BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini bersifat *eksperimental laboratories* dengan desain yang digunakan adalah *one-shoot case study* merupakan desain penelitian dengan perlakuan terhadap variable independen subjek-subjek hanya diekspos satu kali terhadap perlakuan atau variabel independen tanpa adanya kontrol tambahan atau kelompok perbandingan. Pengujian menggunakan ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides (Benth.) S. Moore*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

B. Tempat dan Waktu

1. Tempat penelitian
   a. Tempat pengambilan sampel daun sintrong dilakukan Desa lemobajo, Kecamatan Wawolesea, Kabupaten Konawe utara, Sulawesi Tenggara
   b. Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Bina Husada Kendari.
2. Waktu penelitian

   Penelitian ini dilaksanakan pada 17 Februari-30 Juni 2024

C. Bahan Uji

1. Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sintrong yang sudah tua dan masih segar sebanyak 7 kg dengan warna daun hijau tua, permukaan atas licin, ujung daun runcing dan memiliki diameter panjang daun sekitar 8-15 cm dengan lebar daun 3-4 cm yang diperoleh di Desa Lemobajo, Kecamatan Wawolesea, Kabupaten Konawe utara, Sulawesi Tenggara. Daun sintrong diambil sebanyak 7000 gram kemudian dibersihkan dengan cara dicuci menggunakan air mengalir, selanjutnya dikeringkan menggunakan oven selama 3 jam dengan suhu 60^0C, lalu dihaluskan dengan menggunakan blender sampai menjadi serbuk. Daun tumbuhan sintrong (*Crassocephalum crepidioides (Benth.) S. Moore*) yang telah diserbukkan kemudian diayak menggunakan saringan dan ditimbang

2. sebanyak 500 gram kemudian dimasukkan dalam wadah maserasi, ditambahkan etanol 96% sebanyak 1000 ml agar sampel terendam sempurna. Wadah maserasi ditutup dan disimpan selama 48 jam, sambil sesekali diaduk. Selanjutnya disaring dan dipisahkan antara ampas dan filtrate sampel. Ampas yang diperoleh diekstraksi kembali dengan etanol yang baru dengan jumlah yang sama, hal ini dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan. Ekstrak etanol yang diperoleh kemudian dikumpulkan dalam wadah, selanjutnya diuapkan untuk mendapatkan ekstrak dari daun tanaman sintrong dan dilakukan pengenceran dalam 5 varian konsentrasi diantaranya 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% dan diujikan terhadap bakteri *Escherichia coli*.

D. Prosedur Pengumpulan Data

Data yang digunakan dikumpulkan dan berasal dari buku, jurnal-jurnal sebelumnya dan literatur-literatur pendukung penelitian ini.

E. Instrument Penelitian

Pada penelitian ini instrument yang digunakan yaitu lembar observasi pengumpulan data dengan cara mengamati secara langsung objek yang akan diteliti yaitu dalam hal ini diameter zona hambat ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides (Benth.) S. Moore*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada media MHA dengan 5 konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

F. Prosedur Kerja Penelitian

A. Pra Analitik

Sampel : Daun Sintrong (*Crassocephalum crepidioides (Benth.) S. Moore*)

Metode : Difusi cakram (*Kirby bauer*)

Prinsip : Terjadinya difusi antara sampel yang terdapat pada disk dengan media yang terinokulasi

1) Persiapan alat yang akan digunakan
   a. Auto clave
   b. Batang pengaduk
   c. Cawan petri

d. Erlenmeyer
e. Gelas kimia
f. Gelas ukur
g. Inkubator
h. Jangka sorong
i. Kawat ose
j. Lampu spirtus
k. Maserator
l. Pinset
m. Rak tabung
n. Ruler
o. Sendok tanduk
p. Spidol
q. Tabung reaksi
r. Timbangan analitik

2) Persiapan bahan yang akan digunakan :
a. Antibiotik *Chloramphenicol*
b. *Dimetil sulfoksida* (DMSO)
c. Biakan bakteri *Escherichia coli*
d. Daun tanaman sintrong (*Crassocephalum crepidioides (Benth.) S. Moore*)
e. Kertas label
f. Kertas saring
g. Larutan etanol 96%
h. Media *Mueller Hilton Agar* (MHA)
i. Paper disk
j. Tisu

1. Sterilisasi alat penelitian
a. Alat-alat yang terbuat dari logam dan kaca serta memiliki tingkat ketelitian yang lebih tinggi disterilkan didalam oven dengan suhu 100^0C selama 60 menit

b. Alat yang terbuat dari plastik dan kaca yang memiliki tingkat ketelitian yang lebih rendah disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121^0C selama 15 menit.

2. Pembuatan media MHA (*Mueller Hilton Agar*)
   a. Ditimbang media MHA sebanyak 9,5 gram lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer kemudian dilarutkan kedalam 250 ml aquadest, ditutup dengan kapas.
   b. Dipanaskan media dipanaskan diatas hot magnetic stirer, diaduk dengan menggunakan stir bar hingga serbuk larut sempurna.
   c. Disterilkan media didalam autoklaf pada suhu 121℃ selama 15 menit, media MHA siap digunakan.
3. Pembuatan media NA
   a. Ditimbang media NA sebanyak 2,8 gram lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer kemudian dilarutkan kedalam 100 ml aquadest, ditutup dengan kapas.
   b. Dipanaskan media dipanaskan diatas hot magnetic stirer, diaduk dengan menggunakan stir bar hingga serbuk larut sempurna.
   c. Disterilkan media didalam autoklaf pada suhu 121℃ selama 15 menit, media NA siap digunakan.
4. Pewarnaan Gram
   a. Buat preparat melingkar diameter 2-3 cm
   b. Fiksasi diatas api Bunsen hingga kerimg
   c. Genangi menbggunakan gentian violet selama 3 menit, bilas dengan air mengalir
   d. Genangi lugol selama 2 menit
   e. Genangi dengan alcohol 30% hingga warna lugol luntur/ jernih
   f. Bilas menggunakan air mengalir dan genangi dengan fuchsin selama 1 menit, lalu bilas lagi menggunakan air mengalir dan keringkan.
5. Peremajaan bakteri

   Peremajaan bakteri dilakukan dengan keadaan aseptis didepan api Bunsen dengan menggunakan kawat ose. Media NA yang sudah disterilkan dengan

menggunakan autoclave dituang kedalam tabung reaksi sebanyak ±5 mL setealh itu dimiringkan sampai memadat, selanjutnya bakteri *Escherichia coli* dari biakan murni diambil 1 ose dan diinokulasikan dengan menggunakan metode gores pada media NA miring dan diinkubasi pada suhu 37º selama 1x24 jam sehingga diperoleh bakteri murni.

6. Pembuatan suspensi bakteri uji
   a. Biakan bakteri diambil dengan menggunakan kawat ose
   b. Kemudian disuspensikan dalam 5 ml Nacl 0,9 dalam tabung reaksi steril lalu dan dihomogenkan sesuai standar *Mc.Farland* 0,5 yang ditandai dengan terbentuknya kekeruhan setelah disuspensi.
7. Pembuatan kontrol positif
   a. *Chlormpenichol* sebanyak 25 mg Dibuat konsentrasi 5% dengan menimbang Chlormpenichol sebanyak 0,05 gram
   b. Lalu dilarutkan ke dalam 5 ml DMSO sehingga diperoleh konsentrasi 5%.
8. Pembuatan ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides (Benth.) S.Moore*)
   a. Disiapkan alat dan bahan
   b. Daun sintrong ditimbang sebanyak 7 kg, lalu dioven hingga kering selama 24 jam dengan suhu 60^0C, kemudian dihaluskan menggunakan blender
   c. Kemudian serbuk kering ditimbang sebanykan 500 gram kemudian dimasukkan ke dalam maserator dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 1000 ml agar sampel terendam sempurna kemudian diaduk sehingga homogen
   d. Dilakukan pengadukan sesekali selama 48 jam.
   e. Kemudian dilakukan penyarigan dengan menggunakan kertas saring untuk memsiahkan filtrat dan ampas.
   f. Hasil saringan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator, sehingga di dapatkan ekstrak kental

g. Selanjutnya ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides (Benth.) S.Moore*) dibuat dalam 5 varian konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% Volume ckstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides (Benth.) S.Moore*) yang sambil dihitung dengan rumus pengenceran sebagai berikut :

$$\% = \frac{b}{v} \text{ x } 100\%$$

Keterangan :

% = Variasi Konsentrasi (Konsentrasi Akhir)

b = Massa Ekstrak

V = Volume Pengenceran

Tabel 2. Hasil Pengenceran Konsentrasi Ekstrak Daun Sintrong

No.	Konsentrasi Stok (M1)	Massa Ekstrak Daun Sintrong (b)	Volume DMSO Yang Ditambahkan	Konsentrasi Akhir (M2)	Volume Pengenceran (V2)
1	100%	2 gr	8 ml	20%	10 ml
2	100%	4 gr	6 ml	40%	10 ml
3	100%	6 gr	4ml	60%	10 ml
4	100%	8 gr	2 ml	80%	10 ml
5	100%	10 gr	-	100%	10 ml

8. Pembuatan Konsentrasi Daun Sintrong

a. Membuat konsentrasi 20% sebanyak 2 gr ekstrak daun sintrong ditimbang dan ditambahkan 8 ml pelarut DMSO
b. Membuat konsentrasi 40% sebanyak 4 gr ekstrak daun sintrong ditimbang dan ditambahkan 6 ml pelarut DMSO
c. Membuat konsentrasi 60% sebanyak 6 gr ekstrak daun sintrong ditimbang dan ditambahkan 4 ml pelarut DMSO
d. Membuat konsentrasi 80% sebanyak 8 gr ekstrak daun sintrong ditimbang dan ditambahkan 2 ml pelarut DMSO

e. Membuat konsentrasi 100% sebanyak 10 gr ekstrak daun sintrong ditimbang dan tidak ditambahkan pelarut DMSO.

B. Analitik

1. Uji daya hambat Ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides (Benth.) S.Moore*) terhadap bakteri uji

   Tujuan : yaitu untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides (Benth.) S.Moore*) yang akan diujikan terhadap bakteri *Escherichia coli*

   Metode: metode yang digunakan yaitu Difusi Agar (*Disk Diffusion Method*) dari *Kirby-disk Bauer*.

   Langkah-langkah untuk menguji kemampuan penghambatan dari ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides (Benth.) S.Moore*) adalah sebagai berikut.

   a. Masing-masing daerah cawan petri diberi label
   b. Bakteri *Escherichia coli* diencerkan dengan mencampur 1 ose suspensi bakteri ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9%, yang telah di standarisasi sesuai konsentrasi 0.5 McFarland.
   c. Selanjutnya, bakteri yang telah diencerkan dioleskan ke dalam media MHA.
   d. Masukkan kertas cakram kedalam setiap konsentrasi ekstrak hingga seluruh permukaan kertas cakram terkena daun sintrong yang telah diekstrak
   e. Selanjutnya templkan kertas cakram dari setiap masing-masing ekstrak kedalam media MHA yang telah diinokulasi bakteri
   f. Cawan petri kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37℃ selama 48 jam.
   g. Setelah itu, dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona bening (*clear zone*) yang terbentuk di sekitar lubang menggunakan jangka sorong.

C. Pasca analitik

1. Pencatatan Hasil Penelitian

Pencatatan dari hasil penelitian merupakan hasil dari peneitian yang sudah dilakukan pencatatan suatu kegiatan baik dalam bentuk tulisan baik itu diketik maupun ditulis atau dalam bentuk grafik atau gambar dari hasil pengukuran atau pengamatan yang sudah dilakukan. Hasil pencatatan penelitian akan ditentukan dengan rumus :

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

Keterangan:

DV = Diameter Vertikal

DH = Diameter Horizontal

DC = Diameter Cakram

2. Dokumentasi Hasil Penelitian

Pengambilan hasil dalam bentuk gambar ataupun foto dari hasil pengamatan, pengukuran pengambilan sampel dan lain-lainnya yang berhubungan langsung dengan penelitian dimulai dari pra analitik, analitik hingga pasca analitik.

3. Pelaporan Hasil Penelitian Hasil penelitian sesudah dilakukan pengukuran serta pengamatan, hasil dari penelitian dilaporkan berdasarkan hasil pengukuran yang akan dijadikan sebagai hasil penelitian

a. Efektif (+) : jika terbentuk zona hambat disekitar *paper disk*

b. Tidak efektif (-) : jika tidak terbentuk zona hambat disekitar *paper disk*.

Nilai diameter dari zona hambat yang dianalisa dan deskriptif dapat dikelompokkan menjadi:

a) Resisten : 17 mm

b) Intermediate :18-20 mm

c) Sensitif : 21 mm

G. Jenis Data

1. Data Primer

   Data primer dari hasil penelitian adalah data yang diambil langsung dari hasil pengujian uji daya hambat ekstrak daun sintrong terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* di Laboratorium Mikrobiologi Poltekkes kendari

2. Data Sekunder

   Data sekunder yang dikumpulkan dari hasil penelitian sebelumnya, buku-buku yang dipublikasi dan jurnal-jurnal sebelumnya.

H. Pengolahan Data

Data yang telah didapatkan dari hasil penelitian yang dikerjakan melalui beberapa proses dan tahap sebagai berikut :

1. Pemeriksaan data (*editing*) bertujuan untuk meneliti data yang telah didapatkan dari pengukuran dengan cara memeriksa kelengkapan dan konsistensi data yang sudah ada.
2. Pengkodean data (*coding*) yaitu bertujuan untuk memudahkan dalam menganalisa data dengan cara memberikan kode pada data.
3. Memasukkan data (*entry*) yang sudah diperoleh untuk diolah menggunakan komputerisasi.
4. Mentabulasi (*tabulating*) tabulasi yaitu lanjutan dari langkah coding untuk mengelompokkan data ke dalam suatu data tertentu dan menurut sifat-sifat yang dimiliki yang sesuai dengan tujuan penelitian.

I. Analisis Data

Analisis dari data penentuan hasil penelitian dengan menggunakan rumus dari zona hambat yaitu:

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

Keterangan

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

J. Penyajian Data

Data yang sudah dianalisis akan disajikan dalam bentuk tabel kemudian disampaikan dalam bentuk narasi.