

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian *experimental laboratory* dengan menggunakan desain *one-shoot case study*, yaitu desain penelitian yang dilakukan dengan memberikan perlakuan terhadap variabel independen yang diikuti dengan pengamatan terhadap variabel dependen.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Universitas Halu Oleo Kendari.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 7 - 30 Juni 2024.

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek penelitian yaitu ekstrak daun bidara.

2. Objek penelitian yaitu menggunakan bakteri biakan murni *Pseudomonas* yang tersedia di Laboratorium Farmasi Universitas Halu Oleo Kendari.

D. Bahan Uji

Penelitian ini menggunakan daun bidara (*Ziziphus mauritiana*). Daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) yang digunakan yaitu daun bidara tua yang diperoleh di Anduonohu, Kecamatan Poasia, Kota Kendari, Sulawesi Tenggara, kemudian dikeringkan dengan oven. Pembuatan larutan uji dilakukan dengan proses ekstraksi yaitu maserasi menggunakan pelarut etanol 96% pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% yang kemudian diuji daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap bakteri *Pseudomonas*.

E. Prosedur Pengumpulan Data

Pada penelitian ini, data yang dikumpulkan berasal dari kajian penelitian sebelumnya dan literatur pendukung lainnya.

F. Prosedur Kerja

1. Pra Analitik

- a. Sampel : Daun bidara tua (*Ziziphus mauritiana*).
- b. Metode : Difusi Agar *Kirby-Bauer*
- c. Prinsip : Metode cakram yang berisi agen mikroba diletakkan diatas media agar yang telah ditanami mikroorganisme, kemudian berdifusinya pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan oleh agen mikroba pada permukaan agar.
- d. Persiapan sampel : daun bidara tua yang telah diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%
- e. Persiapan Alat dan Bahan

Pada penelitian ini, alat dan bahan yang digunakan sebagai berikut:

1) Alat

- | | |
|---------------------|-----------------------------|
| a. <i>Hot plate</i> | m. Batang pengaduk |
| b. Spiritus | n. Spatula |
| c. Mortar dan alu | o. Sendok tanduk |
| d. <i>Autoclave</i> | p. Gelas ukur |
| e. Gelas Kimia | q. Cawan porselin |
| f. Tabung reaksi | r. Erlenmeyer |
| g. Oven | s. Inkubator |
| h. Pinset | t. Kain kasa |
| i. Drigalski | u. Ose |
| j. Cawan petri | v. Neraca |
| k. Jangka sorong | w. Mikro pipet |
| l. Blender | x. <i>Rotary evaporator</i> |

- 2) Bahan
 - a. Aquades steril
 - b. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
 - c. Media *Nutrient Agar* (NA)
 - d. Ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*)
 - e. Etanol 96%
 - f. Antibiotik *clindamycin* 300 mg
 - g. Biakan bakteri *Pseudomonas*
 - h. NaCl fisiologis
 - i. Aluminium foil
 - j. Kertas cakram
 - k. Kapas
 - l. Kertas label
- f. Sterilisasi Alat dan Bahan
 - 1) Alat yang tahan terhadap suhu tinggi di *autoclave* pada suhu 121°C selama ± 1 jam.
 - 2) Alat yang tidak tahan suhu tinggi direndam dalam etanol 96%.
 - 3) Alat-alat yang mengandung logam disterilkan dengan cara dipanaskan langsung dengan bunsen.
- g. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)
 - 1) Media NA ditimbang sebanyak 5,6 gram.
 - 2) Serbuk media NA yang sudah ditimbang dipindahkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan 150 ml aquades, lalu diaduk.
 - 3) Larutan dihomogenkan dengan bantuan pemanasan, jangan sampai mendidih.
 - 4) Standarisasi hingga pH 7.
 - 5) Media disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - 6) Media yang telah steril dituang dalam masing-masing cawan petri steril secara aseptik (dibelakang lampu spiritus).

h. Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- 2) Media MHA yang akan digunakan dihitung dengan rumus sebagai berikut: MHA 38 *gram/liter*, atau 300 *ml*

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

- 3) MHA ditimbang sebanyak 11,4 *gram*
- 4) MHA yang ditimbang dilarutkan dalam labu erlenmeyer dengan 250 *ml* aquades.
- 5) Kemudian dipanaskan diatas *hot plate* sambil diaduk hingga larut sempurna.
- 6) Standarisasi hingga *pH* 7.
- 7) Lalu tutup labu erlenmeyer dengan menggunakan kapas dan aluminium foil.
- 8) Selanjutnya disterilisasi dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 *atm*.
- 9) Media yang telah steril, dituang sebanyak 25 *ml* ke dalam cawan petri hingga permukaan cawan petri tertutup dengan media agar.
- 10) Selanjutnya media agar ditutup menggunakan *cling wrap* agar tidak terkontaminasi dan didiamkan hingga mengeras.

i. Pembuatan Media *McFarland*

- 1) Masukkan Barium klorida ($BaCl_2$) 0,1 *gram* kedalam 100 *ml* aquades dan homogenkan.
- 2) Masukkan larutan Asam sulfat (H_2SO_4) 1,1 *ml* kedalam 50 *ml* aquades dan homogenkan.
- 3) Campurkan kedua larutan yang telah dibuat dengan perbandingan 0,05 *ml* $BaCl_2$ dan 9,95 *ml* H_2SO_4 lalu dihomogenkan.

j. Pewarnaan Gram

- 1) Fiksasi objek *glass* dan ose yang akan digunakan diatas api spiritus.

- 2) Teteskan *NaCl* 0,9% diatas objek *glass*, kemudian oleskan sedikit bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada *NaCl* 0,9% hingga merata dan fiksasi preparat diatas api spirtus 2 – 3 kali.
 - 3) Genangi preparat dengan larutan gentian violet selama 1 *menit*, lalu bilas dengan air mengalir.
 - 4) Genangi preparat dengan larutan lugol selama 1 *menit*, lalu bilas dengan air mengalir.
 - 5) Bilas dengan larutan alkohol sampai warna tidak tampak, lalu bilas dengan air mengalir.
 - 6) Genangi preparat dengan larutan safranin selama 30 *detik*, lalu bilas dengan air mengalir.
 - 7) Amati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali menggunakan oil imersi.
- k. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji
- 1) Biakan bakteri diambil menggunakan kawat ose.
 - 2) Kemudian disuspensikan dalam 5 *ml* *NaCl* 0,9% dalam tabung reaksi steril dan dihomogenkan sesuai standar *McFerland* 0,5 yang ditandai dengan terbentuknya kekeruhan setelah suspensi.
- l. Pembuatan Antibiotik *Clindamycin* (kontrol positif)
- 1) *Clindamycin* 300 *mg* dibuat dengan konsentrasi 5%.
 - 2) Timbang 0,3 *gram* *clindamycin*.
 - 3) Kemudian larutkan dengan aquades sebanyak 5 *ml*.
- m. Pembuatan Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana*)
- 1) Daun bidara tua dan tidak berjamur dicuci menggunakan air bersih mengalir.
 - 2) Setelah itu, dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 4 jam.
 - 3) Setelah kering, daun bidara dihaluskan menggunakan blender sehingga menghasilkan serbuk.

- 3) Konsentrasi 60% sebanyak 6 ml ekstrak daun bidara ditambah 4 ml aquades.
- 4) Konsentrasi 80% sebanyak 8 ml ekstrak daun bidara ditambah 2 ml aquades.
- 5) Konsentrasi 100% sebanyak 10 ml ekstrak daun bidara tanpa penambahan aquades.

Rumus pengenceran :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

Keterangan :

V_1 : volume larutan stok

M_1 : konsentrasi larutan stok

V_2 : volume larutan perlakuan

M_2 : konsentrasi larutan yang diinginkan

2. Analitik

- a. Persiapkan alat dan bahan.
- b. Media MHA dituang kedalam cawan petri yang sudah disiapkan tunggu hingga memadat
- c. Bakteri diencerkan dengan mencampurkan 1 dosis suspensi *Pseudomonas* ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9% dan di standarisasi hingga konsentrasi 0,5 McFarland.
- d. Media MHA ditambahkan 0,1 ml suspensi bakteri dan diratakan dengan menggunakan *drigel sky*.
- e. *Paper disk* dicelupkan pada ekstrak daun bidara selama 10 menit pada masing-masing konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.
- f. Kemudian, dibuat kontrol positif menggunakan *paper disk* yang dicelupkan kedalam *clindamycin* dan ditanam diatas permukaan media.
- g. Di inkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 1 × 24 jam.
- h. Setelah 1 × 24 jam, amati dan ukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar *paper disk* dengan menggunakan jangka sorong.

3. Pasca Analitik

- a. Efektif jika diperoleh daerah zona hambat sensitifitas ($\geq 15 \text{ mm}$).
- b. Tidak efektif bila tidak terdapat zona hambat.

G. Instrumen Penelitian

Penelitian ini menggunakan instrumen penelitian *logbook* (buku harian penelitian), alat tulis, kamera dan lembar hasil pengamatan yang digunakan pada saat melakukan penelitian.

H. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer berasal dari uji daya hambat ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap bakteri *Pseudomonas* yang di inkubasi selama 24 jam dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Data disajikan dalam bentuk tabel.

2. Data Sekunder

Data sekunder berasal dari literatur penelitian sebelumnya dan dari pihak terkait dengan subjek penelitian.

I. Pengolahan Data

Penggolongan data dilakukan sebagai berikut:

1. *Editing* (pemeriksaan data)

Pemeriksaan data yaitu untuk memperoleh data dari pengukuran yang telah diteliti. Untuk memeriksa ketepatan dan kelengkapan data yang telah dikumpulkan, sehingga tidak ada kesalahan data.

2. Penyusunan data (*Tabulating*)

Penyajian data sesuai dengan tujuan penelitian yang dilakukan, data disajikan dalam bentuk tabel sehingga lebih mudah untuk di analisis.

J. Analisa Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini yaitu analisis deskriptif berdasarkan kategori efektif atau tidak efektif ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas*. Untuk memperoleh data hasil akhir penelitian, dianalisis dengan menggunakan rumus zona hambat yaitu:

Rumus pengukuran diameter zona hambat

$$\frac{(D_v - D_c) + (D_h - D_c)}{2}$$

Keterangan:

D_v : Diameter vertikal

D_c : Diameter cakram

D_h : Diameter horizontal

K. Penyajian Data

Data yang telah diperoleh dari hasil penelitian disajikan dalam bentuk gambar dan tabel, selanjutnya dideskripsikan.