

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *Eksperimental laboratory*, dengan menggunakan *post test only control group design*, yaitu desain penelitian yang mencakup dua kelompok, yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Perlakuan diberikan kepada kelompok eksperimen, tetapi tidak pada kelompok kontrol. Dua perbandingan digunakan dalam desain ini untuk mengevaluasi efektivitas pengobatan.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Bina Husada Kendari.

2. Waktu Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2024.

C. Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah Daun Sintrong (*Crassocephalum crepidiodes*). Dalam proses ini, digunakan bubuk daun sintrong sebanyak 500 gram, yang terdiri dari daun hijau muda dan hijau tua yang diambil dari atas pucuk kebawah yang diperoleh di Jalan Poros Baubau Pasarwajo Km.14 Kelurahan Kaisabu Baru, Kecamatan Sorawolio, Kota Baubau, Sulawesi Tenggara. Daun sintrong dibuat ekstraknya dan dibuat konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100% kemudian dibuat hasil masing-masing ekstraknya. Metode sumuran digunakan untuk menguji pengaruh penghambatan ekstrak daun Sintrong (*Crassocephalum crepidiodes*) terhadap pertumbuhan bakteri *Proteus sp.*

D. Prosedur Pengumpulan Data

Data dikumpulkan pada saat penyusunan proposal awal, data dikumpulkan dari penelitian-penelitian sebelumnya, dan pengumpulan literatur untuk mendukung penelitian ini.

E. Prosedur Kerja

1. Pra Analitik

- a. Persiapan sampel : Daun Sintrong segar
- b. Metode : *Well diffusion* (sumuran)
- c. Prinsip : Metode sumuran dilakukan dengan membuat lubang vertikal dibuat pada agar padat dan kemudian bakteri dapat dikulturkan di atasnya untuk pengujian.
- d. Persiapan Alat dan Bahan

1) Alat :

Cawan petri, timbangan digital, gelas kimia, gelas ukur, tabung reaksi, erlenmeyer 250 ml, pipet ukur 10 ml, mortal dan alu, oven, *autoclave*, ose, drigalski spatula, inkubator, kain kasa, pinset, gunting, spidol, mikropipet, tip biru, jangka sorong, lampu spirtus, sendok taduk, batang pengaduk, silinder cup.

2) Bahan:

Daun sintrong (*Crassocephalum crepidiodes*), biakan murni *Proteus sp*, kapas, aquadest, kertas label, antibiotik *Chloramphenicol*, media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan NaCl 0,9%.

e. Sterilisasi Alat Penelitian

Sebelum digunakan sebaiknya gelas dicuci dahulu, kemudian dilap hingga kering, kemudian dibungkus dengan kertas dan mengalami proses pemanasan selama 15 menit dalam autoklaf pada suhu 121°C, diikuti dengan pendinginan dan penyimpanan di tempat yang telah disiapkan.

f. Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

- 1) Media NA ditimbang sebanyak 2,8 gram.
- 2) Serbuk medium NA yang telah ditimbang dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer, ditambahkan 140 mL dan kemudian diaduk.
- 3) Homogenkan larutan menggunakan *hot plate*, tetapi jangan sampai mendidih.
- 4) Media disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.
- 5) Tuangkan media steril secara aseptik ke dalam setiap cawan petri yang steril (di belakang lampu bunsen atau spirtus).
- 6) Media tersebut kemudian ditempatkan dalam cawan Petri dan dipadatkan.
- 7) Uji kualitas media dengan menempatkan media beku dalam inkubator (± 37 °C) selama ± 24 jam. Letakkan cawan petri dengan posisi terbalik.

g. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)

- 1) Media MHA ditimbang sebanyak 9,5 gram.
- 2) Serbuk media MHA yang telah ditimbang dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer ditambahkan 250 mL dan kemudian diaduk.
- 3) Larutan dihomogenisasi dalam lampu spirtus hingga larut.
- 4) Media disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.
- 5) Tuangkan media steril secara aseptik ke dalam setiap cawan petri yang steril (di belakang lampu bunsen atau spirtus).
- 6) Media tersebut kemudian ditempatkan dalam cawan Petri dan dipadatkan.
- 7) Setelah media sudah mengeras, bungkus dengan kertas dengan posisi *plate* terbalik.

h. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri harus dilakukan satu hari sebelum penelitian dan dilakukan dalam kondisi aseptik yaitu dekat pembakar bunsen dengan selang taman. Media NA yang telah diautoklaf dituangkan ke dalam tabung reaksi ± 5 ml kemudian dimiringkan hingga memadat. Kemudian bakteri *Proteus sp* hasil kultur murni dikumpulkan dalam 1 siklus dan diinokulasi menggunakan metode *strip plate* pada media NA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam hingga diperoleh bakteri.

i. Pembuatan Suspensi Bakteri

Kultur bakteri dikumpulkan dengan tabung steril kemudian disuspensikan dalam 9 ml NaCl 0,9% dalam tabung reaksi steril dan dihomogenisasi.

j. Pembuatan Ekstrak Daun Sintrong (*Crassocephalum crepidiodes*)

- 1) 500 gram daun sintong yang sudah dihaluskan dimasukkan ke dalam panci maserasi dan ditambahkan 50 liter etanol 96% (larutan disaring terlebih dahulu)
- 2) Rendam selama 3 x 24 jam dengan gerakan setiap 6 jam hingga diperoleh massa hasil perendaman.
- 3) Kemudian disaring dan diuapkan menggunakan rotary evaporator untuk memisahkan ekstrak dari larutan rendaman selama 1 jam pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental.
- 4) Kemudian dilakukan dengan konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100%.

k. Pembuatan Varian Konsentrasi

Ekstrak daun sintrong terdiri dari 4 konsentrasi yaitu 40%, 60%, 80% dan 100%. Volume ekstrak daun sintrong yang dikumpulkan dihitung dengan menggunakan rumus pengenceran berikut :

$$V1. M1 = V2. M2$$

Keterangan:

V1 = Volume yang dicari

V2 = Volume yang diketahui

M1 = Konsentrasi dari larutan stok

M2 = Konsentrasi dari larutan perlakuan

Tabel 1. Volume Pengenceran Konsentrasi Daun Sintrong
(*Crassocephalum crepidioides*)

No	(M1)	(V1)	Vol. Aquadest	(M2)	(V2)
1	100 %	4 ml	6 ml	40 %	10 ml
2	100 %	6 ml	4 ml	60 %	10 ml
3	100 %	8 ml	2 ml	80 %	10 ml
4	100 %	10 ml	-	100 %	10 ml

l. Pembuatan Antibiotik *Chloramphenicol* (Kontrol Positif)

Chloramphenicol 250 mg diperoleh pada konsentrasi 5% dengan cara menimbang 0,025 gram *chloramphenicol* kemudian dilarutkan dalam 5 ml akuades steril hingga diperoleh konsentrasi 5%.

2. Analitik

- a. Suspensi bakteri *Proteus* sp yang telah disiapkan sebanyak 0,1 ml kemudian ditebarkan pada permukaan media MHA dengan menggunakan spatula drigalski.
- b. Media yang telah diinokulasi bakteri didiamkan selama 5 sampai 15 menit agar suspensi bakteri dapat menembus media.
- c. Setelah suspensi bakteri terserap, dibuat lubang tegak lurus pada media kemudian diisi dengan ekstrak daun kuat konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100% pada lubang yang dibuat.
- d. Bungkus cawan Petri dengan kertas berlabel lalu inkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam.
- e. Periksa apakah terbentuk zona bening disekitar sumur atau belum, lakukan pengukuran dengan jangka sorong.

3. Pasca Analitik

a. Pencatatan Hasil Penelitian

Semua aktivitas dan temuan dari penelitian harus didokumentasikan secara lengkap, baik itu dalam bentuk tulisan tangan, printout, atau bahkan dalam format tabel dan gambar yang dihasilkan dari pengukuran dan observasi.

Berikut adalah rumus pencatatan hasil penelitian :

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

Keterangan:

DV: Diameter Vertikal

DH: Diameter Horizontal

DC: Diameter Sumuran

b. Pengolahan Data Hasil Penelitian

Efektivitas hasil penelitian dapat dinilai melalui kategori zona hambat yang terbentuk, yang meliputi :

- 1) *Resesiten* : Ditandai dengan ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidiodes*) yang daya hambatnya ≤ 14 mm.
- 2) *Intermediate* : Ditandai dengan ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidiodes*) yang daya hambatnya 15-19 mm.
- 3) *Sensitifitas* : Ditandai dengan ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidiodes*) yang daya hambatnya ≥ 20 mm.

c. Dokumentasi Hasil Penelitian

Dokumentasi hasil penelitian melibatkan pengambilan gambar atau foto dari proses pengamatan dan pengukuran objek penelitian, mencakup seluruh tahapan dari pra analitik hingga pasca analitik.

d. Pelaporan Hasil Penelitian

Pelaporan hasil penelitian dilakukan setelah peneliti menyelesaikan proses pengukuran dan pengamatan terhadap objek yang diteliti, yang kemudian menjadi laporan akhir dari penelitian tersebut.

F. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari pengujian langsung mengenai efektivitas ekstrak daun sintong (*Crassocephalum crepidiodes*) terhadap pertumbuhan bakteri *Proteus sp.* Data ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi di Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Bina Husada Kendari.

2. Data Sekunder

Data sekunder untuk penelitian ini diambil dari penelitian sebelumnya dan buku-buku yang relevan, yang kemudian digunakan sebagai dasar teori dalam penulisan proposal penelitian ini.

G. Pengolahan Data

Proses pengolahan data dari hasil penelitian ini melibatkan beberapa langkah sebagai berikut:

1. Pemeriksaan data (*editing*) : Langkah ini bertujuan untuk memverifikasi data yang telah dikumpulkan dengan memeriksa kelengkapan dan konsistensi informasi yang ada.
2. Pengkodean data (*coding*) : Tujuannya adalah untuk mempermudah analisis data dengan memberikan kode atau label pada setiap data.
3. Mentabulasi (*tabulating*) : Proses ini bertujuan untuk mengorganisir data ke dalam kategori tertentu berdasarkan karakteristik yang dimilikinya sesuai dengan tujuan penelitian.

H. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif untuk menilai efektivitas ekstrak daun Sintrong (*Crassocephalum crepidiodes*) terhadap pertumbuhan bakteri *Proteus* sp apakah efektif atau tidak. Setelah itu, data yang diperoleh dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan rumus zona hambat untuk menentukan hasil penelitian.

Rumus untuk menghitung zona hambat adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

Zona hambat yang terbentuk dikategorikan jadi 3 bagian, yaitu :

- 1) Sensitifitas : zona hambat ≥ 20 mm
- 2) Intermediet : zona hambat 15-19 mm
- 3) Resisten : zona hambat ≤ 14 mm

I. Penyajian Data

Data penelitian ini akan ditabulasi dan ditampilkan, kemudian akan dibuat kesimpulan mengenai gambaran hasil penelitian.