

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Dalam penelitian ini, jenis penelitian yang digunakan adalah *eksperimental laboratory* menggunakan desain penelitian *One shoot case study* dengan pendekatan pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus sp.*

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

1. Tempat Pengambilan Sampel

Tempat pengambilan sampel daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*), yaitu di Kecamatan Anggaberri, Kelurahan Anggaberri, Kabupaten Konawe, Sulawesi Tenggara. Kriteria sampel daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) yang akan diambil merupakan daun sintrong yang sudah tua dan masih segar sebanyak satu karung dengan warna daun hijau tua, permukaan atas licin, ujung daun runcing dan memiliki diameter panjang daun sekitar 8-15 cm dengan lebar 3-4cm.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan 17 Februari – 27 Juni 2024.

3. Lokasi Penelitian

Pada penelitian ini, telah dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Bina Husada Kendari.

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek

Subjek penelitian ini adalah daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*).

2. Objek

Objek dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang sudah tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Teknologi Laboratorium Medis Bina Husada Kendari.

D. Bahan Uji Penelitian

Pada penelitian ini, bahan uji yang digunakan adalah daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) yang diambil di Kecamatan Anggaberu, Kelurahan Anggaberu, Kabupaten Konawe, Sulawesi Tenggara. Daun sintrong digunakan sebanyak 500 gram kemudian diolah menjadi ekstrak daun sintrong dan dibuatkan 5 macam perlakuan dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

E. Prosedur Pengumpulan Data

Pengumpulan data berdasarkan dari data jurnal penelitian terdahulu dan literatur yang mendukung penelitian ini. Data yang diperoleh dari hasil penelitian akan diolah, dihitung dan dicatat.

F. Prosedur Penelitian

1. Pra Analitik

- 1) Sampel: Daun Sintrong Segar
- 2) Metode : Difusi (*Kirby Bauer*)
- 3) Prinsip kerja : Terdifusinya senyawa antimikroba kedalam media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji.
- 4) Alat dan Bahan :
 1. Pra Analitik
 - a. Alat :
 - 1) Kertas label
 - 2) Alat tulis
 - 3) Mikropipet
 - 4) Oven
 - 5) Cawan petri
 - 6) Cawan porselin
 - 7) Rak tabung
 - 8) Tabung reaksi
 - 9) Spatula
 - 10) *Incubator*
 - 11) *Beakergelass*

- 12) Blender/mortar
- 13) *Rotary evaporator*
- 14) Sendok tanduk
- 15) Gelas kimia
- 16) Gelas ukur
- 17) Batang pengaduk
- 18) *Erlenmeyer*
- 19) Ose bulat
- 20) Neraca analitik
- 21) *Autoclave*
- 22) Tisu
- 23) Pipet ukur
- 24) *Driglesky*
- 25) Korek
- 26) Bunsen
- 27) Pinset
- 28) Aluminiumfoil

b. Bahan :

- 1) Aquades steril
- 2) Etanol 96%
- 3) Biakan murni bakteri *Streptococcus mutans*
- 4) Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- 5) Ekstrak daun sintrong
- 6) *Antibiotic Azithromicyn* 0,025 gram
- 7) Kertas cakram (*paper disc*)
- 8) NaCL 0,9%
- 9) Tip kuning
- 10) Tip biru

c. Sterilisasi alat dan bahan

Alat-alat yang terbuat dari kaca atau yang mengandung kaca harus dibersihkan, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas HVS sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama lima belas menit. Setelah autoklaf selesai, alat harus didinginkan dan disimpan di tempat yang telah ditentukan.

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

Setelah mengumpulkan peralatan dan perlengkapan yang diperlukan, timbanglah media dengan menggunakan rumus berikut ini: Gram MHA: $(38 \text{ gram} \times 250 \text{ ml})/1000 \text{ ml} = 9,5 \text{ gram}$; MHA 38 gram/liter atau 2000 ml. Selanjutnya, serbuk media MHA yang telah ditimbang dipanaskan di atas hot plate sambil diaduk hingga larut sempurna, hati-hati jangan sampai mendidih, di dalam labu *Erlenmeyer* yang berisi 250 cc akuades. Selanjutnya, bungkus aluminium foil dan kapas di sekeliling labu *Erlenmeyer*. Setelah itu, labu tersebut diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C untuk mendisinfeksi.

e. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Media *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 2,8 gram ditimbang, ditambahkan ke dalam labu *Erlenmeyer*, dilarutkan dalam 100 mililiter air suling, lalu ditutup dengan kapas. Selanjutnya, letakkan media NA di atas pengaduk magnetik yang dipanaskan dan gunakan batang pengaduk untuk mengaduk hingga bubuk larut sepenuhnya. Media diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C untuk mensterilkannya.

f. Pewarnaan Bakteri *Streptococcus mutans*

1. Siapkan objek glass dan sterilkan ose dengan pemijaran, kemudian dinginkan.
2. Teteskan NaCl 0,9% pada objek glass, lalu ambil satu ose steril bakteri *Streptococcus mutans* dan sebarkan setipis mungkin hingga membentuk lingkaran.

3. Fiksasi preparat dengan melewati di atas api Bunsen hingga kering.
 4. Genangi preparat dengan gentian violet selama 3 menit, kemudian bilas dengan air mengalir.
 5. Genangi dengan lugol selama 2 menit, kemudian bilas dengan air mengalir.
 6. Genangi dengan alcohol aseton hingga jernih, lalu bilas kembali dengan air mengalir.
 7. Genangi dengan safranin selama 1 menit, kemudian bilas dengan air mengalir.
 8. Keringakan dan periksa di mikroskop dengan perbesaran 100x
- g. Peremajaan Bakteri

Di dalam tabung reaksi dengan media NA miring, peremajaan bakteri dilakukan. Setelah itu, pemanas Bunsen digunakan untuk mendisinfeksi jarum ose, dan didiamkan selama beberapa waktu. Selanjutnya, satu ose cuplik dikeluarkan dari cawan inokulasi bakteri dan diletakkan di atas permukaan media NA miring dengan menggunakan goresan zig-zag. Selanjutnya, gunakan goresan zig-zag untuk menggores permukaan media NA miring untuk mendorong pertumbuhan bakteri di sana. Setelah itu, inokulasikan selama satu hari penuh pada suhu 37 °C. Tujuan dari inkubasi adalah untuk mempersiapkan lingkungan pada suhu yang ideal untuk perkembangan bakteri sehingga dapat memastikan apakah bakteri tumbuh sebagaimana mestinya.

- h. Pembuatan Suspensi

Dengan menggunakan kawat ose, kultur bakteri diperoleh. Kemudian disuspensikan dalam 5 ml NaCl 0,9 dalam tabung rekonstitusi steril dan dihomogenisasi sesuai dengan standar *Mc*.

Farland 0.5, yang ditunjukkan dengan munculnya kekeruhan setelah suspensi.

i. Pembuatan *antibiotic Azithromycin* (Kontrol positif)

Azithromycin 250 mg dibuat 5% dengan menimbang 0,025 gram. Kemudian larutkan dengan aquades steril sebanyak 9 ml.

j. Pembuatan Ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*)

Setelah digiling menjadi bubuk dengan menggunakan blender, berat daun sintrong dapat mencapai 500 gram dengan menggunakan timbangan analitik. Setelah menyaring fitat daun sintrong, 600 ml etanol 96% direndam dengan serbuk daun sintrong sebanyak tiga kali dalam jangka waktu 24 jam. Setiap enam jam, aduk selama lima menit. Setelah 3 x 24 jam, saring dengan menggunakan corong untuk memisahkan ampas dan fitat untuk menghasilkan ekstrak kental.

k. Pembuatan Konsentrasi Daun Sintrong

1. Membuat konsentrasi 20% sebanyak 0,2 gr ekstrak daun sintrong ditimbang dan ditambahkan 8 ml pelarut aquades.
2. Membuat konsentrasi 40% sebanyak 0,4 gr ekstrak daun sintrong ditimbang dan ditambahkan 6 ml pelarut aquades.
3. Membuat konsentrasi 60% sebanyak 0,6 gr ekstrak daun sintrong ditimbang dan ditambahkan 4 ml pelarut aquades.
4. Membuat konsentrasi 80% sebanyak 0,8 gr ekstrak daun sintrong ditimbang dan ditambahkan 2 ml pelarut aquades.
5. Membuat konsentrasi 100% sebanyak 1 gr ekstrak daun sintrong ditimbang dan tidak ditambahkan pelarut aquades.

Tabel 2. Bagan Pembuatan Konsentrasi Daun Sintrong

No.	konsentrasi (%)	Massa Ekstrak Daun Sintrong	Pelarut Aquades
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	-

2. Analitik

- 1) Siapkan alat dan bahan.
- 2) Beri label dicawan petri pada daerah masing-masing.
- 3) Suspensi bakteri *Streptococcus mutans* yang telah dibuat diambil sebanyak 0,1 ml kemudia disebar diatas permukaan media MHA dengan menggunakan *driglasky* spatula.
- 4) Media yang sudah diinokulasi bakteri dibiarkan dan disimpan selama 5-15 menit yang bertujuan agar suspensi bakteri dapat meresap kedalam media.
- 5) Celupkan masing-masing paper disc pada ekstrak daun sintrong pada masing-masing konsentrasi 20%, 4-%, 60% 80% dan 100%.
- 6) Letakkan *paper disc* dengan pinset steril, atur jarak masing-masing *paper disc*.
- 7) Bungkus cawan petri dengan menggunakan kertas, kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam.
- 8) Amati ada tidaknya zona hambat/zona bening pada daerah sekitar *paper disc*.

3. Pasca Analitik

a. Pencatatan Hasil Penelitian

Hasil penelitian ditangkap melalui proses perekaman suatu kegiatan dalam bentuk grafik atau visual yang menggambarkan hasil pengukuran atau pengamatan.

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

Keterangan:

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

Diameter zona hambat dianalisis secara deskriptif

berdasarkan hambat antibiotik *Azithromycin*:

- *Resisten* : ≤ 13 mm
- *Internediete* : 14 -17 mm
- *Sensitive* : ≥ 18 mm

b. Dokumentasi Hasil Penelitian

Proses pengambilan data berupa gambar atau foto hasil pengukuran, pengamatan, pengambilan sampel, dan temuan-temuan lain yang berhubungan dengan temuan penelitian yang dimulai dari pra-analisis dan pasca-analisis.

G. Intrumen Penelitian

Dalam penelitian ini, instrument yang digunakan adalah buku harian, pulpen, kamera dan lembar hasil pengamatan yang digunakan saat melakukan penelitian.

H. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer berasal dari uji daya hambat daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) terhadap bakteri *Streptococcus sp* yang diikubasi selama 24 jam pada setiap konsentrasi ekstrak daun sintrong. Data dicatat dalam bentuk table.

2. Data Sekunder

Data sekunder pada penelitian ini adalah data yang diperoleh dari literatur perpustakaan, hasil penelitian terdahulu dan jurnal internasional.

I. Pengolahan Data

Pengolahan data dilakukan dengan cara sebagai cara berikut.

- 1) *Editing*: Pemeriksaan data bertujuan untuk memperoleh data-data dari pengukuran yang telah di teliti yaitu pemeriksaan kelengkapan dan konsentrasi yang tersedia.
- 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 table agar mudah untuk di analisis.

J. Analisis Data

Analisis data ditentukan dari hasil penelitian dengan menggunakan rumus zona hambat. Adapun rumus zona hambat adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

K. Penyajian

Data yang telah dianalisis disajikan dalam bentuk table dan kemudian dijelaskan dalam bentuk narasi sehingga diperoleh hasil analisis uji daya hambat ekstrak daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) terhadap bakteri *Streptococcus sp.*