

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Experimental laboratory* untuk mengetahui kemampuan daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana L*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan rancangan penelitian adalah *One-Shot Case Study* dengan Variabel *independent*.

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Universitas Halu Oleo Kendari

2. Waktu Penelitian

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

C. Subjek dan Objek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah daun bidara (*Ziziphus mauritiana L*). Sedangkan, objek penelitian yang digunakan adalah zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

D. Bahan Uji

Bahan uji dari penelitian ini adalah daun bidara (*Ziziphus mauritiana L*) segar dan diambil saat sore yang diperoleh dari Kecamatan Ranomeeto, Kabupaten Konawe Selatan. Daun tersebut dibersihkan, dikeringkan dalam oven selama 150 menit dengan suhu 50⁰C, dan dihaluskan menggunakan blender. Pembuatan larutan uji dilakukan dengan proses ekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang dibuat menjadi beberapa seri konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% yang kemudian diuji daya hambat ekstrak daun bidara terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

E. Prosedur Kerja Penelitian

1. Pra Analitik

- a. Sampel : Daun Bidara Segar (*Ziziphus mauritiana L*)
- b. Metode : Difusi (*Kirby Bauer*)

c. Prinsip : Terdifusinya senyawa antimikroba dalam media padat yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji.

d. Persiapan Alat dan Bahan

1) Alat Penelitian :

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| a) Autoclave | m) Batang pengaduk |
| b) Oven | n) Driglesky |
| c) Inkubator | o) Incubator |
| d) Cawan Petri | p) Hot Plate |
| e) Cawan porselen | q) Blender kering |
| f) Tabung Reaksi | r) Timbangan Analitik |
| g) Rak Tabung | s) Lampu spiritus |
| h) Gelas Ukur | t) Sendok tanduk |
| i) Erlenmeyer | u) Kaki tiga & asbes |
| j) Beaker Glass | v) Mikropipet |
| k) Rotary Evaporator | w) Jangka sorong |
| l) Ose bulat steril | x) Pinset |

2) Bahan Penelitian :

- a) Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana L*)
- b) Biakan bakteri *Escherichia coli*
- c) Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- d) Media *Nutrient Agar* (NA)
- e) NaCl 0.9%
- f) Etanol 96%
- g) Aquadest steril
- h) Antibiotik *Chloramphenicol*
- i) Standar kekeruhan *Mc Farland*
- j) Kertas cakram (*paper disc*)
- k) Kertas saring
- l) Kapas & kertas label
- m) Aluminium foil

e. Sterilisasi Alat Penelitian

- 1) Alat-alat yang digunakan berbahan kaca atau logam yang tidak memiliki tingkat skala atau keakuratan tinggi seperti cawan petri, cawan porselin, dan lain-lain dibungkus dengan kertas dan disterilkan dalam oven pada suhu 180°C selama 1 jam.
- 2) Sedangkan, alat-alat yang digunakan berbahan kaca atau logam yang memiliki tingkat keakuratan seperti pipet volume, erlenmeyer, gelas ukur serta media MHA dibungkus dengan aluminium foil dan disterilkan dalam autoclave pada temperatur 121°C selama 15 menit.
- 3) Setelah steril, alat didinginkan dan disimpan di tempat yang telah disiapkan

f. Pembuatan media *Nutrient agar* (NA)

- 1) Media NA ditimbang sebanyak 28 gram
- 2) Serbuk media NA yang sudah ditimbang dipindahkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan 1000 ml aquadest.
- 3) Lalu dihomogenkan dengan cara dipanaskan diatas hot plate, jangan sampai mendidih
- 4) Setelah homogen kemudian diukur pH media yaitu harus pH 7
- 5) Media disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
- 6) Setelah disterilkan dituang dalam cawan petri steril sebanyak 20 ml secara aseptik dan dibiarkan hingga padat lalu masukkan kedalam inkubator 37⁰C selama ± 24 jam guna uji kualitas media dengan posisi cawan petri terbalik

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

- 1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- 2) Media MHA yang digunakan ditimbang dengan rumus : MHA 38 gram/liter atau 200 ml

$$\text{Gram MHA} : \frac{38 \text{ gram} \times 300 \text{ ml}}{1000} = 11,4 \text{ gram.}$$

- 3) Bubuk media MHA ditimbang pada neraca analitik sebanyak 11,4 gram kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dilarutkan dengan aquades sebanyak 300 ml.
- 4) Homogenkan diatas hot plate sambil diaduk hingga bubuk media larut (warna larutan jernih).
- 5) Setelah homogen, Erlenmeyer berisi media ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan aluminium foil dan disterilkan dengan autoclave pada temperatur 121°C selama 15 menit.
- 6) Setelah sterilisasi, biarkan media pada suhu ruang kemudian dituang hingga menutupi permukaan cawan petri.
- 7) Tunggu beberapa saat hingga media mengagar dan balik posisi plate sebelum dibungkus kertas. Labeli dan simpan di lemari pendingin.

h. Pewarnaan Gram

- 1) Buat preparat melingkar diameter 2-3 cm
- 2) Fiksasi diatas api Bunsen hingga kering
- 3) Genangi menggunakan gentian violet selama 3 menit, bilas dengan air mengalir
- 4) Genangi lugol selama 2 menit
- 5) Genangi dengan alcohol 30% hingga warna lugol luntur/ jernih
- 6) Bilas menggunakan air mengalir dan genangi dengan fuchsin selama 1 menit, lalu bilas lagi menggunakan air mengalir dan keringkan.

i. Peremajaan Bakteri

- 1) Siapkan media NA yang sebelumnya telah dibuat.
- 2) Bakteri yang dibiakkan yaitu bakteri *Escherichia coli*. Pembuatan stok bakteri ini menggunakan alat ose bulat, dan selama proses pengerjaannya dilakukan secara aseptis yaitu didekat api bunsen. Pembuatan stok bakteri dilakukan dengan cara mengambil koloni bakteri *E.coli* dengan ose bulat lalu diinokulasikan dengan menggoreskan ose bulat pada permukaan media NA tadi.
- 3) Diinkubasi kedalam inkubator dengan suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

j. Pembuatan media Mc Farland

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

- 1) Diambil larutan $BaCl_2$ sebanyak 0,05 mL lalu masukkan kedalam tabung reaksi.
- 2) Tambahkan larutan H_2SO_4 sebanyak 9,95 mL kemudian dihomogenkan.

k. Pembuatan Suspensi Bakteri

- 1) Bakteri uji diambil dengan menggunakan ose bulat.
- 2) kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCL 0,9% steril dan dihomogenkan sesuai standar *Mc Farland* 0,5 yang ditandai terbentuknya kekeruhan setelah disuspensikan.

l. Pembuatan kontrol Positif (Antibiotik *Chloramphenicol*)

- 1) Sebanyak 0,05 gram *Chloramphenicol* ditimbang pada neraca analitik.
- 2) Dilarutkan dengan aquadest steril sebanyak 10 ml. sehingga diperoleh antibiotik *chloramphenicol* konsentrasi 5%.

m. Pembuatan Simplisia Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana Lamk*)

- 1) Daun bidara disortir terlebih dahulu untuk memisahkan daun yang masih segar dan layu.
- 2) Kemudian dibersihkan di bawah air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel
- 3) Ditiriskan dan dikeringkan dengan oven pada suhu $60^{\circ}C$ selama 4 jam.
- 4) Daun bidara yang telah kering ditimbang bobot kering daun bidara, kemudian dihaluskan menggunakan blender kering dan diperoleh serbuk simplisia.

n. Pembuatan Ekstrak Daun Bidara (Maserasi)

Menurut Farmakope edisi IV, metode Maserasi dapat dimodifikasi menjadi Remaserasi, yaitu

- 1) Ditimbang serbuk simplisia sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam toples maserasi dan ditambahkan 1000 mL etanol 96% (larutan

penyari pertama). Perendaman dilakukan selama 3x24 jam sambil diaduk tiap 6 jam sekali selama 5 menit ditempat yang terlindung dari sinar matahari. Setelah 3 hari disaring untuk memisahkan ampas dan filtratnya, didapatkan filtrat maserat 1.

- 2) Ampas maserat 1 kembali direndam dengan etanol 96% (larutan penyari kedua) sebanyak 1000 mL selama 1x24 jam, disaring kembali dan diperoleh filtrat maserat 2.
- 3) Filtrat maserat 1 dan 2 digabung menghasilkan ekstrak cair. Ekstrak cair etanol daun bidara yang diperoleh diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 60°C selama 1 jam hingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak kental ini kemudian di pekatkan di atas water bath pada suhu 60°C.

o. Pembuatan Seri Konsentrasi Ekstrak Daun Bidara

Konsentrasi ekstrak daun bidara yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Variasi konsentrasi ini digunakan untuk mengetahui konsentrasi paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Masing – masing konsentrasi ditambahkan aquadest hingga volume 10 mL. pembuatan konsentrasi ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana Lamk*) yang digunakan dihitung 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 L*) yaitu :

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

Tabel 1. Volume pengenceran Konsentrasi Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana L*)

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%	10 mL

2. Analitik

- a. Diambil suspensi bakteri yang telah dibuat dan dipipet sebanyak 5 mL kemudian dimasukkan kedalam media Mueller Hinton Agar (MHA) dan diratakan dengan drigle sky.
- b. Dibiarkan 5-10 menit agar biakan dapat terdifusi ke dalam media MHA.

- c. Dichelupkan kertas cakram ke dalam masing-masing seri konsentrasi, kontrol positif dan kontrol negatif menggunakan pinset steril.
- d. Secara aseptis masing-masing kertas cakram diletakkan diatas media MHA yang telah diinokulasi bakteri *Escherichia coli* dengan sedikit ditekan dan diatur jaraknya +15 cm antar kertas cakram agar tidak terjadi overlapping zona hambat yang terbentuk.
- e. Bungkus cawan petri menggunakan kertas, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam.
- f. Diamati ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk pada daerah sekitar kertas cakram dan lakukan pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong.

3. Pasca Analitik

a. Pengamatan Hasil Penelitian

Pengamatan hasil penelitian dilakukan dengan mengamati terbentuknya zona bening (jernih) di sekitar kertas cakram yang telah diinokulasikan dengan bakteri *Escherichia coli*. Terbentuknya zona hambat menunjukkan kemampuan zat antibakteri ekstrak daun bidara dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

b. Pencatatan Hasil Penelitian

Pencatatan hasil penelitian adalah kegiatan mencatat data hasil penelitian dalam bentuk tulisan. Data tersebut diperoleh dari hasil pengukuran atau pengamatan. Pencatatan hasil penelitian dilakukan dengan mengikuti rumus yang telah ditetapkan :

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

Keterangan :

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

c. Pelaporan Hasil Penelitian

Hasil penelitian dilaporkan berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat atau zona jernih di sekitar kertas cakram yang kemudian dijadikan sebagai hasil penelitian.

Hasil penelitian dikatakan efektif jika terbentuk zona bening pada area media, lalu dilakukan pengukuran berdasarkan 3 kategori sebagai berikut:

- 1) Sensitif : ≥ 18 mm
- 2) Intermediate : 13-17 mm
- 3) Resisten : ≤ 12 mm (CLSI 2021).
- 4) Sedangkan dikatakan tidak efektif apabila hasil pengamatan tidak terbentuk zona bening.

d. Dokumentasi Hasil Penelitian

Kegiatan pendokumentasian hasil penelitian dilakukan dengan cara mengambil gambar dari objek yang diteliti, mulai dari tahap pra-analitik hingga pasca analitik.

F. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian ini adalah alat yang digunakan untuk mengumpulkan data untuk mengetahui uraian tentang jenis dan spesifikasi suatu instrumen ataupun suatu alat penelitian. Alat tersebut dapat berupa buku catatan harian atau log book dan alat dokumentasi.

G. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer diperoleh dari hasil pengukuran zona hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana L*) terhadap bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% di Laboratorium Farmasi Jurusan Farmasi Universitas Halu Oleo Kendari.

2. Data Sekunder

Data sekunder dalam penelitian ini diperoleh dari hasil penelitian terdahulu, jurnal serta buku yang berkaitan dengan variabel penelitian.

H. Pengolahan Data

Pengolahan data yang telah 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 menganalisis data dengan cara memberikan kode atau atribut pada data.
3. Mentabulasi (*tabulating*) tabulasi merupakan lanjutan langkah coding untuk mengelompokkan data kedalam suatu data tertentu menurut sifat- sifat yang dimiliki sesuai dengan tujuan penelitian.

I. Analisis Data

Pada penelitian ini analisis data yang digunakan yaitu metode deskriptif berdasarkan kategori efektif, kurang efektif dan tidak efektif ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana Lamk*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

J. Penyajian Data

Data hasil penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel kemudian dijelaskan dalam bentuk narasi sehingga diperoleh hasil analisis uji daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana Lamk*) sebagai antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli*.