

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian *eksperimental laboratories* dengan desain yang di gunakan *one-shot case study*. Desain penelitian ini adalah menggunakan satu kelompok tanpa kelompok pembanding.

B. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat Penelitian

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

2. Waktu penelitian

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

C. Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) yang diambil di Jln poros Kelurahan Mangga Dua, Kecamatan Kendari, Kabupaten Kota Kendari, Sulawesi Tenggara. Daun bidara yang masih segar, diambil pada pagi hari, digunakan sebanyak 500 gr lalu diolah menjadi ekstrak kemudian dibuatkan menjadi konsentrasi sebanyak 5 konsentrasi yakni, 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

D. Prosedur Pengumpulan Data

Pengumpulan data ini berdsarkan dari jurnal penelitian sebelumnya dan literature yang mendukung penelitian ini. Data yang diperoleh dari hasil penelitian yang akan diolah, dihitung dan dicatat.

E. Prosedur penelitian

1. Pra Analitik

- a. Sampel : Daun bidara (*Ziziphus mauritiana*)
- b. Metode : Difusi cakram(*Disk-diffusion method*)
- c. Prinsip kerja : Terdifusinya senyawa antimikroba kedalam media padat yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji.
- d. Persiapan alat dan bahan

1. Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu :

- | | |
|----------------------|------------------------|
| a) Cawan petri | n) Sendok tanduk |
| b) Gelas kimia | o) Ose |
| c) Timbangan digital | p) Tip |
| d) Erlemeyer 250 ml | q) Jangka sorong |
| e) Gelas ukur | r) Mikropipet |
| f) Blender | s) Batang pengaduk |
| g) Hotplate | t) Drigalski |
| h) Oven | u) Spatula |
| i) Mortal dan alu | v) Lampu spiritus |
| j) Pipet ukur 10 ml | w) Gunting, dan pinset |
| k) Cork borer | x) Kain kasa |
| l) Autoclave | y) Inkubator |
| m) Tabung reaksi | z) Spidol |

2. Bahan yang akan digunakan pada saat penelitian yaitu :

- a) Aquades steril
- b) Media *Muller Hinton Agar* (MHA)
- c) Media *Nutrient Agar* (NA)
- d) Ekstrak daun bidara
- e) Etanol 96%
- f) Biakan bakteri *Salmonella typhi*
- g) Antibiotik *Ciprofloxacin* 500 mg
- h) Spiritus/Bunsen
- i) Kertas saring
- j) Kertas cakram
- k) Nacl 0,9%
- l) Aluminium foil
- m) Kapas
- n) Tip kuning
- o) Kertas label

3. Sterilisasi alat dan bahan

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

4. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

- a) Media NA ditimbang sebanyak 5,6 gram
- b) Serbuk media NA yang telah ditimbang dipindahkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan 200 ml aquadest, lalu diaduk.
- c) Larutan dihomogenkan dengan bantuan pemanasan, jangan sampai mendidih.
- d) Media disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
- e) Media yang telah disterilkan dituang dalam masing-masing cawan petri steril secara aseptik (didepan lampu spiritus)
- f) Media dibiarkan dalam cawan petri hingga memadat.
- g) Jika sudah memadat dapat digunakan atau disimpan dalam lemari pendingin.

5. Pembuatan Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)

- a) Media MHA ditimbang sebanyak 11,4 gram
- b) Serbuk media MHA yang sudah ditimbang dipindahkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan 300 ml aquades, lalu diaduk.
- c) Larutan dihomogenkan dengan bantuan pemanasan, jangan sampai mendidih.
- d) Media disterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
- e) Media yang telah di sterilkan dituang dalam masing-masing cawan petri steril secara aseptik (dibelakang lampu spiritus).
- f) Media dibiarkan dalam cawan petri hingga memadat.

g) Jika sudah memadat dapat digunakan atau disimpan dalam lemari pendingin.

6. Peremajaan bakteri

- a) Siapkan media *Nutrient Agar* (NA) yang sebelumnya telah dibuat.
- b) Biakan murni *Salmonella typhi* diambil satu ose
- c) Kemudian diinokulasikan dengan metode gores (*Streak plate*) pada media *Nutrient Agar* (NA) secara aseptik
- d) Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam sehingga diperoleh bakteri murni.

7. Pembuatan larutan Mc Farland

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

- a) Masukkan Barium Clorida (BaCl_2) 0,1 gram kedalam 100 ml aquadest dan homogenkan.
- b) Masukkan larutan asam sulfat (H_2SO_4) 1,1 ml kedalam 50 ml aquadest dan homogenkan.
- c) Campurkan kedua larutan yang telah dibuat dengan perbandingan 0,05 ml BaCl_2 dan 9,95 mL H_2SO_4 lalu homogenkan.

8. Pembuatan suspensi bakteri uji

- a) Siapkan biakan murni bakteri uji yang telah diremajakan dalam media *Nutrient Agar* (NA).
- b) Lalu bakteri uji yang telah dilakukan peremajaan diambil dengan 1 ose yang telah dipijarkan sebelumnya.
- c) Selanjutnya disuspensikan kedalam larutan NaCl fisiologis 0,9% sebanyak 10 ml, kemudian dihomogenkan.
- d) Kemudian samakan kekeruhan suspensi bakteri dengan larutan Mc farland 0,5.

9. Pembuatan kontrol positif

- a) *Ciprofloxacin* 500 mg dihaluskan dengan menggunakan mortar dan alu. Lalu ditimbang sebanyak 0,05 gram, untuk membuat konsentrasi 5%.

b) Kemudian dilarutkan kedalam 10 mL aquadest

10. Pembuatan ekstrak daun bidara

1. Daun bidara dibersihkan dibawah 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.
4. Kemudian dimasukkan ke dalam toples maserasi dan di tambahkan 1000 mL larutan etanol 96%.
5. Perendaman dilakukan selama 3x24 jam sambil diaduk tiap 6 jam sekali hingga didapatkan maserat dari hasil perendaman.
6. Selanjutnya dilakukan penyaringan dan penguapan untuk memisahkan ekstrak dengan larutan perendam selama 1x24 jam hingga didapatkan ekstrak yang kental.

11. 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 ditambahkan aquadest hingga volume 10 ml. pembuatan konsentrasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Not, 2018) :

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

Keterangan :

% : varian 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 :

Tabel 2. Massa ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) pada masing-masing konsentrasi dalam 10 ml Aquadest.

No	Konsentrasi Stok	Massa Ekstrak Bidara	Volume Aquadest yang ditambahkan	Konsentrasi Akhir (%)	Volume Pengenceran (v)
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%	10 ml

2. Analitik

1. Siapkan suspensi bakteri *Salmonella typhi* yang telah dibuat sebelumnya.
2. Tambahkan 5 mL suspensi bakteri pada media MHA dan kemudian ratakan menggunakan drigalski.
3. Selanjutnya diamkan 5-10 menit agar biakan terdifusi kedalam media.
4. Celupkan masing-masing kertas cakram pada ekstrak daun bidara dimasing-masing konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.
5. Letakkan kertas cakram dengan menggunakan pinset ditengah media MHA.
6. Lakukan kontrol positif dan negatif
 - a) Kontrol positif: media Mueller Hinton Agar + *Ciprofloxacin*
 - b) Kontrol negatif media *Mueller Hinton Agar* + Aquadest
7. Bungkus cawan petri menggunakan kertas, lakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam.
8. Amati ada tidaknya zona bening yang terjadi pada daerah sekitar kertas cakram.

3. Pasca Analitik

- a) *Resisten* : apabila terbentuk zona hambat (≤ 12 mm)
- b) *Intermediet* : apabila terbentuk zona hambat (13-17 mm)
- c) *Sensitif* : apabila terbentuk zona hambat (≥ 18 mm) (CLSI, 2021)

F. Instrumen Penelitian

Instrument penelitian yang akan digunakan pada penelitian ini adalah logbook (buku catatan harian penelitian), dan lembar pengamatan yang digunakan saat melakukan penelitian.

G. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer yakni diambil dari uji daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap bakteri *Salmonella typhi* yang diinkubasi selama 24 jam pada setiap konsentrasi ekstrak daun bidara. Data yang dikumpulkan dicatat dalam bentuk tabel.

2. Data Sekunder

Data sekunder diambil dari sumber penelitian relevan, baik diperoleh dari buku, bahan kuliah, maupun informasi yang berkaitan dengan penelitian ini dan digunakan sebagai landasan teoritis untuk penulisan karya tulis.

H. Pengolahan Data

Pengolahan data dilakukan melalui proses tahapan sebagai berikut :

1. *Editing* : pemeriksaan data atau pengoreksian data yang diperoleh sebagai pelengkapan dan pengisian lembar hasil pengamatan.
2. *Coding* : Pengkodean data melibatkan pengolahan data yang diperoleh dari hasil observasi dengan menggunakan computer.
3. *Tabulating* : Menyajikan data dalam sesuai dengan tujuan penelitian yang dilakukan, penyajian data dalam bentuk tabel agar mudah untuk dianalisis.

I. Analisis Data

Dalam penelitian ini, analisis data yang digunakan adalah analisis deskriptif berdasarkan kategori efektif dan tidak efektif dari ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Dilanjutkan dengan analisis data dari penentuan hasil menggunakan rumus zona hambat yaitu :

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

Keterangan :

Dv = Diameter vertikal

Dc = Diameter cakram/sumur

Dh = Diameter horizontal

J. Penyajian Data

Data dalam penelitian ini diperoleh disajikan dalam bentuk gambar dan tabel kemudian di deskripsikan sehingga diperoleh hasil analisis uji daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*.

