

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian *eksperimental* laboratorium dengan desain *one shot case study group*. Dalam desain ini, terdapat dua kelompok, yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Penelitian ini melibatkan perlakuan pada kelompok eksperimen dengan ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Sebagai kontrol positif, digunakan *Ciprofloxacin* dengan kriteria resistensi: ≤ 18 mm dianggap resisten, 19-24 mm dianggap intermediate, dan ≥ 25 mm dianggap sensitif.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat pengambilan sampel

Tempat pengambilan sampel penelitian ini yaitu Desa Aoreo, Kec. Lainea, Kab. Konawe Selatan, Sulawesi Tenggara. Sedangkan biakan murni bakteri *Pseudomonas aureginosa* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Bina Husada Kendari.

2. Tempat Penelitian

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

3. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada 17 Februari s/d 27 juni 2024.

C. Bahan Uji

Dalam penelitian ini, bahan uji yang digunakan adalah :

1. Bakteri *Pseudomonas auregininosa*

Bakteri *Pseudomonas aureginosa* yang dimaksud dalam penelitian ini merupakan biakan murni *Pseudomonas aureginosa* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Bina Husada Kendari.

2. Daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*)

Daun sintrong yang akan digunakan yaitu daun sintrong yang masih segar sebanyak 500 gr yang dikeringkan akan diolah menjadi ekstrak dan dibuatkan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

D. Prosedur Penelitian

1. Pra Analitik

- a. Persiapan Sampel : ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*)
- b. Metode : difusi sumuran
- c. Prinsip

Prinsip metode ini adalah membuat lubang pada agar yang telah diinokulasi dengan bakteri, kemudian larutan diteteskan pada lubang sumuran yang telah dibuat.

- d. Persiapan alat dan bahan pada penelitian ini yaitu mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan dalam proses penelitian dari awal hingga selesai.

1) Alat :

Neraca analitik, autoclave, oven, hot plate, cawan petri, batang pengaduk, gelas ukur, erlenmeyer, inkubator, gelas kimia, pipet ukur, ose jarum, pinset, *driglasky*, rak tabung, tabung reaksi, mistar, spidol, jangka sorong, suman mortar, alu, filler, dan *cork borer* atau silinder cup.

2) Bahan :

Daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) biakan murni *pseudomonas aureginosa*, aquadest, kertas label, kertas saring, kapas, tissue, kertas pH, *Ciprofloxacin*, media *Nutrient Agar* (NA), media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan NaCl, H₂SO₄ 1%, dan larutan BaCl 1%.

e. Sterilisasi Alat Penelitian

Sterilisasi dilakukan pada alat-alat yang terbuat dari bahan gelas atau logam dengan tingkat ketelitian rendah menggunakan oven selama 1 jam pada suhu 180°C. Sementara itu, alat-alat yang terbuat dari plastik

atau kaca dengan tingkat keakuratan tinggi disterilkan menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C.

f. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

1. Timbang sebanyak 2,8 gram media Nutrient Agar (NA).
2. Pindahkan serbuk Nutrient Agar (NA) ke dalam gelas kimia, kemudian tambahkan 140 mL aquadest, lalu transfer ke dalam Erlenmeyer.
3. Homogenkan larutan dengan cara mengaduk dan memanaskannya.
4. Pastikan pelarutan tidak sampai mendidih; larutan harus sepenuhnya larut tanpa adanya kristal yang tersisa.
5. Periksa pH larutan aquadest sesuai dengan petunjuk media.
6. Sterilkan media menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C.
7. Tuangkan media yang telah disterilkan ke dalam cawan petri steril yang telah disiapkan.
8. Biarkan media dalam cawan petri mengeras hingga padat.
9. Setelah padat, masukkan cawan petri ke dalam inkubator pada suhu sekitar 37°C selama kurang lebih 24 jam untuk uji kualitas media, dengan posisi yang baik..

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

Media MHA dipersiapkan dengan menimbang 9,5 g dari bahan tersebut dan memasukkannya ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya, larutan dibuat dengan menambahkan 250 mL aquadest, kemudian dihomogenkan di atas lampu spiritus hingga seluruh komponen media larut sepenuhnya. Setelah larutan media homogen, proses sterilisasi dilakukan menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. Media kemudian dituangkan ke dalam cawan petri (sekitar 20 mL per cawan) atau hingga permukaan plate tertutup, dilakukan dalam kondisi aseptik. Media dibiarkan beberapa saat hingga mengeras di dalam cawan petri. Setelah mengeras, cawan petri dibungkus dengan kertas dalam posisi terbalik, diberi label, dan disimpan di dalam lemari pendingin.

h. Penggunaan antibiotik *Ciprofloxacin* sebagai kontrol positif

Ciprofloxacin 500 mg dibuat dalam konsentrasi 2,5% dengan cara menimbang 0,025 gr *Ciprofloxacin* dan dilarutkan menggunakan aquadest sebanyak 5 mL.

i. Pembuatan standart Mc.Farland

Pembuatan suspensi bakteri dengan metode Mac Farland 0,5 untuk membuat suspensi bakteri dengan cara sebagai berikut:

1. Disiapkan 2 tabung steril yang digunakan untuk suspensi dan standart Mac Farland 0,5
2. Pembuatan standart Mac Farland:
 - a) Campuran antara BaCl 1% : H₂SO₄ disiapkan dengan perbandingan 0,05:9,95.
 - b) BaCl 1% pipet sebanyak 0,05ml kedalam H₂SO₄ 9,95 ml lalu homogenkan.
 - c) Standart Mac Farland 0,5 setara dengan $1,5 \times 10^8$ kerapatan kuman.

j. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan secara aseptis dengan menggunakan ose dan berada di depan api bunsen. Media Nutrient Agar (NA) yang telah disterilkan menggunakan autoclave dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak sekitar 5 mL, lalu dimiringkan hingga mengeras. Selanjutnya, satu ose dari kultur murni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diambil dan diinokulasikan ke media NA miring dengan metode gores (Streak Plate). Proses ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk mendapatkan bakteri murni.

k. Pembuatan suspensi bakteri

Ambil koloni bakteri menggunakan ose dan suspensikan ke dalam tabung yang berisi 9 mL NaCl 0,9%. Kemudian, homogenisasikan campuran tersebut.

l. Pembuatan Ekstrak Daun Sintrong (*Crassocephalum crepidioides*)

1. Daun sintrong dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, kemudian dikeringkan dan dijemur di bawah sinar matahari hingga benar-benar kering.
2. Daun sintrong yang sudah kering ditimbang sebanyak 500 gram, lalu diblender hingga menjadi serbuk halus.
3. Selanjutnya, dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi. Serbuk daun sintrong dimasukkan ke dalam maserator dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 100 mL. Pada 6 jam pertama, campuran diaduk, kemudian dibiarkan selama 3 x 24 jam untuk memperoleh maserat dari proses perendaman.
4. Proses berikutnya adalah penguapan, yang bertujuan untuk memisahkan ekstrak dari larutan perendaman. Proses ini dilakukan selama 1 x 24 jam hingga diperoleh ekstrak yang kental.
5. Setelah ekstrak daun sintrong diperoleh, ekstrak tersebut ditampung dalam beaker glass steril dan ditutup.
6. Ekstrak daun sintrong kemudian dibuat dalam beberapa konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

m. Pembuatan konsentrasi

Ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) dibuat dengan lima konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, di mana setiap konsentrasi memiliki volume total 10 mL. Sari daun jambu biji yang diambil kemudian dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Rumus Pengenceran} = \% = \frac{b}{v} \times 100$$

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 sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) yaitu :

- 1) Konsentrasi 20% dibuat dengan 0,2 gram ekstrak daun sintrong kemudian ditambahkan 0,8 mL aquadest lalu dihomogenisasi
- 2) Konsentrasi 40% dibuat dengan 0,4 gram ekstrak daun sintrong kemudian ditambahkan 0,6 mL aquadest lalu dihomogenisasi
- 3) Konsentrasi 60% dibuat dengan 0,6 gram ekstrak daun sintrong kemudian ditambahkan 0,4 mL aquadest lalu dihomogenisasi
- 4) Konsentrasi 80% dibuat dengan 0,8 mL ekstrak daun sintrong kemudian ditambahkan 0,2 mL aquadest lalu dihomogenisasi
- 5) Konsentrasi 100% dibuat dengan 1 gram ekstrak daun sintrong lalu dihomogenisasi.

Tabel 1. Perbandingan Volume Konsentrasi Ekstrak Daun Sintrong dalam 1 Gram

No	Konsentrasi	Volume ekstrak	Volume Aquadest
1	20%	0,2 gram	0,8 mL
2	40%	0,4 gram	0,6 mL
3	60%	0,6 gram	0,4 mL
4	80%	0,8 gram	0,2 mL
5	100%	1 gram	0 mL

2. Analitik

1. Siapkan kultur bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Buat suspensi bakteri dengan mengikuti prosedur yang ada, lalu bandingkan kekeruhannya dengan standar MacFarland 0,5.
3. Tambahkan 0,1 mL suspensi bakteri ke media Mueller Hinton Agar (MHA) dan ratakan menggunakan spreader.
4. Buat sumuran yang telah disterilkan pada permukaan media MHA dengan jarak sekitar 9,5 mm di antara sumuran.
5. Masukkan 100 mikroliter ekstrak daun sintrong ke setiap sumuran yang telah dibuat, dengan konsentrasi ekstrak 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, termasuk pengulangannya.

6. Setelah ekstrak dimasukkan ke dalam sumuran, tunggu selama 10 menit agar ekstrak dapat difusi ke dalam media.
7. Lakukan kontrol positif dan negatif:
 - a. Kontrol positif: media Mueller Hinton Agar dengan Ciprofloxacin.
 - b. Kontrol negatif: media Mueller Hinton Agar dengan aquadest.
 - 1) Bungkus cawan petri menggunakan kertas, lakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 1x24 jam
 - 2) Amati ada tidaknya zona bening pada daerah sekitar *sumuran*.

8. Pasca Analitik

a. Pencatatan hasil penelitian

Pencatatan hasil penelitian adalah proses mendokumentasikan hasil penelitian dalam bentuk tulisan, baik yang ditulis tangan atau diketik, serta dalam bentuk grafik atau gambar dari pengukuran dan pengamatan yang telah dilakukan. Berikut adalah rumus untuk pencatatan hasil penelitian: Berikut rumus pencatatan hasil penelitian yaitu :

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

Ketersangan :

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

b. Pengolahan data hasil penelitian

Hasil penelitian dikatakan efektif jika terbentuk zona hambat dengan tiga kategori, yaitu :

- 1) Zona hambat dalam batas *resisten* : ≤ 18 mm
- 2) Zona hambat dalam batas *intermediate* : 19-24mm
- 3) Zona hambat dalam batas *sensitif* : ≥ 25 mm

Hasil penelitian dikategorikan tidak efektif jika tidak terbentuk zona hambat.

c. Dokumentasi hasil penelitian

Dokumentasi hasil penelitian melibatkan proses mengambil foto dari hasil pengamatan, pengukuran, pengambilan sampel, dan aspek terkait lainnya dalam kegiatan penelitian, yang mencakup tahap pra-analitik, analitik, dan pasca-analitik.

d. Pelaporan hasil penelitian

Pelaporan hasil penelitian adalah proses menyusun laporan mengenai hasil penelitian setelah melakukan pengamatan dan pengukuran. Hasil penelitian harus dilaporkan berdasarkan data yang diperoleh dari pengukuran dan pengamatan.

Kriteria efektivitas laporan adalah sebagai berikut:

- a) Efektif (+): Jika terlihat zona hambat di sekitar sumuran.
- b) Tidak efektif: Jika tidak terdapat zona hambat di sekitar sumuran.

E. Prosedur Pengumpulan Data

Pengumpulan data sangat penting dilakukan karena berhubungan langsung dengan informasi yang akan diperoleh selama proses penelitian. Data yang digunakan dapat berasal dari jurnal atau buku penelitian yang telah diterbitkan sebelumnya.

F. Instrument Penelitian

Instrumen penelitian mencakup uraian mengenai jenis, spesifikasi, dan detail dari alat atau media yang akan digunakan dalam pengumpulan data, yaitu:

1. Logbook: Buku catatan harian yang digunakan untuk mencatat laporan dan perkembangan penelitian secara rutin.
2. Lembar Hasil Pengamatan: Formulir atau dokumen yang digunakan untuk mencatat hasil pengamatan selama proses penelitian.

G. Jenis Data

1. Data primer

Data primer adalah penelitian ini merupakan data yang didapati langsung melalui hasil penelitian uji daya hambat ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Data sekunder

Data sekunder dalam penelitian ini merupakan data yang dikumpulkan dari buku, jurnal dan penelitian-penelitian terdahulu yang dipublikasikan kemudian dijadikan landasan teoritis.

H. Pengolahan Data

Data yang diperoleh akan di proses dengan beberapa tahapan sebagai berikut:

1. *Editing* (pemeriksaan data), merupakan pengecekan atau pemeriksaan kelengkapan dan konsistensi data yang telah dikumpulkan.
2. *Coding* (pengkodean data), merupakan kegiatan memberikan identitas pada data sehingga memudahkan dalam menganalisis data
3. *Tabulating* (mentabulating), merupakan pengelompokan data dalam bentuk tabel atas sifat-sifat yang sebanding dengan tujuan penelitian.

I. Analisis Data

Dalam penelitian ini akan dianalisis dengan metode deskriptif berdasarkan kategori zona hambat yaitu resisten berdasarkan kategori zona hambat yaitu *resisten* ≤ 18 mm, *intermediate* 19-24 mm, dan *sensitive* ≥ 25 mm.

J. Penyajian Data

Penyajian data pada penelitian ini akan disajikan dalam bentuk gambar dan tabel, yang selanjutnya akan dinarasikan.

K. Etika penelitian

Etika penelitian adalah suatu pedoman etika yang berlaku untuk setiap kegiatan penelitian yang melibatkan pihak peneliti dengan pihak yang diteliti dan masyarakat yang akan memperoleh dampak hasil penelitian tersebut. pengambilan data dapat diambil dengan etika sebagai berikut.

1. Anonymity (tanpa nama)

Dilakukan dengan cara tidak memberikan nama responden pada lembar data, dan hanya memberikan kode pada lembar pengambilan data.

2. *Informed Consent* (lembar persetujuan)

Lembar persetujuan diberikan pada responden yang akan diteliti yang memenuhi kriteria inklusi. bila subjek menolak, maka peneliti tidak memaksa dan tetap menghormati hak-hak subjek.

3. *Confidentiality* (kerahasiaan)

Menjamin kerahasiaan hasil penelitian baik informasi maupun masalah-masalah lainnya. informasi yang dikumpulkan dijamin kerahasiaannya oleh peneliti, hanya kelompok dan data tertentu yang akan dilaporkan pada hasil pemeriksaan