

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

##### 3.1.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *Quasi eksperimental* yaitu penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh dari ekstrak daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) yang diberi perlakuan terhadap variabel yang akan diteliti yaitu zona hambat bakteri *S.dysentriae*. Cara mengetahuinya yaitu membandingkan satu atau lebih kelompok yang diberi perlakuan dengan satu kelompok pembanding yang tidak diberi perlakuan.

##### 3.1.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Posstest Only Control* yang berarti penelitian ini dilakukan untuk melihat bagaimana zona hambat pertumbuhan bakteri *S.dysentriae* setelah diberi perlakuan ekstrak daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) yang diberi perlakuan dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% yang kemudian dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif.

#### 3.2 Jumlah Pengulangan

Jumlah masing-masing perlakuan dihitung menggunakan Rumus *Federar* sebagai berikut.

**Rumus Federer:**

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$6(r-1) \geq 15$$

$$6r - 6 \geq 15$$

$$6r \geq 15 + 6$$

$$r \geq 2\frac{1}{6}$$

$$r \geq 3,5$$

$$r \geq 4$$

**Keterangan :**

$r$  = Jumlah replikasi atau pengulangan (*Replication*).

$t$  = Jumlah perlakuan (*Treatment*).

15 = Derajat kebebasan umum

**Tabel 3.1 Desain Penelitian**

K+	K-	P1	P2	P3	P4
<b>K(+). 1</b>	<b>K(-). 1</b>	<b>P1. 1</b>	<b>P2. 1</b>	<b>P3. 1</b>	<b>P4. 1</b>
<b>K(+). 2</b>	<b>K(-). 2</b>	<b>P1. 2</b>	<b>P2. 2</b>	<b>P3. 2</b>	<b>P4. 2</b>
<b>K(+). 3</b>	<b>K(-). 3</b>	<b>P1. 3</b>	<b>P2. 3</b>	<b>P3. 3</b>	<b>P4. 3</b>
<b>K(+). 4</b>	<b>K(-). 4</b>	<b>P1. 4</b>	<b>P2. 4</b>	<b>P3. 4</b>	<b>P4. 4</b>

Keterangan :

K(+) Kontrol positif = Ciprofloxacin

K(-) Kontrol negatif = Aquadest steril

P1 (Perlakuan 1) = Ekstrak daun dadap serep konsentrasi 25% P2

(Perlakuan 2) = Ekstrak daun dadap serep konsentrasi 50% P3

(Perlakuan 3) = Ekstrak daun dadap serep konsentrasi 75% P4

(Perlakuan 4) = Ekstrak daun dadap serep konsentrasi 100%

Dalam penelitian ini digunakan 4 konsentrasi ekstrak daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) dan 2 kontrol pembanding yaitu Ciprofloxacin sebagai kontrol positif dan aquadest sebagai kontrol negatif. Berdasarkan jumlah perlakuan yang dibuat maka dapat dirumuskan dengan rumus Federar untuk jumlah pengulangan yang akan digunakan adalah sebanyak 4 kali.

### 3.3 Variabel dan Definisi Operasional

#### 3.3.1 Variabel Penelitian

##### a. Variabel Terikat (Variabel *Dependent*)

Variabel terikat atau variabel yang diukur dalam penelitian ini adalah zona hambat *S.dysenteriae*.

##### b. Variabel Bebas (Variabel *Independent*)

Variabel bebas atau variabel lain yang dapat diubah sehingga mempengaruhi objek yang diukur dalam penelitian ini adalah ekstrak daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%.

### 3.3.2 Definisi Operasional

**Tabel 3. 2 Variabel dan Definisi Operasional**

No.	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Data
1.	Zona hambat bakteri <i>S.dysentriae</i>	Koloni bakteri <i>S.dysentriae</i> yang berbentuk bulat kecil, dengan elevasi cembung dan berwarna putih atau bening serta ditandai dengan ada tidaknya zona bening atau zona hambat,	Jangka sorong	Milimeter (mm)	Rasio
2.	Ekstrak daun dadap serep ( <i>Erythrina variegata</i> L.)	Ekstrak daun dadap serep ( <i>Erythrina variegata</i> L.) dengan hasil cairan pekat yang telah diekstraksi menggunakan etanol sebagai pelarut.	Mikro-pipet	Konsentrasi ekstrak (%)	Rasio

### 3.4 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri murni *S.aureus*, daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.), *Mueller Hinton Agar* (MHA) *Salmonella Shigella Agar* (SSA), etanol 96%, *Nutrient Agar* (NA), NaCl 0,9%, NaCl 10%, aquadest, antibiotik Kloramfenikol, larutan BaCl, larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kloroform, HCl 2N,

serbuk magnesium,  $\text{FeCl}_3$ , reagen Mayer, reagen Dragendorf, reagen Wagner, asam klorida 2N, basa ammonia 1%, gentian *violet*, logul, alcohol 96%, safranin, *oil imersi*.

### **3.5 Instrumen Penelitian**

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, *hot plate*, ose steril, kertas cakram (*paper disk*), inkubator, oven, *autoclave*, mikroskop, erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung, jangka sorong, neraca analitik, lampu spiritus, pinset, *magnetic stirrer*, batang pengaduk, objek *glass*, rak pewarnaan, penjepit tabung, mikropipet, kertas saring, *rotary evaporator*, *water bath*, bejana, cawan steril, pipet volume, pump pipet, kapas steril, kertas koran.

### **3.6 Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### **3.6.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Bahan Alam Universitas Borneo Lestari Banjarbaru.

#### **3.6.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2024.

### **3.7 Prosedur Pengambilan Data**

#### **3.7.1 Izin Penelitian**

##### **A. Izin Determinasi**

Peneliti meminta surat izin kepada prodi Diploma III Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan dan Sains Teknologi

Universitas Borneo Lestari untuk melakukan uji determinasi di Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat.

#### **B. Izin Pembelian Isolat Bakteri Murni**

Peneliti meminta surat izin kepada prodi Diploma III Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan dan Sains Teknologi Universitas Borneo Lestari untuk melakukan pembelian isolat bakteri murni *S.dysentriae* di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Indonesia, Jawa Barat.

#### **C. Izin Menggunakan Laboratorium**

Peneliti meminta surat izin kepada prodi Diploma III Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan dan Sains Teknologi Universitas Borneo Lestari untuk melakukan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Bahan Alam Universitas Borneo Lestari.

#### **D. Izin Peminjaman Alat Laboratorium**

Peneliti meminta surat izin kepada prodi Diploma III Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan dan Sains Teknologi Universitas Borneo Lestari untuk melakukan peminjaman alat laboratorium yang akan digunakan pada saat penelitian di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Bahan Alam Universitas Borneo Lestari.

### **3.7.2 Prosedur Kerja**

#### **A. Teknik Pengumpulan Sampel**

1). Daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.)

Daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) diperoleh dengan memetik langsung pada pohonnya di Desa Aluan, Kecamatan Batu Benawa, Kabupaten Hulu Sungai Tengah.

2). Bakteri *S.aureus*

Bakteri *S.dysenteriae* diperoleh dengan melakukan pembelian secara online di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Indonesia, Jawa Barat.

## **B. Teknik Persiapan Sampel**

1). Determinasi Tanaman

Proses determinasi sampel daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) dideterminasi di Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat. Determinasi memiliki tujuan yaitu untuk mengetahui dan memastikan kebenaran identitas tanaman yang akan dilakukan penelitian.

2). Sterilisasi Alat

Proses sterilisasi alat merupakan suatu hal yang penting dilakukan pada tahap awal persiapan sampel. Sterilisasi alat bertujuan untuk menghancurkan semua mikroba yang bisa menjadi penyebab kontaminasi dan akan mempengaruhi hasil. Sterilisasi alat menggunakan sterilisasi metode kering yaitu menggunakan oven dengan suhu dan waktu tertentu. Sterilisasi ini cocok untuk peralatan laboratorium seperti cawan petri,

tabung reaksi, gelas ukur, mikropipet, dan lain-lain. Berikut cara kerja menggunakan oven.

- a) Dibungkus alat yang akan disterilisasi menggunakan kertas koran atau aluminium foil.
- b) Dihubungkan kabel oven pada sumber listrik.
- c) Dimasukkan alat yang akan distrelisasi ke dalam oven, sebaiknya susunannya jangan terlalu penuh.
- d) Ditutup pintu oven sampai tertutup rapat (pastikan sampai berbunyi 'klik').
- e) Dinyalakan oven dengan menekan tombol 'ON'
- f) Diatur suhu pada 180°C selama 60 menit. Lalu biarkan oven bekerja sampai waktu yang telah ditentukan.
- g) Dibiarkan terlebih dahulu peralatan laboratorium mendingin di dalam oven, lalu dikeluarkan.
- h) Ditutup kembali pintu oven dan jangan lupa mencabut kabel oven dari sumber listrik.

### 3). Sterilisasi Media

Sterilisasi media merupakan proses awal persiapan sampel khususnya dalam pemeriksaan mikrobiologi. Sterilisasi media bertujuan menghindari kontaminasi dari mikroba yang dapat mempengaruhi hasil. Sterilisasi media ini menggunakan *autoclave* dengan uap panas bertekanan pada



suhu 121°C dengan tekanan 1 ATM selama 15 menit. Berikut cara kerja menggunakan *autoclave*.

- a) Dipastikan *autoclave* terhubung ke sumber listrik.
- b) Dipastikan juga air sudah terisi di dalamnya sampai batas yang ditentukan.
- c) Dimasukkan media yang ingin disterilkan ke dalam keranjang *autoclave*, sesuaikan volumenya jangan terlalu penuh sampai ke bagian atas.
- d) Ditutup rapat bagian atas *autoclave* dengan mencocokkan tanda kuncinya dan rapatkan kunci-kunci secara diagonal sampai benar-benar rapat.
- e) Ditekan power 'ON' dengan menutup katup agar uap tidak keluar
- f) Ditekan tanda timer lalu atur selama 15 menit, bila sudah sampai tanda 15 (tekanan sudah mencapai 121°C).
- g) Ditekan power 'OFF' setelah 15 menit, lalu buka sedikit katup untuk membiarkan suhunya menurun dan udaranya keluar.
- h) Dibuka satu persatu pengunci yang ada dibagian atas.
- i) Dikeluarkan media yang sudah disterilisasi, lalu menutup kembali dan pastikan untuk mencabut kembali kabel *autoclave*.

#### 4). Pembuatan Ekstrak Daun Dadap Serep (*Erythrina variegata* L.)

Pembuatan ekstrak daun serep (*Erythrina variegata* L.) menggunakan metode maserasi. Berikut cara kerja pembuatan ekstrak metode maserasi.

- a) Ditimbang sebanyak 5 kg daun dari tanaman dadap serep yang sudah dipetik.
- b) Dicuci lalu dirajang daun dan dikeringkan di bawah terik matahari dengan menutup bagian atas daun menggunakan kain hitam. Usahakan hindari di bawah terik matahari karena dapat merusak daun. Proses pengeringan ini juga dapat dilakukan menggunakan oven pada suhu 70°C.
- c) Dimasukkan ke dalam blender dan diblender sampai halus. serbuk halus yang dihasilkan disebut dengan simplisia. Kemudian serbuk ini ditimbang lagi.
- d) Ditambahkan larutan etanol 96% dengan perbandingan 1:4, kemudian inkubasi pada suhu kamar selama 72 jam dengan melakukan pengadukan setiap 1x24 jam.
- e) Setelah diinkubasi selama 72 jam pada suhu ruang, filtrat disaring menggunakan kertas saring lalu didapatlah ekstrak cair daun dadap serep. Ekstrak yang masih cair ini diturunkan karena adanya pelarut dari etanol.

- f) Difiltrasi ekstrak yang masih cair tadi menggunakan *rotary evaporator* dan melanjutkan dengan menguapkannya menggunakan *water bath* sampai diperoleh ekstrak daun dadap yang pekat.

#### 5). Skrining Fitokimia

##### a) Uji Flavonoid

1. Dimasukkan ekstrak daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) sebanyak 0,1 g ke dalam tabung reaksi.
2. Ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,5 mg dan HCl pekat sebanyak 3 tetes.
3. Diamati perubahan yang terjadi. Hasil positif menunjukkan warna berubah menjadi hijau sampai kecoklatan.

##### b) Uji Alkaloid

1. Dimasukkan ekstrak daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) sebanyak 0,1 g ke dalam tabung reaksi.
2. Ditambahkan 2 ml kloroform dan 2 ml ammonia.
3. Dikocok kemudian menambahkan HCl 2N sebanyak 3 tetes.
4. Larutan yang diperoleh dibagi menjadi 3 bagian dalam tabung reaksi dimana masing-masing tabung reaksi ditambahkan pereaksi Dragendorf, pereaksi Mayer dan pereaksi Wagner.

5. Diamati perubahan yang terjadi. Hasil positif menunjukkan terbentuk endapan merah/jingga pada pereaksi Dragendorf, terbentuk endapan putih pada pereaksi Mayer dan terbentuk endapan coklat pada pereaksi Wagner.

c) Uji Saponin

1. Dimasukkan ekstrak daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) sebanyak 0,1 g ke dalam tabung reaksi.
2. Ditambahkan 10 ml air hangat lalu dikocok selama 30 menit.
3. Diukur busanya berapa cm busa yang terbentuk. Dibiarkan selama 5 menit dan jika busanya tidak hilang maka ditambahkan HCl 2N.
4. Diamati perubahan yang terjadi. Apabila masih terdapat busa yang konstan maka menunjukkan hasil positif.

d) Uji Tanin

1. Dimasukkan ekstrak daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) sebanyak 0,1 g ke dalam tabung reaksi.
2. Ditambahkan air hangat sebanyak 10 ml dan NaCl 10% sebanyak 5 tetes.
3. Ditambahkan FeCl<sub>3</sub> sebanyak 3 tetes.

4. Diamati perubahan yang terjadi. Warna hijau kehitaman menunjukkan tanin katekol dan biru kehitaman menunjukkan tanin pirogallol.

6). Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

- a) Ditimbang sebanyak 28 g media NA lalu masukkan ke dalam *erlenmeyer*.
- b) Ditambahkan aquadest sebanyak 100 ml lalu dipanaskan di atas *hot plate*.
- c) Diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai homogen dan berwarna lebih bening.
- d) Kemudian ditutup bagian atas *erlenmeyer* dengan kapas steril dan bungkus dengan *aluminium foil*.
- e) Media NA disterilisasi di autoclave selama 15 menit dengan suhu 121°C.
- f) Media NA siap digunakan.

7). Pembuatan Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA)

- a) Ditimbang seberat 6,3 g media SSA lalu masukkan pada *erlenmeyer*.
- b) Ditambahkan dengan 100 ml aquadest.
- c) Dipanaskan media SSA diatas *hot plate* sampai larut.
- d) Diukur pH menggunakan hingga mencapai 7,4.
- e) Ditutup rapat dengan menggunakan kapas steril dan dan dibungkus dengan *aluminium foil*.

- f) Disterilkan media dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C.
- g) Media yang sudah disterilkan dimasukkan di cawan petri yang sesuai.
- h) Dibungkus cawan petri yang telah diisi media untuk melindungi dari kontaminasi dengan bungkus aluminium foil sambil menunggu suhu turun menjadi 50°C.
- i) Disimpan di dalam kulkas.

8). Penanaman Bakteri Pada Media *Nutrient Agar* (NA)

- a) Dimasukkan media NA sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi.
- b) Kemudian diletakkan tabung reaksi dengan posisi membentuk media dengan kemiringan 30°C.
- c) Didiamkan media NA sampai memadat.
- d) Disiapkan 1 ose steril dan ambil biakan bakteri yang akan digunakan secukupnya.
- e) Digores secara zig-zag pada media NA yang sudah memadat dari ujung bawah tabung sampai bagian atas media.
- f) Ditutup bagian atas tabung dengan kapas steril dan membungkus dengan *aluminium foil*.
- g) Diinkubasi selama 1x24 jam pada inkubator.

### 9). Pewarnaan Gram

- a) Disiapkan 1 buah objek *glass* steril dan dibuliri 1 tetes aquadest.
- b) Kemudian diambil 1 ose biakan bakteri pada media NA miring menggunakan ose steril.
- c) Difiksasi di atas api bunsen.
- d) Ditetaskan gentian *violet* sampai menutupi seluruh bagian permukaan bakteri. Didiamkan selama 3 menit.
- e) Dicuci dengan aquadest.
- f) Ditetaskan logul sampai menutupi seluruh bagian permukaan bakteri. Didiamkan selama 1 menit.
- g) Dicuci dengan aquadest.
- h) Kemudian ditetaskan alkohol 96% selama 5 detik.
- i) Dicuci dengan aquadest.
- j) Ditetaskan safranin sampai menutupi seluruh bagian permukaan bakteri. Didiamkan selama 2 menit.
- k) Dicuci lagi dengan aquadest.
- l) Biarkan slide sampai mengering dan diperiksa di bawah mikroskop pada perbesaran 100x menggunakan *oil imersi*.
- m) Diamati hasil, bakteri *S.dysentriae* akan terlihat berwarna merah dengan bentuk *microbasil* dan susunan tidak teratur.

#### 10). Pembuatan Larutan Standar Kekeruhan (*Mc.Farland*)

- a) Dimasukkan larutan  $H_2SO_4$  ke dalam *erlenmeyer* sebanyak 9,95 ml.
- b) Dicampurkan dengan larutan BaCl sebanyak 0,5ml.
- c) Kemudian dikocok sampai homogen hingga terbentuk larutan keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan larutan suspensi bakteri.

#### 11). Pembuatan Suspensi Bakteri

- a) Dipipet 10 ml larutan NaCl fisiologis 0,9%, lalu masukkan ke dalam tabung reaksi.
- b) Diambil 1-3 ose bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan ose steril.
- c) Suspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0.9%, lalu homogenkan.
- d) Kemudian kekeruhannya distandarisasi dengan larutan *Mc.Farland*.

#### 12). Pembuatan Larutan Kontrol

- a) Kontrol Positif

Penelitian ini menggunakan Ciprofloxacin sebagai kontrol positif. Ciprofloxacin termasuk dalam kategori sensitif dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif karena potensinya lebih kuat terhadap bakteri saluran pencernaan seperti *S.dysentriae*



Kontrol positif yang digunakan yaitu kapsul Ciprofloxacin dengan membuka sebanyak 1 kapsul Ciprofloxacin ( $\pm 500\text{mg}$ ) dan menimbang serbuk sebanyak 1% dari bobot kapsul yaitu 5 mg dan melarutkan dalam aquadest sebanyak 100 ml.

b) Kontrol Negatif

Penelitian ini menggunakan aquadest sebagai kontrol negatif. Hal ini karena senyawa dari aquadest bersifat netral yang tidak memberikan efek terhadap pertumbuhan bakteri atau tidak memiliki aktivitas antibakteri.

10). Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Daun Dadap Serep (*Erythrina variegata* L.)

Rumus berikut dipertimbangkan ketika membuat larutan ekstrak berkonsentrasi.

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

**Rumus pengenceran**

Keterangan :

$N_1$  = konsentrasi pertama

$V_1$  = volume yang dibutuhkan

$N_2$  = konsentrasi yang ingin dicapai

$V_2$  = volume yang ingin dihasilkan

## 1) Ekstrak daun dadap serep 25%

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$25\% \times 100 \text{ mL} = N_2 \times V_2$$

$$V_2 = \frac{25\% \times 100 \text{ ml}}{100\%} = 25 \text{ ml}$$

1. Dipipet 25 ml ekstrak daun dadap serep murni lalu dituang ke dalam beaker *glass*.
2. Dipipet aquadest sebanyak 75 ml dan dicampurkan ke dalam beaker *glass* yang berisi ekstrak lalu homogenkan.

## 2) Ekstrak daun dadap serep 50%

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$50\% \times 100 \text{ mL} = N_2 \times V_2$$

$$V_2 = \frac{50\% \times 100 \text{ ml}}{100\%} = 50 \text{ ml}$$

1. Dipipet 50 ml ekstrak daun dadap serep murni lalu dituang ke dalam beaker *glass*.
2. Dipipet aquadest sebanyak 50 ml dan dicampurkan ke dalam beaker *glass* yang berisi ekstrak lalu homogenkan.

## 3) Ekstrak daun dadap serep 75%

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$75\% \times 100 \text{ mL} = N_2 \times V_2$$

$$V_2 = \frac{75\% \times 100 \text{ ml}}{100\%} = 75 \text{ ml}$$

1. Dipipet 75 ml ekstrak daun dadap serep murni lalu dituang ke dalam beaker *glass*.
2. Dipipet aquadest sebanyak 25 ml dan dicampurkan ke dalam beaker *glass* yang berisi ekstrak lalu homogenkan.
- 4) Ekstrak daun dadap serep 100%

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$100\% \times 100 \text{ mL} = N_2 \times V_2$$

$$V_2 = \frac{100\% \times 100 \text{ ml}}{100\%} = 100 \text{ ml}$$

1. Dipipet 100 ml. ekstrak daun dadap serep murni lalu dituang ke dalam beaker *glass*.

### c. Uji Aktivitas Antibakteri

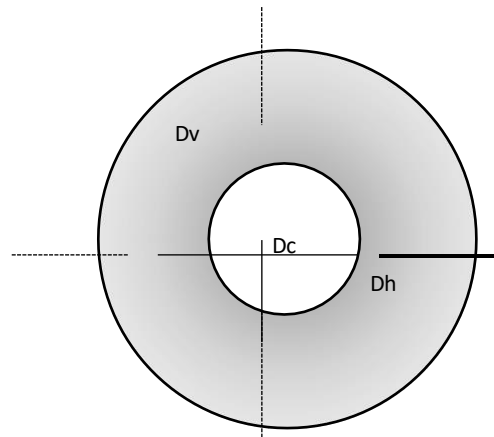
Uji aktivitas antibakteri dalam penelitian ini menggunakan metode *Kirby Bauer*. Berikut cara kerja uji aktivitas antibakteri metode *Kirby Bauer*.

- a) Disiapkan alat dan bahan
- b) Dichelupkan *cotton swab* steril kedalam tabung reaksi yang mengandung suspensi bakteri
- c) Digoreskan ke media yang telah disiapkan sebelumnya
- d) Masing-masing daerah dibedakan menggunakan spidol pada cawan petri menjadi 4 bagian.
- e) Didiamkan selama 5 sampai 10 menit agar media dan suspensi bakteri dapat bercampur.

- f) Diberi keterangan pada masing-masing bagian.
- g) Dichelupkan *Paper disk* ke dalam konsentrasi ekstrak daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) 25%, 50%, 75% dan 100% selama 15 menit (Angelina *et al.*, 2015).
- h) Kemudian dicelupkan juga *Paper disk* ke dalam larutan Ciprofloxacin sebagai kontrol positif dan ke dalam aquadest sebagai kontrol negatif.
- i) Diletakkan *paper disk* menggunakan pinset steril pada media yang sudah diberi keterangan label. Diatur ruang antara cakram kertas sesuai dengan garis tanda yang dibuat.
- j) Dibungkus menggunakan aluminium *foil* untuk mencegah terkontaminasi selama 24 jam yang di inkubasi pada suhu 37°C.
- k) Diamati zona hambat atau zona bening bakteri yang terbentuk.

#### **D. Pengukuran Zona Hambat**

- a) Diamati zona hambat atau zona bening yang terbentuk.
- b) Diukur zona hambat atau zona bening yang terbentuk disekitar cakram dengan diameter vertikal dan horizontal menggunakan jangka sorong, lalu hitung menggunakan rumus (Magvirah *et al.*, 2019).



**Gambar 3. 1 Pengukuran diameter zona hambat**

Diameter zona hambat diukur dengan rumus berikut

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

Keterangan :

$D_v$  : Diameter vertikal

$D_H$  : Diameter horizontal

$D_C$  : Diameter cakram

### **E. Interpretasi Hasil**

Hasil pengukuran zona hambat dibandingkan dengan klasifikasi respon hambat pertumbuhan bakteri yang dikeluarkan oleh *Clinical Laboratory Standar Institute (CLSI)*.

**Tabel 3.3 Standar Interpretasi Diameter Zona Hambat (CLSI 2020)**

<b>Antibiotik</b>	<b>Resisten</b>	<b>Intermediate</b>	<b>Sensitif</b>
Ciprofloxacin	$\leq 15$ mm	16-20 mm	$\geq 21$ mm

**Tabel 3.4 Kategori Zona Hambat**

<b>Kategori</b>	<b>Respon hambat pertumbuhan</b>
Sensitif	Sangat kuat
Sensitif	Kuat
Intermediate	Sedang
Resisten	Lemah

### 3.8 Pengumpulan Data

#### 3.8.1 Data Primer

Jenis data yang dikumpulkan adalah data primer. Dalam penelitian ini data primer meliputi data diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *S.aureus* pada berbagai variasi konsentrasi ekstrak daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) yang diperoleh dari penelitian di laboratorium.

Penelitian ini menggunakan teknik pengumpulan data secara observasi dan penelitian menggunakan metode *Kirby Bauer*. Pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong.

### 3.9 Cara Pengolahan dan Analisa Data

#### 3.9.1 Cara Pengolahan Data

Pengolahan data ini dilakukan menggunakan program SPSS 26.0 untuk melihat apakah terdapat perbedaan yang bermakna dari masing-masing cakram uji yang berisi kontrol negatif, kontrol positif dan ekstrak daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *s.aureus*. Teknik data ini

dibuat secara tabulating data yaitu data yang disajikan dalam bentuk tabel dan naratif.

### **3.9.2 Analisa Data**

Hasil pengukuran data ini diperoleh dari pengukuran zona hambat yang dianalisis dengan mengelompokkan zona hambat yang terbentuk dalam kriteria berdasarkan standar *Clinical Laboratory Standar Institute* (CLSI). Kategori ini dikelompokkan berdasarkan antibiotik yang digunakan dengan hasil kategori yaitu resisten, intermediate dan sensitif.

Dalam penelitian ini dilakukan analisa data menggunakan uji *One Way Anova* yang bertujuan untuk membedakan rata-rata sampel uji dengan syarat data harus berdistribusi normal dan homogen. Dalam penelitian ini digunakan untuk membuktikan bahwa perlakuan ekstrak daun dadap serep (*Erythrina variegata* L.) dengan variasi konsentrasi berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *S.dysentriae*.

Apabila hasil penelitian tidak memenuhi kedua syarat uji *One- Way Anova* maka dilakukan dalam uji statistik yang lain yaitu uji *Kruskal-Walls*. Selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc* apabila dari hasil dari uji *One Way Anova* atau uji *Kruskal-Walls* bermakna.