

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dimaksud adalah penelitian eksperimental laboratories, untuk mengetahui adanya zona hambat ekstrak daun lamun (*Enhalus acoroides*) terhambat pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus*.

B. Tempat Dan Waktu Penelitian

1. Tempat Pengambilan Sampel

Tempat pengambilan sampel di Kelurahan Lalowaru, Kecamatan Moramo Utara, Kabupaten Konawe Selatan Sulawesi Tenggara.

2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Bina Husada Kendari.

3. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan 12 Mei sampai dengan 25 Mei 2023

C. Bahan Uji

1. Bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

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

2. Tanaman lamun *Enhalus acoroides*

Tanaman lamun *Enhalus acoroides* yang akan digunakan yaitu daun lamun *Enhalus acoroides* yang masih segar sebanyak 500 gram yang akan diperoleh menjadi ekstrak dan dibuatkan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

D. Prosedur penelitian

Pengujian daya hambat dalam penelitian ini ditentukan dalam tiga tahapan, yakni:

a. Pra Analitik

- a. Persiapan alat dan bahan
- b. Perisapan alat dan bahan pada penelitian ini adalah mempersiapkan segala alat dan bahan yang akan digunakan selama proses penelitian hingga selesai.

1) Alat:

Autoclave, batang pengaduk, cawan petri, cawan porselin, erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, inkubator, kawat ose, lampu spirtus, maserator, oven, pinset, rak tabung, penggaris, sendok tanduk, spidol, tabung reaksi, neraca analitik, jangka sorong, pipet ukur, dan lampu spirtus.

2) Bahan:

Antibiotik *Chloramphenicol*, aquades, biakan murni *Vibrio parahaemolyticus*, daun lamun *Enhalus acoroides*, kapas, kertas label, kertas saring, larutan etanol 96%, media *Nutrient Agar* (NA), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), *paper disc*, tissue dan kain kasa.

c. Sterilisasi Alat Penelitian

Alat yang terbuat dari bahan gelas atau kaca sebelum digunakan harus dicuci terlebih dahulu, kemudian dikeringkan setelah itu dibungkus dengan kertas HVS lalu dimasukkan ke dalam *Autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm atau menggunakan Oven dengan suhu 170°C selama 1 jam setelah selesai didinginkan dan disimpan ditempat yang telah disiapkan.

d. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

- 1) Media NA ditimbang sebanyak 2,8 gram.
- 2) Serbuk media NA yang sudah ditimbang dipindahkan kedalam Erlenmeyer dan ditambahkan 140 ml aquadest, lalu diaduk.

- 3) Larutan dihomogenkan di atas *hotplate*, jangan sampai mendidih.
 - 4) Media disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - 5) Media yang telah disterilkan dituang ke dalam masing-masing cawan petri steril secara aseptik (di belakang lampu spirtus).
 - 6) Media dibiarkan dalam cawan petri hingga memadat.
 - 7) Media yang telah memadat dimasukkan kedalam inkubator ($\pm 37^{\circ}\text{C}$), selama ± 24 jam untuk uji kualitas media, posisi cawan petri terbalik.
- e. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- 1) Media MHA ditimbang sebanyak 9,5 gram.
 - 2) Serbuk media MHA yang telah ditimbang dipindahkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 250 ml aquadest, lalu diaduk.
 - 3) Larutan dihomogenkan di atas lampu spirtus hingga larut.
 - 8) Media disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - 4) Media yang telah disterilkan dituang kedalam masing-masing cawan petri steril secara aseptik (di belakang lampu spirtus).
 - 5) Media dibiarkan dalam cawan petri hingga memadat.
 - 6) Setelah media memadat, bungkus dengan menggunakan kertas dengan posisi *plate* terbalik.
- f. Permajaan Bakteri
- 1) Media NA yang telah dibuat dan disterilkan dari *autocalve* segera dimasukkan ke dalam tabungm reaksi sebanyak 5 ml lalu dimiringkan hingga memadat.
 - 2) Bakteri uji yang digunakan atau bakteri yang akan dimurnikan adalah *Vibrio parahaemolyticus* pembuatan stok ini dilakukan dengan menggunakan ose dan pengerjaanya harus di belakang api bunsen. Caranya dengan mengambil 1 ose biakan bakteri murni *Vibrio parahaemolyticus* dan diinokulasikan dengan

metode gores pada media NA yang sudah dimiringkan tadi lalu dinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam.

g. Pembuatan Suspensi Bakteri

Biakan bakteri diambil menggunakan kawat ose steril kemudian disuspensikan dalam 9 ml NaCl 0.9% dalam tabung reaksi steril dan homogenkan.

g. Pembuatan Antibiotik *Chloramphenicol* (Kontrol Positif)

Chloramphenicol 250 mg dibuat konsentrasi 5% dengan menimbang 0,5 gram *Chloramphenicol* kemudian dilarutkan dengan aquadest steril sebanyak 5 ml sehingga diperoleh konsentrasi 5%.

h. Pembuatan Tanaman lamun *Enhalus acoroides*

Proses ekstrak *Enhalus acoroides* dengan metode maserasi yang dilakukan dengan menggunakan etanol sebagai pelarut polar pada ekstraksi dan dapat dijabarkan sebagai berikut :

- 1) Lamun yang akan diekstrak terlebih dahulu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, epifit dan pasir.
- 2) Sampel lamun dijemur di bawah sinar matahari sampai kering.
- 3) Sampel lamun yang sudah kering dicacah halus kemudian ditimbang sebanyak 500 gram, lalu dihaluskan menggunakan blender agar lebih halus.
- 4) Kemudian dilakukan proses ekstraksi menggunakan teknik maserasi dimana serbuk kering dimasukkan ke dalam maserator dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 1000 ml kemudian diaduk hingga homogen.
- 5) Dilakukan pengadukan setiap 6 jam sekali selama 1x24 jam.
- 6) Kemudian hasil perendaman disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan ampas.
- 7) Pelarut organik diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak kental.
- 8) Setelah diperoleh ekstrak kental ditampung kedalam *beaker glass* steril kemudian ditutup.

i. Pembuatan Varian Konsentrasi

Ekstrak lamun *Enhalus acoroides* dibuat dalam 5 konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Volume ekstrak *Enhalus acoroides* yang diambil dihitung dengan rumus pengenceran berikut:

Rumus pengenceran

$$V1.M1 = V2.M2$$

(Purwiyanto, 2013).

Keterangan :

V1 = Volume larutan tanaman lamun *Enhalus acoroides* yang digunakan.

M1 = Konsentrasi larutan daun lamun *Enhalus acoroides* yang dibuat

V2 = Volume larutan daun lamun *Enhalus acoroides* yang dibuat

M2 = Konsentrasi daun lamun *Enhalus acoroides* yang diencerkan

Tabel 1. Volume Pengenceran Konsentrasi Tanaman lamun *Enhalus acoroides*

No	Konsentrasi Stok (M1)	Vol. Ekstrak (V1)	Vol. Aquades	Konsentrasi Akhir (M2)	Vol. Akhir (V2)
1.	100%	2 ml	8 ml	20%	10 ml
2.	100%	4 ml	6 ml	40%	10 ml
3.	100%	6 ml	4 ml	60%	10 ml
4.	100%	8 ml	2 ml	80%	10 ml
5.	100%	10 ml	0 ml	100%	10 ml

Berdasarkan rumus pengenceran, maka cara pembuatan varian konsentrasi daun lamun *Enhalus acoroides* dengan tiap-tiap konsentrasi yang memiliki volume total 1 ml adalah sebagai berikut:

- 1) Konsentrasi 20% yaitu 2 ml ekstrak dan ditambahkan sebanyak 8 ml aquadest kemudian dihomogenkan.
- 2) Konsentrasi 40% yaitu 4 ml ekstrak dan ditambahkan 6 ml aquadest kemudian dihomogenkan.
- 3) Konsentrasi 60% yaitu 6 ml ekstrak dan ditambahkan 4 ml aquadest kemudian dihomogenkan.
- 4) Konsentrasi 80% yaitu 8 ml ekstrak dan ditambahkan 2 ml aquadest kemudian dihomogenkan.
- 5) Konsentrasi 100% yaitu dibuat 10 ml ekstrak kemudian dihomogenkan.

b. Analitik

- a) Metode Difusi Agar (*Disk Diffusion Method*) dari Kirby-Bauer.
- b) Prinsip

Cakram yang berisi agen antimikroba diletakan diatas media agar yang telah ditanami mikroorganisme, kemudian berdifusi pada agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan agar.

- c) Prosedur Kerja
 - 1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
 - 2) Disiapkan Biakan bakteri *Vibrio parahaemolyticus*
 - 3) Cawan petri yang telah disterilkan disimpan di atas meja, kemudian media NA dituang ke dalam cawan petri yang sudah disiapkan lalu tunggu hingga memadat.
 - 4) Suspensi bakteri dibuat dengan cara inokulasi biakan pada NaCl 0,9%.
 - 5) Kemudian kemudian pada media MHA ditambahkan 0,1 m suspensi bakteri dan diratakan menggunakan *drigel sky*.
 - 6) Biakan dibiarkan selama 5-10 menit agar terdifusi ke dalam media.

- 7) Masing-masing *paper disc* dicelupkan pada tanaman lamun *Enhalus acoroides* pada masing-masing konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.
- 8) Lalu *paper disc* diambil menggunakan pinset steril dan diletakan dipermukaan media MHA yang telah berisi suspensi bakteri lalu dilabeli menggunakan kertas label.
- 9) Kemudian dibuat kontrol positif menggunakan *paper disc* yang dicelupkan ke dalam *Chloramphenicol* sebagai kontrol positif dan ditanam di atas permukaan media MHA.
- 10) Selanjutnya yaitu membuat kontrol negatif media *Muller Hinton Agar* dengan menambahkan aquadest.
- 11) Cawan petri dibungkus menggunakan kertas dan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam.
- 12) Mengamati ada tidaknya zona bening pada daerah sekitar *paper disc*.
- 13) Mengukur zona hambat tanaman lamun *Enhalus acoroides* terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus*.

c. Pasca Analitik

a) Pencatatan Hasil Penelitian

Pencatatan hasil penelitian merupakan pencatatan suatu aktifitas dalam bentuk tulisan baik diketik maupun ditulis tangan atau dalam bentuk grafik dan gambar dari hasil pengukuran atau pengamatan yang telah dilakukan.

Pencatatan hasil penelitian ditentukan dengan rumus:

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

Keterangan :

DV = Diameter Vertikal

DH = Diamter Horizontal

DC = Diameter Cakram

b) Dokumentasi Hasil Penelitian

Dokumentasi hasil penelitian merupakan kegiatan pengambilan hasil dalam bentuk foto atau gambar dari hasil pengukuran, pengamatan, pengambilan sampel dan lain-lain yang berhubungan dengan penelitian yang dilakukan mulai dari pra-analitik, analitik hingga pasca analitik.

c) Pelaporan Hasil Penelitian

Pelaporan hasil penelitian setelah dilakukan pengukuran dan pengamatan hasil penelitian dilaporkan berdasarkan hasil pengukuran yang dijadikan sebagai hasil penelitian.

- 1) Positif (+) jika hasil menunjukkan zona hambat (zona bening) sekitar *paper disc*.

Nilai diameter dari zona hambat yang dianalisa serta deskriptif dapat dikategorikan menjadi :

- a. Resisten (zona hambar ≤ 17 mm),
- b. Intermediate (zona hambat antara 18-20 mm),
- c. Sensitifitas (zona hambat antara ≥ 21 mm)

- 2) Negatif (-) jika tidak terbentuk zona hambat (zona bening) sekitar *paper disc*.

E. Prosedur Pengumpulan Data

Data merupakan salah satu langkah penting dalam penelitian karena berhubungan dengan data yang akan diperoleh selama penelitian. Data yang digunakan di kumpulkan yang berasal dari jurnal-jurnal peneliti sebelumnya dan literatur-literatur yang mendukung penelitian ini.

F. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian memuat uraian terkait dengan, spesifikasi dari instrument/alat/media dalam penelitian yang hendak digunakan saat pengumpulan data, yaitu:

1. Logbook (laporan harian penelitian).
2. Lembar hasil pengamatan.

G. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer dari penelitian ini adalah data yang diperoleh langsung dari hasil pengujian daya hambat tanaman lamun *Enhalus acoroides* terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Bina Husada kota Kendari.

2. Data Sekunder

Data yang dikumpulkan dari hasil penelitian terdahulu, jurnal dan dari buku-buku yang dipublikasikan.

H. Pengolahan Data

Pengolahan data yang telah diperoleh dari hasil penelitian 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 serta konsistensi data yang ada.
2. Pengkodean data (*coding*) bertujuan untuk memudahkan dalam menganalisa 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

Analisa data dari penentuan hasil penelitian dengan menggunakan rumus zona hambat. Adapun rumus zona hambat adalah sebagai berikut :

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

2

Keterangan :

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

J. Penyajian Data

Data yang telah dianalisis disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian dijelaskan dalam bentuk narasi.

K. Etika Penelitian*a. Anonymity*

Untuk menjaga kerahasiaan, peneliti menggunakan nomor atau kode pada sampel.

b. Confidentiality (Kerahasiaan)

Dilakukan dengan menjamin kerahasiaan hasil penelitian baik informasi maupun masalah-masalah lainnya. Informasi yang dikumpulkan dijamin kerahasiannya oleh peneliti.