol*.
- 3) Dan larutkan dengan pelarut aquades steril sebanyak 10 ml.

2. Analitik

- 1) Siapkan alat dan bahan
- 2) Bakteri diencerkan dengan mencampurkan 1 dosis suspensi *Salmonella typhi* ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl.
- 3) Bakteri dimasukkan ke dalam media MHA sebanyak 5ml.
- 4) Membuat lubang pada media MHA 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 MHA.
- 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

Daya hambat dengan kriteria:

- 1) Resisten (zona hambat ≤ 14 mm),
 - 2) Intermediet (zona hambat 15-19 mm) dan,
 - 3) Sensitif (zona hambat ≥ 20 mm).
- a) Tidak efektif bila zona hambat berada pada kategori resisten dan intermediet.

- b) Efektif bila di peroleh daerah zona hambat sangat kuat (zona hambat \geq 20 mm).

F. 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.

G. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer berasal dari uji daya hambat daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) terhadap bakteri *Salmonella typhi* yang di inkubasi selama 24 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.

H. 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.

I. 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 *Salmonella*

typhi. 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 sumur

D_h = Diameter horizontal (Sumber: Rawung *et al.*, 2019).

J. Penyajian Data

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