

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini dilakukan secara *eksperimental laboratories*, dengan menggunakan desain *One-Shot Case Study* yaitu dengan desain terdapat suatu kelompok diberi perlakuan, dan selanjutnya di observasi hasilnya.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Lokasi penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium 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 segar dan diambil pada pagi hari dan dipetik secara manual yang kemudian dicuci, dikeringkan, dipotong kecil-kecil, lalu ditimbang sebanyak 500g kemudian diolah menjadi ekstrak dan dibuat ke dalam 5 variasi konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% yang akan diuji terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

D. Instrumen Penelitian

Dalam penelitian ini yang digunakan sebagai instrumen pengumpulan data adalah buku tulis, jangka sorong, pulpen, dan kamera.

E. Prosedur Kerja

1. Pra Analitik

a. Persiapan alat dan bahan

1) Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

- | | |
|-----------------------------|-----------------------|
| a) Autoklaf | k) Lampu spiritus |
| b) Oven | l) Timbangan analitik |
| c) Inkubator | m) Sendok tanduk |
| d) <i>Rotary evaporator</i> | n) Chopper |
| e) Gelas kimia | o) Drigalski |
| f) Gelas ukur | p) Hot plate |
| g) Tabung reaksi | q) Pinset |
| h) Erlenmeyer | r) Mortal dan alu |
| i) Cawan petri | s) Jangka sorong |
| j) Cawan porselin | t) Ose |

2) Bahan

Bahan yang digunakan yaitu:

- Daun bidara (*Ziziphus mauritiana*)
- Biakan murni *Staphylococcus aureus*
- Media *Nutrient Agar* (NA)
- Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- NaCl Fisiologis 0,9%
- Standar kekeruhan Mc farland 0,5
- Aquadest
- Etanol 96%
- Antibiotik *Rifampicin* 500 mg
- Kertas cakram
- Alumunium foil
- Kertas label

b. Sterilisasi alat

Semua peralatan penelitian dicuci, dikeringkan, dan dibungkus dengan aluminium foil, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

c. Pembuatan Media *Nutrien Agar*

- 1) Ditimbang media *Nutrien Agar* (NA) sebanyak 5,6 gram lalu dilarutkan dalam 200 mL aquadest ke dalam erlenmeyer dan di homogenkan dengan cara dipanaskan diatas hotplate hingga bubuk media larut dalam aquadest.
- 2) Setelah homogen, pH media diukur hingga diperoleh pH 7, kemudian media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 3) Kemudian, media dituang sebanyak 15 mL ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat.
- 4) Setelah itu dimasukkan media ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama \pm 24 jam untuk uji kualitas media dengan posisi cawan petri terbalik.

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

- 1) Ditimbang media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebanyak 11,4 gram ke dalam erlenmeyer lalu ditambahkan sebanyak 300 mL aquadest dan dihomogenkan dengan cara diaduk diatas hotplate.
- 2) Setelah itu, erlenmeyer yang berisi larutan media MHA ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil.
- 3) Kemudian larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 4) Setelah steril, media MHA dituang sebanyak 25 mL ke dalam cawan petri dan diamkan pada suhu kamar hingga memadat.
- 5) Setelah media memadat, bungkus dengan menggunakan kertas dengan posisi plate terbalik.

e. Peremajaan Bakteri

- 1) Disiapkan media *Nutrient Agar* (NA) yang sebelumnya telah dibuat.
- 2) Diambil satu mata ose biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*, lalu diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* (NA) secara aseptik dengan menggunakan metode gores (*Streak plate*).
- 3) Setelah itu, media diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C.

f. Pembuatan larutan *Mc farland* 0,5

Larutan standar *Mc Farland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) dibuat dengan cara mencampurkan barium klorid (BaCl_2) 1% sebanyak 0,05 ml dengan asam sulfat (H_2SO_4) 1% sebanyak 9,95 ml dalam tabung reaksi, lalu dihomogenkan. Perbandingan dengan larutan standar ini bertujuan untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan pada prosedur pengujian antimikroba dan dimaksudkan untuk menggantikan perhitungan bakteri satu per satu.

g. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

- 1) Disiapkan bakteri *staphylococcus aureus* yang telah dibiakkan terlebih dahulu pada media *Nutrient Agar* (NA).
- 2) Diambil biakan bakteri sebanyak 1-2 ose.
- 3) Kemudian disuspensikan kedalam 10 mL larutan NaCl 0,9% sampai diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5 McFarland. Kekeruhan tersebut menunjukkan jumlah koloni pada suspensi yang akan digunakan.

h. Pembuatan larutan kontrol positif

Kontrol positif yang digunakan adalah *Rifampicin* 500 mg. Larutan dibuat konsentrasi 5% dengan cara menimbang 0,5 gram *Rifampicin* kemudian dilarutkan dalam 10 mL aquadest.

i. Pembuatan ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*)

- 1) Daun bidara dibersihkan dengan menggunakan air mengalir hingga bersih, lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 4 jam.
- 2) Setelah kering, daun bidara dihaluskan dengan menggunakan chopper hingga menjadi serbuk.
- 3) Ditimbang serbuk daun bidara sebanyak 500 gram.
- 4) Kemudian serbuk dimasukkan ke dalam toples maserasi dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 1000 mL.
- 5) Perendaman dilakukan selama 3x24 jam sambil diaduk tiap 6 jam sekali hingga didapatkan maserat dari hasil perendaman.
- 6) Setelah itu, dilakukan penyaringan dan penguapan untuk memisahkan ekstrak dengan larutan perendam selama 1x24 jam dengan menggunakan alat evaporator sehingga didapatkan ekstrak yang kental.

j. Pembuatan variasi konsentrasi

Ekstrak daun bidara dibuat dalam 5 variasi konsentrasi yaitu pada variasi konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, dengan 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 yaitu:

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

Tabel 1. Perbandingan Volume Ekstrak Daun Bidara Dalam 10 ml.

Konsentrasi Stok	Massa Ekstrak	Volume Aquadest	Konsentrasi Akhir (%)	Volume Pengenceran
100%	2 gram	8 mL	20%	10 mL
100%	4 gram	6 mL	40%	10 mL
100%	6 gram	4 mL	60%	10 mL
100%	8 gram	2 mL	80%	10 mL
100%	10 gram	-	100%	10 mL

2. Analitik

Pengujian Uji Daya Hambat:

- a. Disiapkan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah dibuat sebelumnya
- b. Ditambahkan 5 mL suspensi bakteri pada media MHA dan diratakan dengan menggunakan drigalski.

- c. Diamkan 5-10 menit agar biakan terdifusi kedalam media.
 - d. Kertas cakram direndam dalam ekstrak etanol daun bidara pada masing-masing konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. pada *Rifampicin* sebagai kontrol (+) dan aquades sebagai kontrol negatif (-).
 - e. Kertas cakram direndam selama \pm 15 menit.
 - f. Kemudian dengan menggunakan pinset steril, diletakkan kertas cakram yang sudah direndam pada media MHA.
 - g. Setelah itu, dibungkus media agar dengan menggunakan kertas, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.
 - h. Diamati ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram.
3. Pasca Analitik
- a. Pencatatan hasil penelitian

Pencatatan hasil penelitian merupakan hasil penelitian yang dilakukan dengan pencatatan suatu aktifitas dalam bentuk tulisan baik di ketik maupun di tulis tangan atau dalam bentuk tabel, grafik, atau gambar dari hasil pengukuran atau pengamatan yang telah dilakukan.

Pencatatan hasil penelitian ditentukan dengan rumus :

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

Keterangan:

DV = Diameter Vertikal

DH = Diameter Horizontal

DC = Diameter Cakram

- b. Dokumentasi Hasil Penelitian

Dokumentasi Hasil Penelitian merupakan kegiatan pengambilan hasil dalam bentuk foto atau gambar dar hasil pengukuran, pengamatan, pengambilan sampel dan lain lain yang berhubungan dengan hasil penelitian mulai dari pra analitik, analitik sampai pasca analitik.

c. Pelaporan Hasil Penelitian

Pelaporan hasil penelitian adalah kegiatan melaporkan hasil penelitian setelah dilakukan pengukuran dan pengamatan, hasil penelitian itu dilaporkan berdasarkan hasil pengukuran yang dijadikan sebagai hasil penelitian.

Interpretasi hasil:

1) Efektif: apabila terdapat zona hambatan.

Besarnya zona hambatan terdiri dari 3 kategori, yaitu:

a) Zona hambat dalam batas *resisten* : ≤ 16 mm.

b) Zona hambat dalam batas *intermediate* : 17-19 mm.

c) Zona hambat dalam batas *sensitif* : ≥ 20 mm.

2) Tidak efektif: apabila tidak terdapat zona hambatan.

F. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer pada penelitian ini ialah data yang diperoleh langsung dari lapangan melalui instrumen pengumpulan data yang digunakan dan berkaitan dengan objek yang diteliti.

2. Data Sekunder

Data sekunder yang digunakan adalah data yang diperoleh dari buku maupun jurnal penelitian yang bisa digunakan sebagai acuan dalam penelitian ini.

G. Pengolahan Data

1. Pemeriksaan data (*editing*) bertujuan untuk memeriksa data yang telah diperoleh.
2. Pengkodean data (*coding*) bertujuan untuk memberikan kode untuk setiap kumpulan data yang diperoleh dalam setiap instrumen penelitian untuk memudahkan analisis data.
3. Pengelompokan data (*tabulating*) yaitu memasukkan data yang telah dikelompokkan ke dalam tabel agar lebih mudah dipahami dan diuraikan.

H. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan metode data deskriptif dengan tabel dan gambar, dimana diameter zona hambat yang terbentuk pada media kultur dilihat dan diukur panjang diameternya.

I. Penyajian Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel kemudian diuraikan dalam bentuk narasi.