

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *Experimental Laboratories*, dengan menggunakan desain *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. Kemudian kedua kelompok dibandingkan untuk menilai hasil dari perlakuan tersebut.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Bina Husada Kendari Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

2. Waktu Penelitian

Penelitian telah dilakukan pada tanggal 19 s/d 24 juni 2024.

C. Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) yang sudah dikeringkan sebanyak 500 gram. Yang diambil di Jl. Poros Palangga Selatan-Andoolo, Desa Watudemba, Kec. Palangga, Kab. Konawe Selatan, Sulawesi Tenggara. Pembuatan larutan uji dilakukan dengan proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dibuat menjadi beberapa seri konsentrasi, yaitu 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% yang kemudian diuji daya hambat ekstrak daun sintrong terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

D. Prosedur Pengumpulan Data

Data dikumpulkan berdasarkan jurnal penelitian sebelumnya dan literatur yang mendukung penelitian ini. Data yang diperoleh dari hasil penelitian akan diolah, dicatat, dan dihitung.

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:

Pada penelitian ini alat yang digunakan yaitu:

Inkubator, rak tabung, *autoclave*, gelas kimia, tabung reaksi, mikropipet, batang pengaduk, alat tulis, cawan petri, korek api, Bunsen, spatula besi, cawan porselin, Vortex, blender, pinset, *hot plate*, *stir bar*, kamera, neraca analitik, ose, labu *Erlenmeyer* 250 ml, laminar air flow, Loyang, jangka sorong, gelas ukur, wadah meserasi, jangka sorong, dan *Rotary evaporator*.

2) Bahan

Pada penelitian ini bahan yang digunakan yaitu:

Media *Mueller Hinton Agar* (MHA), biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, Ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*), aquades steril, etanol 96%, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), larutan *Mc Farland*, NaCl 0,9%, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), antibiotik *Cloramphenicol*, kertas saring, kertas label, tisu, kapas kering, aluminium foil, dan tip biru.

e. Sterilisasi Alat dan Bahan

Pada alat yang berbahan dasar gelas ataupun logam yang memiliki Tingkat ketelitian rendah di sterilisasi dalam oven pada suhu 180°C selama 1 jam. Sedangkan alat yang berbahan dasar kaca atau plastik yang memiliki tingkat ketelitian sangat tinggi di sterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C.

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

- a) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- b) Media MHA yang akan digunakan dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Gram MHA} = \frac{38 \text{ gram} \times 250 \text{ ml}}{1000} = 9,5 \text{ gram}$$

- c) Kemudian serbuk media MHA ditimbang sebanyak 9,5 gram
 - d) Setelah ditimbang serbuk MHA dilarutkan kedalam labu *Erlenmeyer* dengan 250 ml aquades
 - e) Setelah itu dipanaskan diatas *hot plate* sambil diaduk menggunakan *stir bar* hingga larut sempurna, jangan biarkan sampai mendidih.
 - f) Tutup *Erlenmeyer* dengan kapas dan aluminium foil
 - g) Selanjutnya disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - h) Kemudian masukkan media yang telah disterilkan kedalam cawan petri sebanyak 20 dan 35 ml selanjutnya biarkan hingga padat.
- g. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

- a) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- b) Media NA yang akan digunakan ditimbang dengan rumus:

$$\text{Gram NA} = \frac{28 \text{ gram} \times 100 \text{ ml}}{1000} = 2,8 \text{ gram}$$

- c) Media NA ditimbang sebanyak 2,8 gram.
- d) Serbuk media NA yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam labu *Erlenmeyer* untuk dilarutkan dengan aquades 100 ml.
- e) Kemudian panaskan diatas *hot plate* sambil diaduk menggunakan *stir bar* hingga larut sempurna, jangan biarkan sampai mendidih.
- f) Tutup labu *Erlenmeyer* dengan kapas dan aluminium foil.
- g) Setelah itu disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

- h) Selanjutnya masukkan media ke dalam tabung reaksi dan biarkan dalam posisi miring hingga memadat.
- h. Pembuatan Ekstrak daun sintrong
- 1) Daun sintrong yang telah di petik dibersihkan dengan air mengalir.
 - 2) Keringkan lalu dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk
 - 3) Serbuknya kemudian ditimbang sebanyak 500 gram pada neraca analitik.
 - 4) Kemudian serbuk direndam menggunakan etanol 96% sebanyak 2 liter didalam toples selama 3×24 jam, melalui penyaringan fitrat sehingga menghasilkan ekstrak cair.
 - 5) Setiap 6 jam sekali diaduk selama 5 menit
 - 6) Setelah 3×24 jam hasil meserasi disaring kemudian rendaman menggunakan corong untuk memisahkan ampas dan fitrat sehingga menghasilkan ekstrak cair.
 - 7) Selanjutnya ekstrak daun sintrong tersebut di uap menggunakan *retory evaporator* dengan suhu 60°C selama 1 jam hingga diperoleh ekstrak kental.
 - 8) Kemudian dibuat dalam konsentrasi yang berbeda yaitu 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%.
- i. Pembuatan Konsentrasi Daun Sintrong
- Konsentrasi 60% sebanyak 6 ml ekstrak daun sintrong + 4 ml pelarut DMSO
 - Konsentrasi 70% sebanyak 7ml ekstrak daun sintrong + 3 ml pelarut DMSO
 - Konsentrasi 80% sebanyak 8 ml ekstrak daun sintrong + 2 ml pelarut DMSO
 - Konsentrasi 90% sebanyak 9ml ekstrak daun sintrong + 1 ml pelarut DMSO

- Konsentrasi 100% sebanyak 10 ml ekstrak daun sintrong tanpa penambahan pelarut DMSO

Dengan rumus pengenceran :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

Keterangan:

V_1 : volume larutan stok

M_1 : konsentrasi larutan stok

V_2 : volume larutan perlakuan

M_2 : konsentrasi larutan yang diinginkan

j. Peremajaan Bakteri

- 1) Peremajaan bakteri dilakukan pada media NA yang dimiringkan pada tabung reaksi (NA miring)
- 2) Selanjutnya jarum ose disterilkan menggunakan busen lalu di diamkan beberapa saat. Setelah itu ambil satu cuplik ose dari cawan inkolasi bakteri.
- 3) Kemudian remajakan bakteri pada media agar NA miring, dengan cara menggoreskan bakteri dengan goresan zig zag di permukaan media NA miring.
- 4) Setelah itu di inkubasi selama 24 jam pada incubator pada suhu 37°C.

k. Pembuatan Antibiotik *Cloramphenicol* (kontrol positif)

- *Cloramphenicol* 250 mg dibuat dengan konsentrasi 5%
- Timbang 0,25 gram *Cloramphenicol*
- kemudian dilarutkan dengan pelarut DMSO sebanyak 5 ml.

2. Analitik

- 1) Menyiapkan alat dan bahan
- 2) Bakteri diencerkan dengan mencampurkan 1 dosis suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl lalu divortex dan di dibandingkan hingga dengan 0,5 larutan *Mc Farland*.

- 3) Kemudian bakteri dimasukkan ke dalam media MHA
- 4) Setelah itu buat lubang pada media MHA yang telah diinokulasi bakteri dengan menggunakan tabung reaksi yang diameternya dapat disesuaikan seperti piring
- 5) Selanjutnya dimasukkan ekstrak daun sintrong konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% kedalam setiap lubang pada media MHA.
- 6) Lalu diinkubasi dalam incubator dengan suhu 37°C selama 2x24 jam.
- 7) Setelah 2x24 jam diamati dan diukur diameter zona transparan yang terbentuk disekitar lubang dengan menggunakan jangka sorong.

3. Pasca Analitik

a. Kriteria objektif

- ✓ jika zona hambat yang terbentuk ≤ 14 mm (*Resistant*)
- ✓ jika zona hambat yang terbentuk yaitu 15-19 mm (*Intermediate*)
- ✓ jika zona hambat yang terbentuk yaitu ≥ 20 mm (*Susceptible*)

b. Dokumentasi Hasil Penelitian

Kegiatan dokumentasi hasil penelitian dalam bentuk gambar atau foto yang didapatkan dari hasil pengamatan dan pengukuran dari objek yang diteliti mulai dari pra analitik hingga pasca analitik.

c. Pelaporan Hasil Penelitian

Pelaporan hasil penelitian merupakan kegiatan melaporkan hasil penelitian yang telah dilakukan yaitu hasil pengukuran dan hasil pengamatan selama penelitian berlangsung.

F. Instrumen Penelitian

Instrument penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah logbook (buku harian penelitian), pulpen, kamera, dan lembar hasil pengamatan yang digunakan saat melakukan penelitian.

G. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer yang digunakan pada penelitian ini adalah data yang diperoleh langsung dari hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* di Laboratorium Mikrobiologi Bina Husada Kendari Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

2. Data Sekunder

Data sekunder pada penelitian ini diperoleh dari hasil penelitian terdahulu, buku-buku yang dipublikasikan yang kemudian dijadikan landasan teoritis dalam penulisan proposal ini.

H. Pengolahan Data

Pengolahan data yang diperoleh dari hasil penelitian dan dikerjakan melalui beberapa proses dengan tahapan, sebagai berikut :

1. Pemeriksaan data (*editing*) bertujuan untuk meneliti data yang telah diperoleh dari pengukuran dengan cara memeriksa kelengkapan dan konsistensi data yang ada.
2. Pengkodean data (*coding*) bertujuan untuk memudahkan dalam menganalisa data dengan cara memberikan kode atau atribut pada data.
3. Mentabulasi data (*tabulating*) tabulasi merupakan lanjutan Langkah coding untuk mengelompokkan data kedalam suatu data tertentu menurut sifar-sifar yang dimiliki sesuai dengan tujuan penelitian.

I. Analisis Data

Pada penelitian ini dianalisis dengan metode deskriptif berdasarkan kategori efektif dan tidak efektif ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Dilanjutkan dengan dianalisis data dari penentuan hasil menggunakan rumus zona hambat yaitu :

$$\frac{(Dv-Dc) + (Dh-Dc)}{2}$$

Keterangan:

Dv: Diameter vertikel

Dc : Diameter Cakram/Sumur

Dh : Diameter Horizontal

J. Penyajian Data

Data hasil penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel kemudian dijelaskan dalam bentuk narasi sehingga diperoleh hasil kesimpulan mengenai gambaran hasil penelitian.