

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *Exsperimental Laboratory* yang menggunakan desain *one-shot case study* yaitu desain penelitian yang membahas variabel bebas yang diteliti dengan cara mengamati atau mengukur variabel bebasnya. Ekstrak daun bidara dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% digunakan dalam percobaan.

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada tanggal 07 s/d 30 Juni 2024.

2. Lokasi Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Universitas Halu Oleo Kendari.

C. Bahan Uji

1. Bakteri *Bacillus sp*

Bakteri *Bacillus sp* dalam penelitian ini merupakan biakan murni *Bacillus sp* yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Makassar.

2. Daun bidara (*Ziziphus mauritiana*)

Daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) yang dipetik segar berwarna hijau tua dari Kelurahan Pondidaha, Kecamatan Pondidaha, Kabupaten Konawe, Sulawesi Tenggara.

D. Prosedur Pengumpulan Data

Pengambilan data pada penelitian ini dilakukan dari awal penyusunan proposal yang berasal dari jurnal penelitian sebelumnya dan literatur yang mendukung. Kemudian dilakukan pengamatan efektifitas ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) menggunakan berbagai jenis konsentrasi mulai dari 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

E. Prosedur Kerja

Metode : Difusi Cakram (*Kirby bauer*)

Sampel : Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana*)

Prinsip : Terdifusinya senyawa antimikroba kedalam media agar padat yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Daerah yang jernih menandakan ada hambatan terhadap pertumbuhan mikroorganismen yang disebabkan agen antimikroba di permukaan media agar padat.

Tiga tahapan yang diperlukan dalam penelitian uji daya hambat yakni:

1. Pra analitik

a. Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

1) Alat:

- | | |
|-----------------------|---------------------------|
| a) <i>Autoclave</i> | n) Kasa/Asbes |
| b) Botol semprot | o) Masetator |
| c) Cawan petri | p) Mikropipet |
| d) Cawan porselin | q) Jangka sorong |
| e) Coper | r) Ose steril |
| f) Corong | s) Oven |
| g) <i>Driglesky</i> | t) Batang pengaduk Pinset |
| h) <i>Erlenmenyer</i> | u) Rak tabung |
| i) Gelas kimia | v) Sendok tanduk |
| j) Gelas ukur | w) Spoit 20 cc |
| k) Hot plate | x) Tabung reaksi |
| l) <i>Incubator</i> | y) Timbangan analitik |
| m) Kaki tiga | |

2) Bahan:

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| a) Aluminium foil | e) Daun bidara (<i>Ziziphus mauritiana</i>) |
| b) <i>Antibiotik Kloromphenikol</i> | f) Larutan 1% Barium klorida encer
(1% b/v BaCl ₂) |
| c) <i>Aquadest</i> | g) Auminium foil |
| d) Biakan murni <i>Bacillus sp</i> | |

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| h) Antibiotik Kloromphenikol | n) Spidol |
| i) <i>Aquadest</i> | o) Kertas saring |
| j) Biakan murni <i>Bacillus sp</i> | p) Larutan <i>Etanol</i> 96% |
| k) Daun bidara (<i>Ziziphus mauritiana</i>) | q) Media <i>Muerller Hinton Agar</i> (MHA) |
| l) Larutan 1% Barium klorida encer (1% b/v BaCl ₂) | r) Media <i>Nutrien Agar</i> (NA) |
| m) Larutan 1% Asam sulfat encer (1% b/v H ₂ SO ₄) | s) Paper disk |
| NaCl 0,9% | t) Plastik wrap |
| | u) Tip kuning dan putih |
| | v) Tisu |

b. Sentrilisasi Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang tidak memiliki tingkat keakuratan tinggi seperti cawan petri, cawan porselin dan lain-lain harus dicuci, dikeringkan, dibungkus kertas dan dimasukkan ke dalam oven bersuhu 170°C selama 1 jam sebelum digunakan. Sedangkan alat-alat yang berasal dari kaca atau logam dan memiliki tidak tingkat keakuratan seperti: pipet volume, *erlenmeyer*, gelas ukur serta media MHA disterilkan dalam *Autoclave* pada temperatur 121°C selama 15 menit sebelum digunakan.

c. Pembuatan Media *Muerller Hinton Agar* (MHA)

Timbang terlebih dulu MHA sebanyak 11,4 gram dan larutkan dalam 300 ml *aquadest*, kemudian masukkan larutan tersebut ke dalam *Erlenmeyer*. Panaskan larutan di atas *hot plate* dengan suhu 150°C diaduk dengan batang pengaduk hingga larut dan jangan sampai mendidih. Setelah larut, angkat *Erlenmeyer* dan tutup dengan kapas yang dilapisi plastik wrap. Selanjutnya, sterilkan larutan dalam *Autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, diamkan sejenak hingga suhu hangat (45-50°C) tuangkan media ke dalam cawan petri steril di dekat api bunsen dan biarkan hingga memadat dan dingin.

d. Pembuatan Media *Nutrien Agar* (NA)

Timbang 5,6 gram medium *Nutrisi Agar* (NA), larutkan dalam 200 ml *aquadest*, kemudian dihomogenisasi dengan cara dipanaskan di atas *hot plate* sampai serbuk (NA) larut dalam *aquades*, setelah homogenisasi diukur pH medium yaitu pH 7, lalu disterilkan dalam *Autoclave* pada suhu 121°C 15 menit, tunggu hingga suhu hangat 45-50°C, lalu tuang ke dalam cawan petri steril di dekat api bunsen dan simpan pada suhu 2-8°C.

e. Pembuatan standar *Mc Farland*

Pipet sebanyak 0.05 ml larutan *Barium chlorida* (BaCL₂) 1% dan masukkan ke tabung reaksi, selanjutnya pipet larutan *Asam sulfat* (H₂SO₄) 1% sebanyak 9,95 ml lalu dihomogenkan hingga larutan berubah menjadi keruh (Emma, 2017).

f. Pemiakan Bakteri *Bacillus sp*

Ambil satu ose lurus steril dari suspensi bakteri *Bacillus sp* kemudian tanam menggunakan teknik penggoreskan kuadran ke media *Nutrien Agar* (NA). Inkubasi media tersebut selama 1×24 jam pada suhu 37°C dalam *incubator*. Setelah di inkubasi, amati pertumbuhan koloni spesifik pada media. Hasil yang didapat adalah koloni bakteri *Bacillus sp*.

g. Pembuatan Suspensi Uji

Bakteri yang telah dibiakan kemudian diambil menggunakan ose steril lalu disuspensikan dalam 10 ml NaCL 0,9% pada tabung reaksi, homogenkan menggunakan bekas ose tadi sampai terlihat keruh setelah disuspensikan.

h. Pembuatan Antibiotik *kloromphenikol* (Kontrol Positif)

Kloromphenikol ditimbang menggunakan neraca analitik sebanyak 0,05 gram kemudian dilarutkan dalam 10 ml *aquadest* steril hingga diperoleh konsentrasi 0,5%, dari hasil perhitungan dari rumus % b/v.

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

Daun bidara dibersihkan di bawah air mengalir hingga bersih dan keringkan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 4 jam. Setelah itu, haluskan daun bidara menggunakan coper, lalu ayak hingga menghasilkan serbuk yang lembut. Ambil 500 gram serbuk daun bidara dan masukkan ke dalam toples kaca hingga terisi setengah dari toples tersebut, kemudian rendam dalam 1000 ml *etanol* 96% selama tiga hari sambil diaduk setiap 6 jam sekali. Setelah proses perendaman, saring menggunakan kertas saring untuk memisahkan ampas dari daun bidara. Uapkan hasil ekstraksi daun bidara hingga volumenya berkurang dan menjadi kental. Larutan ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) yang sudah kental kemudian dibuat dalam lima konsentrasi berbeda yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Volume ekstrak daun bidara yang diambil dihitung dengan menggunakan rumus pengenceran yaitu (Nor, 2018);

Rumus pengenceran :

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

Keterangan :

% : Variasi Konsentrasi (Konsentras 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 0,2 gram ekstrak daun bidara kemudian ditambahkan 9,8 ml *aquadest* lalu dihomogenisasi.
- 2) Konsentrasi 40% dibuat dengan 0,4 gram ekstrak daun bidara kemudian ditambahkan 9,6 ml *aquadest* lalu dihomogenisasi.

- 3) Konsentrasi 60% dibuat dengan 0.6 gram ekstrak daun bidara kemudian ditambahkan 9,4 ml *aquadest* lalu dihomogenisasi.
- 4) Konsentrasi 80% dibuat dengan 0.8 gram ekstrak daun bidara kemudian ditambahkan 9,2 ml *aquadest* lalu dihomogenisasi.
- 5) Konsentrasi 100% dibuat dengan 1 gram ekstrak daun bidara kemudian ditambahkan 9 ml *aquadest* lalu dihomogenisasi.

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

No	M1	V1	Volume <i>aquadest</i>	M2	V2
1.	100%	0,2 g	9,8 ml	20%	10 ml
2.	100%	0,4 g	9,6 ml	40%	10 ml
3.	100%	0,6 g	9,4 ml	60%	10 ml
4.	100%	0,8 g	9,2 ml	80%	10 ml
5.	100%	1 g	9 ml	100%	10 ml

(Sumber : Data Primer)

2. Analitik

- 1) Siapkan alat dan bahan
- 2) Sterilkan semua alat dan bahan yang digunakan
- 3) Siapkan media (MHA) padat
- 4) Siapkan suspensi bakteri *Bacillus sp* dengan konsentrasi 10^6 koloni/ml.
- 5) Pipet 0,1 ml suspensi bakteri *Bacillus sp* dan tuang ke media MHA, ratakan menggunakan *drigalski*. Kemudian diamkan sebentar selama 5-10 menit agar biakan terdifusi kedalam media.
- 6) Berikan 4 tanda di bagian bawah cawan petri untuk memasukkan *paper disk*
- 7) Tempatkan *paper disk* pada ekstrak daun bidara dengan lima konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.
- 8) Angkat perlahan dengan pinset, tempatkan *paper disk* secara aseptik ke dalam cawan petri yang berisi MHA dan suspensi bakteri *BacillusSp* mengikuti tanda yang telah dibuat sebelumnya.
- 9) Tutup cawan petri dengan plastik wrap.
- 10) Inkubasi pada suhu 37°C selama 1 × 24 jam dalam *incubator*

- 11) Lakukan pengamatan untuk mendapatkan hasil dengan jangka sorong untuk mengukur zona hambat berupa zona bening atau area yang tidak ditumbuhi bakteri *Bacillus sp*
 - 12) Catat hasilnya dalam milimeter dan dokumentasikan hasil yang diperoleh
3. Pasca analitik

a. Pencatatan Hasil Penelitian Pencatatan

Hasil penelitian merupakan hasil penelitian yang dilakukan pencatatan suatu aktivitas dalam bentuk tulisan baik diketik maupun ditulis dengan atau dalam bentuk grafik atau gambar dari hasil pengukuran atau pengamatan yang telah dilakukan. Pencatatan hasil penelitian ditentukan dengan 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 pada area media, lalu dilakukan pengukuran berdasarkan tiga kategori yaitu:

- 1) Resisten : apabila terbentuk zona hambat ≤ 14 mm
- 2) Intermediate : apabila terbentuk zona hambat 15 – 19 mm
- 3) Sensitif : apabila terbentuk zona hambat ≥ 20 (CLSI, 2021).
- 4) Sedangkan dikatakan tidak efektif apabila hasil pengamatan tidak terbentuk zona bening.

c. Dokumentasi Hasil Penelitian

Kegiatan yang mengabadikan hasil berupa foto atau gambar pengukuran, pengamatan, pengambilan sampel, dan analisis pendahuluan lainnya yang berkaitan dengan penelitian, mulai dari pra analitik, analitik hingga pasca analitik

d. Pelaporan Hasil Penelitian

Setelah dilakukan pengukuran dan pengamatan, maka pelaporan hasil penelitian disajikan berdasarkan hasil pengukuran yang dilakukan.

F. Prosedur Pengumpulan Data

Data dikumpulkan mulai dari penyusunan proposal awal, dimana data yang dikumpulkan berasal dari kajian penelitian sebelumnya serta dari literatur pendukung penelitian. Selanjutnya pengamatan dari efektifitas ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) dengan 5 konsentrasi berbeda yakni 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

G. Instrumen Penelitian

Informasi yang dipakai pada penelitian adalah :

1. Alat dokumentasi
2. Logbook (laporan hasil penelitian)
3. Lembar hasil pengamatan

H. Jenis data

1. Data Primer

Data primer diperoleh langsung dari hasil pengukuran zona hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus sp* pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% di Laboratorium Farmasi Universitas Halu Oleo.

2. Data Sekunder

Data sekunder dalam penelitian ini diperoleh dari hasil penelitian terdahulu, jurnal nasional dan internasional terakreditasi dan buku-buku yang dipublikasikan kemudian dijadikan landasan teoritis dalam penulisan karya tulis ilmiah ini.

I. Penyajian Data

Penyajian data pada penelitian ini yaitu data yang didapatkan dari hasil penelitian disajikan dalam bentuk gambar dan tabel kemudian dijelaskan mengenai hasil yang telah didapatkan.

J. Analisis Data

Pada penelitian ini analisis data yang digunakan yaitu metode deskriptif berdasarkan kategori efektif atau tidak efektif ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap pertumbuhan *Bacillus sp.* Dilanjutkan dengan analisis data dari penentuan hasil penelitian dengan menggunakan rumus zona hambat.