

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *Eksperimental Laboratories*, dengan menggunakan desain *One-Shot Case Study* yaitu desain penelitian dengan perlakuan terhadap variable bebas (*independent*) yang diikuti dengan pengamatan atau pengukuran terhadap variable terikat (*dependent*).

B. Waktu Dan Tempat Penelitian

1. Waktu penelitian

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

2. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Halu Oleo Kendari.

C. Bahan Uji

1. Bakteri *Streptococcus mutans*

Bakteri *Streptococcus mutans* dalam penelitian ini merupakan biakan murni *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Laboratorium Farmasi Universitas Halu Oleo Kendari.

2. Daun bidara arab (*Ziziphus mauritiana*)

Daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) yang akan digunakan pada pengujian dipetik pada pagi hari dan dipilih hanya daun segar yang telah berwarna hijau tua, diperoleh dari Kecamatan Ranomeeto Kabupaten Konawe Selatan.

D. Prosedur Kerja

Pengujian daya hambat dalam penelitian ini dilakukan dengan 3 tahapan, yaitu:

1. Pra Analitik

a. Alat dan bahan yang digunakan

1) Alat

Cawan petri, cawan porselin, timbangan digital, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, erlenmeyer, *rotary evaporator*, pinset, oven, mikropipet, autoklaf, blender, mikropipet, Lampu spiritus, batang

pengaduk, jangka sorong, drigalski, inkubator, ose, *hot plate*, mortar dan alu.

2) Bahan

Daun bidara segar, biakan murni *Streptococcus mutans*, larutan etanol 96%, aquadest, antibiotik tetrasiklin 500 mg, Nacl fisiologis 0.9%, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media *Nutrient Agar* (NA), kertas cakram, alumunium foil, kapas dan standar kekeruhan Mc farland 0,5.

b. Sterilisasi alat penelitian

Alat yang terbuat dari bahan gelas atau kaca sebelum digunakan harus dicuci terlebih dahulu, selanjutnya ditiriskan hingga kering kemudian dibungkus memakai kertas lalu dimasukkan kedalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit, setelah selesai didinginkan dan disimpan ditempat yang telah disiapkan.

c. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

- 1) *Nutrient Agar* ditimbang sebanyak 5,6 gram kedalam erlenmeyer dan ditambahkan aquades sebanyak 200 mL lalu larutkan dengan dipanaskan diatas *hot plate*.
- 2) *Nutrient Agar* yang telah larut diukur pH media yaitu harus dengan pH 7, media disterilisasi kedalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- 3) *Nutrient Agar* (NA) yang telah disterilkan dituang sebanyak 25 mL kedalam cawan petri dan dibiarkan hingga padat.
- 4) *Nutrient Agar* (NA) dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu 37°C selama \pm 24 jam guna uji kualitas media dengan posisi cawan petri terbalik.

d. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

- 1) *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 11,4 gram kedalam erlenmeyer dan ditambahkan aquades sebanyak 300 mL lalu larutkan dengan dipanaskan diatas *hot plate*.

- 2) *Mueller Hinton Agar* (MHA) disterilisasi kedalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- 3) *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah disterilkan kemudian dituang sebanyak 25 mL kedalam masing-masing cawan petri steril secara aseptik dan didiamkan hingga memadat.
- 4) *Mueller Hinton Agar* (MHA) dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu 37°C selama ± 24 jam guna uji kualitas media dengan posisi cawan petri terbalik.

e. Peremajaan Bakteri

- 1) Biakan murni bakteri *Streptococcus mutans* diambil satu ose kemudian diinokulasikan dengan metode gores (*Streak plate*) pada media *Nutrient Agar* (NA) yang telah dibuat sebelumnya.
- 2) Bakteri yang telah diinokulasi pada media NA diinkubasi pada suhu 37°C selama 1×24 jam sehingga diperoleh bakteri murni.

f. Pembuatan media Mc Farland

Pembuatan larutan Mc Farland yang disiapkan yaitu 0,5 dengan prosedur sebagai berikut :

- 1) Barium klorida (BaCl_2) sebanyak 0,1 gram dihomogenkan ke dalam 100 mL aquadest.
- 2) Asam sulfat (H_2SO_4) sebanyak 1,1 mL dihomogenkan ke dalam 50 mL aquadest.
- 3) Larutan Barium klorida (BaCl_2) dan Asam sulfat (H_2SO_4) dicampurkan dengan perbandingan 0,05 mL BaCl_2 dan 9,95 mL H_2SO_4 lalu dihomogenkan.

g. Pembuatan suspensi bakteri uji

- 1) Siapkan biakan murni bakteri uji yang telah diremajakan dalam media *Nutrient Agar* (NA) lalu diambil dengan menggunakan ose yang telah dipijarkan sebelumnya.
- 2) Suspensikan bakteri kedalam larutan NaCl fisiologis 0,9% sebanyak 10 mL, kemudian dihomogenkan dan bandingkan kekeruhan suspensi bakteri dengan larutan Mc Farland 0,5.

h. Pembuatan kontrol positif

- 1) Tetrasiklin 500 mg dihaluskan dengan menggunakan mortar dan alu.
- 2) Timbang sebanyak 0,05 gram tetrasiklin dan tambahkan 10 mL aquadest lalu dihomogenkan untuk membuat konsentrasi 5%.

i. Pembuatan ekstrak 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 kemudian dimasukkan ke dalam toples maserasi dan ditambahkan 1000 mL larutan etanol 96%.
- 4) Dilakukan perendaman selama 3x24 jam sambil diaduk tiap 6 jam sekali hingga didapatkan maserat dari hasil perendaman.
- 5) Maserat kemudian disaring dan dilakukan pengupuan dengan *rotary evaporator* untuk memisahkan ekstrak dengan larutan perendam selama 1x24 jam hingga didapatkan ekstrak yang kental.

j. Pembuatan varian konsentrasi

Ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) yang telah diperoleh, dibuat dalam 5 macam konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%, masing-masing konsentrasi di tambahkan aquadest hingga volume 10 mL. pembuatan konsentrasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Nor, 2018) :

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

Keterangan :

% : Variasi konsentrasi (Konsentrasi Akhir)

b : Massa ekstrak

v : Volume pengenceran

Berdasarkan rumus pengenceran yang dihitung, maka pembuatan dari 5 konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) yaitu:

- 1) Konsentrasi 20% dibuat dengan 2 gram ekstrak daun bidara ditambahkan 8 mL aquadest lalu dihomogenisasi.
- 2) Konsentrasi 40% dibuat dengan 4 gram ekstrak daun bidara ditambahkan 6 mL aquadest lalu dihomogenisasi.
- 3) Konsentrasi 60% dibuat dengan 6 gram ekstrak daun bidara ditambahkan 4 mL aquadest lalu dihomogenisasi.
- 4) Konsentrasi 80% dibuat dengan 8 gram ekstrak daun bidara ditambahkan 2 mL aquadest lalu dihomogenisasi.
- 5) Konsentrasi 100% dibuat dengan 10 gram ekstrak daun bidara tanpa penambahan aquadest.

Tabel 2. Volume pengenceran konsentrasi ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*)

No	Konsentrasi Stok	Massa Ekstrak	Volume aquadest	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%	

2. Analitik

- a. Uji daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap Pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

Tujuan : Untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

Metode : Difusi cakram (*Kirby Bauer*).

Prinsip : Cakram yang berisi agen antimikroba diletakkan diatas media agar yang telah ditanamai mikroorganisme, kemudian berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba.

b. Prosedur Kerja

- 1) Tambahkan 5 mL suspensi bakteri pada media MHA lalu ratakan menggunakan drigalski dan diamkan 5-10 menit agar biakan terdifusi kedalam media.
- 2) Kertas cakram dicelupkan pada ekstrak daun bidara dimasing-masing varian konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%
- 3) Letakkan kertas cakram dengan menggunakan pinset ditengah media MHA.
- 4) Lakukan kontrol positif dan negatif
 - a) Kontrol positif: media *Mueller Hinton Agar* + Tetrasiklin
 - b) Kontrol negatif: media *Mueller Hinton Agar* + Aquadest
- 5) Cawan petri dibungkus menggunakan kertas dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam.
- 6) Amati ada tidaknya zona bening yang terjadi pada daerah sekitar kertas cakram. Celupkan masing-masing kertas cakram pada ekstrak daun bidara dimasing-masing konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%

3. Pasca Analitik

a. Pencatatan hasil penelitian

Pencatatan hasil penelitian merupakan hasil penelitian yang dilakukan dalam bentuk tulisan baik ditulis tangan, diketik atau berbentuk grafik/gambar dari hasil pengukuran dan pengamatan yang telah dilakukan. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan menggunakan rumus (Toy, 2015) :

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

Keterangan :

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

b. Pengolahan data hasil

Hasil penelitian dikatakan efektif jika terbentuk zona bening paling sensitif (terbentuk zona bening paling luas), sehingga dilakukan pengukuran dengan berdasarkan tiga kategori yaitu :

- 1) *Resisten* : apabila terbentuk zona hambat ≤ 18 mm
- 2) *Intermediate* : apabila terbentuk zona hambat 19 - 22 mm
- 3) *Sensitif* : apabila terbentuk zona hambat ≥ 23 mm (CLSI, 2021).
- 4) Sedangkan dikatakan tidak efektif apabila hasil penelitian tidak terbentuk zona bening atau zona bening yang terbentuk kecil.

c. Hasil penelitian

Kegiatan pengambilan hasil dalam penelitian ini mencakup dokumentasi dalam bentuk foto atau gambar yang diambil selama penelitian. Ini termasuk hasil pengukuran, pengamatan, pengambilan sampel, serta kegiatan lain yang terkait dengan penelitian, baik pada tahap pra-analitik, analitik, maupun pasca-analitik.

d. Pelaporan hasil penelitian

Pelaporan hasil penelitian dilakukan setelah tahap pengukuran dan pengamatan selesai. Hasil penelitian dilaporkan berdasarkan data yang diperoleh dari pengukuran diameter zona hambat dan observasi lainnya. Laporan mencakup tabulasi data, interpretasi hasil, serta kesimpulan mengenai efektivitas ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

E. Prosedur Pengumpulan Data

Data dikumpulkan sejak tahap penyusunan proposal awal, yang meliputi kajian terhadap penelitian sebelumnya dan literatur pendukung yang relevan dengan topik penelitian. Selanjutnya, dilakukan pengamatan terhadap efektivitas ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) pada berbagai konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, untuk menilai dampaknya terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

F. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer dalam penelitian ini diperoleh langsung dari hasil uji daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Pengujian ini dilakukan di Laboratorium Jurusan Farmasi Universitas Halu Oleo Kendari, yang menyediakan data empiris untuk analisis efektivitas ekstrak daun bidara.

2. Data Sekunder

Data sekunder dalam penelitian ini diperoleh dari berbagai sumber, termasuk buku, jurnal, skripsi, dan karya tulis ilmiah yang relevan dan terkait dengan topik penelitian. Sumber-sumber ini digunakan sebagai landasan teoritis untuk penulisan proposal penelitian, guna memberikan dasar yang kuat dan mendukung analisis serta interpretasi hasil penelitian.

G. Pengolahan Data

Pengolahan data yang telah diperoleh dari hasil penelitian dikerjakan melalui beberapa tahap yaitu sebagai berikut :

- a. *Editing* (Pemeriksaan data), yaitu tahap penelitian daya hambat ekstrak daun bidara terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh, meliputi kelengkapan dan pengisian lembar hasil.
- b. *Coding* (pengumpulan data), yaitu tahap pemberian identitas pada data agar mempermudah untuk dianalisis.
- c. *Tabulating* (Tabulasi data), yaitu tahap melakukan penyajian data melalui tabel agar mempermudah untuk dianalisis.

H. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian menurut uraian terkait dengan spesifikasi dari instrumen/alat/media dalam penelitian yang hendak digunakan saat pengumpulan data, yaitu:

1. Logbook (laporan harian penelitian)
2. Lembar hasil pengamatan

I. Analisis Data

Pada penelitian ini, data dianalisis menggunakan data kuantitatif dengan

skala pengukuran nominal. Teknik analisis yang digunakan adalah metode analisis deskriptif untuk menentukan efektivitas ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*, berdasarkan kategori efektif atau tidak efektif. Analisis data dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk dan kemudian menghitung hasilnya menggunakan rumus zona hambat. Kategori efektivitas ditentukan berdasarkan ukuran zona hambat yang diperoleh dari hasil pengukuran tersebut.

J. Penyajian Data

Penyajian data hasil penelitian ini akan dilakukan dalam bentuk gambar dan tabel. Gambar akan digunakan untuk menunjukkan visualisasi hasil penelitian, seperti zona hambat pada media agar lebih mudah dipahami. Tabel akan digunakan untuk merangkum data kuantitatif, termasuk diameter zona hambat pada kelima konsentrasi ekstrak daun bidara. Setelah penyajian data, hasil akan dijelaskan dalam bentuk narasi untuk memberikan interpretasi yang mendalam mengenai efektivitas ekstrak daun bidara terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

K. Keterbatasan Penelitian

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, terdapat beberapa keterbatasan yang mempengaruhi hasil penelitian ini. Salah satu keterbatasan utama adalah ketidakstabilan suhu selama proses inkubasi. Hal ini disebabkan oleh seringnya pembukaan inkubator dan penumpukan plate media yang melebihi dua plate pada saat inkubasi. Ketidakstabilan suhu ini dapat mempengaruhi efisiensi difusi ekstrak daun bidara ke dalam media, sehingga hasil yang diperoleh mungkin tidak sepenuhnya mencerminkan potensi antibakteri sebenarnya dari ekstrak daun bidara.