

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *experimental laboratory* dengan menggunakan desain *One-Shot Case Study*, yaitu desain penelitian yang dilakukan dengan memberikan perlakuan terhadap variabel *independent* yang diikuti dengan pengamatan terhadap variabel *dependent*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Haluoleo Kendari.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 7 Juni s/d 30 Juni 2024.

C. Bahan Uji

Bahan uji dari penelitian ini adalah daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) yang digunakan adalah daun segar yang dipetik sekitar 3-4 daun dari pucuk sebanyak 500 gram dan waktu pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari. Tempat pengambilan sampel daun bidara diambil di Jl. Padaleu, Kecamatan Kambu, Kota Kendari Sulawesi Tenggara. Pembuatan larutan uji dilakukan dengan proses ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan tingkat konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% yang kemudian diuji daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap bakteri *Klebsiella pneumonia*.

D. Prosedur Kerja Penelitian

1. Pra Analitik

- a. Sampel : Ekstrak Daun Bidara Segar
- b. Metode : Difusi Agar *Kirby-Bauer*
- c. Prinsip : Metode cakram yang berisi agen mikroba diletakkan diatas media agar yang telah ditanami mikroorganisme, kemudian

berdifusinya pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan oleh agen mikroba pada permukaan agar.

d. Persiapan alat dan bahan

1) Alat

- | | |
|-----------------------|----------------------|
| 1. cawan petri | 15. Pinset |
| 2. Timbangan digital | 16. Gunting |
| 3. Gelas kimia | 17. Spidol |
| 4. Gelas ukur | 18. Mikropipet |
| 5. Tabung reaksi | 19. Mistar |
| 6. Erlenmeyer | 20. Lampu spiritus |
| 7. Pipet ukur | 21. Sendok aduk |
| 8. Blender | 22. Batang pengaduk |
| 9. Oven | 23. Silinder cup. |
| 10. Autoclave | 24. Botol kaca gelap |
| 11. Ose | |
| 12. Driglaski spatula | |
| 13. Inkubator | |
| 14. Kain kasa | |

2) Bahan :

1. Ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*)
2. Biakan murni bakteri *Klebsiella pneumonia*
3. Antibiotik *Chloramphenicol*
4. Media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA)
5. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
6. Kertas saring
7. Paper disk
8. Tisu
9. Kertas label
10. Aquadest
11. Kapas

12. Tip kuning
13. NaCl 0,9%,
14. Etanol 96%
15. Standar kekeruhan Mc Farland
16. Aluminium foil

b. Sterilisasi Alat Penelitian

Alat-alat yang terbuat dari gelas atau logam dan tidak memerlukan ketelitian tinggi disterilkan dalam oven pada suhu 180°C selama 1,5 hingga 2 jam. Alat-alat yang terbuat dari kaca atau plastik dan memerlukan ketelitian tinggi disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

e. Persiapan pembuatan ekstrak

1. Proses pengeringan

- 1) Daun Bidara yang segar dicuci bersih dialir mengalir dan di tiriskan
- 2) Setelah kering, daun bidara di simpan pada wadah bersih
- 3) Lalu, dimasukkan kedalam oven untuk dikeringkan dengan suhu 60°C selama 4 Jam.

2. Pembuatan Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana*)

- 1) Daun bidara dibersihkan di bawah air mengalir hingga bersih, dan dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 4 jam.
- 2) Setelah kering, daun bidara diblender hingga halus sampai membentuk serbuk.
- 3) Lalu serbuk daun bidara ditimbang hingga 500 gram.
- 4) Kemudian dimasukkan ke dalam toples maserasi dan di tambahkan 1000 mL larutan etanol 96%.
- 5) Perendaman dilakukan selama 3x24 jam sambil diaduk tiap 6 jam sekali hingga didapatkan maserat dari hasil perendaman.
- 6) Selanjutnya dilakukan penyaringan dan penguapan untuk memisahkan ekstrak dengan larutan perendam selama 1x24 jam hingga didapatkan ekstrak yang kental.

f. Pembuatan Media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA)

- 1) Sebanyak 8,99 gram *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) dilarutkan dalam 250 mL aquadest kedalam erlenmeyer lalu dihomogenkan dengan cara dipanaskan diatas api bunsen.
- 2) Setelah homogen kemudian diukur pH media yaitu harus dengan pH 7, lalu sterilisasi media kedalam autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- 3) Kemudian tuangkan 25 mL *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) yang telah dihomogenkan kedalam masing-masing cawan petri dengan ukuran yang sama dan biarkan hingga padat.
- 4) Lalu masukkan kedalam inkubator dengan suhu 37°C selama \pm 24 jam guna uji kualitas media dengan posisi cawan petri terbalik.

g. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

- 1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- 2) Media MHA yang digunakan ditimbang dengan rumus : MHA 38 gram/liter atau 300 ml
Gram MHA : $\frac{38 \text{ gram} \times 300 \text{ ml}}{1000} = 11,4 \text{ gram.}$
- 3) Serbuk media MHA ditimbang sebanyak 11,4 gram.
- 4) Serbuk Media MHA yang ditimbang dilarutkan dalam labu *erlenmeyer* dengan 300 ml aquades.
- 5) Kemudian panaskan di atas hot plate sambil di aduk hingga larut sempurna dan jangan sampai mendidih.
- 6) Erlenmeyer yang berisi larutan media MHA ditutup menggunakan kapas dan alumunium foil.
- 7) Selanjutnya media disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 8) Media yang telah disterilkan kemudian dituang sebanyak 25 mL kedalam masing-masing cawan petri steril secara aseptik.
- 9) Media didiamkan dalam cawan petri hingga memadat.
- 10) Setelah media memadat, bungkus dengan menggunakan kertas dengan posisi plate terbalik.

h. Pewarnaan Gram

- 1) Fiksasi objek glass dan ose yang akan digunakan, diatas api spiritus
- 2) Teteskan NaCl 0,9% diatas objek glass dan oleskan sedikit bakteri *Klebsiella pneumonia* pada NCl 0,9%, hingga merata dan fiksasi preparat diatas api bunsen 2-3 kali.
- 3) Genangi preparat dengan larutan gentian violet selama 1 menit, lalu bilas dengan air mengalir.
- 4) Genangi preparat dengan larutan lugol selama 1 menit, lalu bilas dengan air mengalir.
- 5) Bilas denga larutan alkohol sampai warna tidak tampak, lalu bilas dengan air mengalir.
- 6) Genangi preparat dengan larutan safranin selama 30 menit, lalu bilas dengan air mengalir.
- 7) Amati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x menggunakan oil imersi.

i. Pembuatan Peremajaan Bakteri

- 1) Siapkan media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) yang sebelumnya telah dibuat.
- 2) Biakan murni bakteri *Klebsiella pneumonia* diambil satu ose.
- 3) kemudian diinokulasikan dengan metode gores (*Streak plate*) pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) secara aseptik.
- 4) Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam sehingga diperoleh bakteri murni.

j. Pembuatan Mc Farland

- 1) Diambil larutan BaCl₂ sebanyak 0,05 mL lalu masukkan kedalam tabung reaksi.
- 2) Tambahkan larutan H₂SO₄ sebanyak 9,95 mL kemudian dihomogenkan.
- 3) Campurkan kedua larutan yang telah dibuat dengan perbandingan 0,05 mL BaCl₂ dan 9,95 mL H₂SO₄, lalu dihomogenkan.

k. Pembuatan suspensi bakteri uji

- 1) Siapkan biakan murni bakteri uji yang telah diremajakan dalam media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA)
- 2) Lalu bakteri uji diambil dengan 1 ose yang telah dipijarkan sebelumnya.
- 3) Selanjutnya disuspensikan kedalam larutan NaCl fisiologis 0,9% sebanyak 10 mL, kemudian dihomogenkan.
- 4) Kemudian samakan kekeruhan suspensi bakteri dengan larutan Mc Farland 0,5.

l. Pembuatan antibiotik *Chloramphenicol* (Kontrol Positif)

- 1) *Chloramphenicol* 250 mg, dibuat dengan konsentrasi 5%
- 2) Timbang sebanyak 0,5 gram *Chloramphenicol*
- 3) Kemudian dilarutkan dengan aquadest steril sebanyak 10 ml sehingga diperoleh antibiotik *Chloramphenicol* konsentrasi 5%.

m. Pembuatan Konsentrasi

Pembuatan konsentrasi ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) dibuat dalam 10 ml untuk masing-masing konsentrasi, dihitung dengan rumus pengenceran sebagai berikut :

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

Keterangan :

% : Variasi konsentrasi (Konsentrasi Akhir)

b : Massa ekstrak

v : Volume pengenceran

Tabel 1. Perbandingan Volume Konsentrasi Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana*) dan aquadest dalam 10 ml.

No.	Konsentrasi Stok	Massa Ekstrak daun bidara	Volume aquadest yang ditambahkan	Konsentrasi Akhir (%)	Volume Pengenceran
1.	100%	2 gram	8 ml	20%	10 ml
2.	100%	4 gram	6 ml	40%	10 ml
3.	100%	6 gram	4 ml	60%	10 ml
4.	100%	8 gram	2 ml	80%	10 ml
5.	100%	10 gram	-	100%	10 ml

2. Analitik

- 1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- 2) Siapkan suspensi bakteri *Klebsiella pneumonia* yang telah dibuat sebelumnya.
- 3) Tambahkan 5 mL suspensi bakteri pada media MHA dan kemudian ratakan menggunakan drigalski.
- 4) Selanjutnya diamkan 5-10 menit agar biakan terdifusi kedalam media.
- 5) Celupkan masing-masing kertas cakram pada ekstrak daun bidara dimasing masing konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%
- 6) Letakkan kertas cakram dengan menggunakan pinset steril ditengah media MHA.
- 7) Lakukan control positif dan negatif :
 - a. Kontrol positif: media Mueller Hinton Agar + *Chromphenicol*
 - b. Kontrol 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 kertas cakram.

3. Pasca Analitik

a. Pencatatan Hasil Penelitian

Pencatatan hasil penelitian adalah kegiatan mencatat data hasil penelitian dalam bentuk tulisan. Data tersebut diperoleh dari hasil pengukuran atau pengamatan. Pencatatan hasil penelitian dilakukan dengan mengikuti rumus yang telah ditetapkan :

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

Keterangan :

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

b. Dokumentasi Hasil penelitian

Kegiatan Pendokumentasian hasil penelitian dilakukan dengan cara mengambil gambar atau foto dari objek yang diteliti, mulai dari tahap pra-analitik hingga pasca analitik.

c. Pelaporan Hasil Penelitian

Pelaporan hasil penelitian merupakan proses merangkum hasil penelitian setelah penelitian dan analisis selesai. Hasil penelitian dirangkum berdasarkan hasil penelitian yang ditetapkan sebagai hasil penelitian.

1) Sensitif : ≥ 18 mm.

2) Intermediet : 13-17 mm.

3) Resisten : ≤ 12 mm.

E. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian adalah alat yang digunakan untuk mengumpulkan data untuk mengetahui uraian tentang jenis dan spesifikasi suatu instrumen ataupun suatu alat penelitian. Alat tersebut dapat berupa buku catatan harian atau logbook dan alat dokumentasi.

F. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer dalam penelitian ini diperoleh dari data yang bersumber dari hasil pengukuran zona hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap bakteri *Klebsiella pneumonia* dalam berbagai konsentrasi yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Halu Oleo.

2. Data Sekunder

Data sekunder yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari hasil penelitian terdahulu, jurnal nasional dan internasional terakreditasi, dan buku-buku terbitan. Data sekunder kemudian digunakan sebagai informasi latar belakang teoritis untuk makalah penelitian.

G. Pengolahan Data

Proses pengolahan data terdiri dari beberapa tahap, yaitu:

- a. Pemberikan kode data (*Coding*), yaitu bertujuan dilakukannya untuk memudahkan analisis data dengan mengubah data menjadi bentuk yang lebih mudah dibaca dan dipahami.
- b. Pemeriksaan data (*Editing*), yaitu bertujuan dilakukan untuk memeriksa kelengkapan dan kebenaran data yang telah dikumpulkan.
- c. Tabulasi data (*Tabulating*) yaitu, data telah diperoleh kemudian diolah dengan cara menyajikan dalam bentuk grafik agar lebih mudah dibaca.

H. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif dengan berdasarkan kategori respon hambat sebagai berikut yaitu, resisten ≤ 12 mm, intermediet 13-17 mm dan sensitif ≥ 18 mm.

I. Penyajian Data

Bentuk hasil penyajian data akan disajikan dalam bentuk tabel disertai ilustrasi atau dijelaskan dalam bentuk narasi.