

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *Experimental Laboratory*, dengan menggunakan desain *One-shot Case Study* yaitu desain penelitian dengan perlakuan terhadap variabel *independent*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Pengambilan Sampel

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

2. Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Bina Husada Kendari.

3. Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2023.

C. Bahan Uji

1. Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* yang dimaksud dalam penelitian ini merupakan biakan murni *Escherichia coli* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Bina Husada Kendari.

2. Lamun (*Enhalus acoroides*)

Lamun (*Enhalus acoroides*) yang digunakan adalah daun lamun yang telah ditimbang sebanyak 500 gr yang kemudian diolah menjadi ekstrak dan dibuatkan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

D. Prosedur Penelitian

1. Pra analitik

- a. Metode *Kirby Bauer* (Difusi disk)
- b. Prinsip

Langkah pertama siapkan media agar yang telah ditanami mikroorganisme, kemudian letakan cakram yang berisi agen antimikroba di atasnya. Selanjutnya akan terjadi difusi pada media tersebut. Daerah yang jernih menandakan ada hambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme yang disebabkan agen antimikroba dipermukaan agar.

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

1) Alat

Naraca analitik, *autoclave*, oven, cawan petri, pengaduk, gelas ukur, erlenmeyer, *incubator*, gelas kimia, pipet ukur, ose, jarum, pinset, *driglasky*, rak tabung, tabung reaksi, kain kasa, mistar, spidol, jangka sorong, maserator, spirtus, mortar dan alu.

2) Bahan

Daun lamun (*Enhalus acoroides*), biakan murni *Escherichia coli*, aquadest, kertas label, kertas saring, kapas, tissue, siprofloksasin, etanol 96%, media *Nutrient agar* (NA), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), dan NaCl 0,9%.

- d. Sterilisasi Alat

Sterilisasi dilakukan pada alat-alat yang terbuat dari bahan gelas maupun logam yang mempunyai tingkat ketelitian rendah didalam oven selama 1 jam dengan suhu 180 °C, adapun alat-alat yang dibuat dari plastic atau kaca yang mempunyai tingkat keakuratan tinggi disterikan dalam autoclave selama 15 menit dengan suhu 121 °C.

e. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

- 1) Sebanyak 2,8 gr ditimbang media *Nutrient Agar* (NA).
- 2) Serbuk *Nutrient Agar* (NA) dipindahkan kegelas kimia, kemudian ditambahkan sebanyak 140 ml aquadest kemudian pindahkan kedalam Erlenmeyer.
- 3) Larutan di homogenkan dengan diaduk dan pemanasan.
- 4) Pelarutan tidak boleh mendidih (pelarutan harus sempurna sehingga tidak ada kristal yang tersisa).
- 5) Lakukan pengecekan pH lantan aquades sesuai dengan petunjuk pada media.
- 6) Sterilisasi media dengan menggunakan autoclave selama 15 menit dengan suhu 121 °C.
- 7) Danangkan kedalam cawan petri steril yang telah disediakan.
- 8) Media yang dituang kedalam cawan petri dibiarkan hinggapadat.
- 9) Kemudian dimasukkan kedalam inkubator (+ 37°C) selama kurang lebih 24 jam guna uji kualitas media dengan posisi cawan petri terbalik.

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

Media MHA dibuat dengan cara menimbang sebanyak 9,5 g dan dimasukkan kedalam erlenmeyer lalu dilarutkan dengan 250 mL. Aquadest yang dihomogenkan diatas lampu spiritus hingga semua komponen media larut. Setelah semua komponen larut, media di sterilkan di dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C. Media lalu desang kedalam cawan petri (+ 20 mL) atau hingga permukaan plate tertutup, dilakukan dalam keadaan septik. Media dibiarkan beberapa saat hingga mengagar didalam cawan petri. Setelah mengagar, media dibungkus dengan kertas dengan posisi plate terbalik, diberi label lalu disimpan dilemari pendingin.

g. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dalam keadaan aseptis didepan api bunsen dengan menggunakan ose. Media NA yang telah disterilkan dengan autoclave dituang kedalam tabung reaksi sebanyak + 5 mL lalu dimiringkan hingga memadat. Selanjutnya, bakteri *Escherichia colidari* biakan murni diambil 1 ose dan diinokulasikan dengan metode gores (Streak Plate) pada media NA miring dan dinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam sehingga diperoleh bakteri murni.

h. Pembuatan Suspensi Bakteri

Ambil koloni bakteri dengan ose lalu suspensikan kedalam tabung yang berisikan 9 mL Nacl 0,9%. Kemudian lakukan homogenisasi.

i. Pembuatan Antibiotik Siprofloksasin (Kontrol Positif)

Siprofloksasin 500 mg dibuat dalam konsentrasi 5% dengan cara menimbang 0,5 gr siprofloksasin dan dilarutkan menggunakan aquadest sebanyak 5 ml.

j. Pembuatan Ekstrak Lamun (*Enhalus acoroides*)

- 1) Lamun yang akan diesktrak terlebih dahulu dibersihkan dengan cara di cuci menggunakan air mengalir.
- 2) Kemudian dijemur di bawah sinar matahari sampai kering.
- 3) Setelah kering sampel lamun di potong-potong kemudian ditimbang sebanyak 500 gr, lalu dihaluskan menggunakan blender.
- 4) Dilakukan proses ekstraksi menggunakan teknik maserasi dimana serbuk kering dimasukan kedalam maserator dengam menambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 1000 ml kemudian diaduk hingga homogen.
- 5) Dilakukan pengadukan setiap 6 jam sekali selama 1×24 jam.
- 6) Kemudian hasil perendaman disaring menggunakan kertas saring untuk membersihkan ampas.

- 7) Pelarut organik diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak kental.
 - 8) Kemudian setelah itu ekstrak kental ditampung kedalam *beaker glass* steril kemudian di tutup.
- k. Pembuatan Konsentrasi

Ekstrak daun lamun dibuat dengan 5 konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dengan masing-masing konsentrasi memiliki volume 10 mL. Ekstrak daun lamun yang diambil kemudian dihitung dengan rumus :

$$V1 \cdot M1 = V2 \cdot M2$$

Keterangan:

V1: Volume larutan stok

M1: Konsentrasi larutan stok

V2: Volume larutan perlakuan

M2: Konsentrasi larutan yang diinginkan

Berdasarkan rumus pengenceran yang dihitung maka pembuatan dari 5 konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% ekstrak daun lamun (*Enhalus acoroides*) yaitu:

- 1) Konsentrasi 20% dengan 2 ml ekstrak daun kemudian ditambahkan 8 ml aquadest lalu dihomogenkan.
- 2) Konsentrasi 40% dibuat dengan 4 ml ekstrak daun lamun kemudian ditambahkan 6 ml aquadest lalu dihomogenkan.
- 3) Konsentrasi 60% dibuat dengan 6 ml ekstrak dan balau kemudian ditambahkan 4 ml aquadest lalu dihomogenkan.
- 4) Konsentrasi 80% dengan 8 ml ekstrak daun lamun kemudian ditambahkan 2 ml aquadri lalu dihomogenkan.

- 5) Konsentrasi 100% dibuat dengan 10 ml ekstrak daun lamun lalu dihomogenkan.

Tabel 1. Perbandingan Volume Konsentrasi Ekstrak Daun Lamun Dalam 10 ml.

NO	Konsentrasi	Volume Ekstrak	Volume Aquadest	Volume Akhir
1.	20%	2 ml	8 ml	10 ml
2.	40%	4 ml	6 ml	10 ml
3.	60%	6 ml	4 ml	10 ml
4.	80%	8 ml	2 ml	10 ml
5.	100%	10 ml	0 ml	10 ml

2. Analitik

- 1) Siapkan biakan murni bakteri *Escherichia coli*.
- 2) Tambahkan 0,1 ml suspensi bakteri pada media MHA dan kemudian ratakan menggunakan *drigal sky*.
- 3) Selanjutnya diamkan 5-10 menit agar biakan terdifusi kedalam media.
- 4) Celupkan masing-masing paper disk pada ekstrak daun lamun pada masing-masing konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.
- 5) Kemudian letakkan paper disk dengan pinset steril ditengah media MHA yang telah berisi suspensi bakteri lalu dilabeli menggunakan kertas label.
- 6) Dibuat kontrol positif menggunakan paper disk yang dicelupkan kedalam siprofloksasin sebagai kontrol positif kemudian diletakan di atas media MHA.
- 7) Kemudian dibuat juga kontrol negatif dengan menggunakan media MHA dengan menambahkan aquadest.

- 8) Bungkus cawan petri menggunakan kertas, lakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 1x24 jam.
- 9) Amati ada tidaknya zona bening yang terjadi pada daerah sekitar cakram atau kertas paper disk.

3. Pasca Analitik

a. Pencatatan Hasil Penelitian

Pencatatan hasil penelitian adalah hasil penelitian yang telah dilakukan dengan pencatatan suatu aktifitas dalam bentuk tulisan maupun ketikan atau dalam bentuk grafik maupun 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 = Diameter Horizontal

DC = Diameter Cakram

b. Dokumentasi Hasil Penelitian

Kegiatan pengambilan hasil dari bentuk foto atau gambar dari hasil pengukuran, pengamatan, pengambilan sampel dan lain-lain yang berhubungan dengan hasil penelitian mulai dari pra analitik, analitik, sampai pasca analitik.

c. Pelaporan Hasil Penelitian.

Pelaporan hasil penelitian adalah kegiatan melaporkan hasil penelitian setelah dilakukan pengukuran dan pengamatan, hasil penelitian itu dilaporkan berdasarkan hasil pengukuran yang dijadikan sebagai hasil penelitian.

- 1) Positif (+) jika hasil menunjukkan zona hambat sekitar paper disk.
- 2) Negatif (-) jika tidak terbentuk zona hambat (zona bening) sekitar paper disk.

E. Prosedur Pengumpulan Data

Data pada penelitian ini dikumpulkan dari buku dan jurnal-jurnal penelitian sebelumnya. Data yang terperoleh hasil dari penelitian agar dapat dihitung, diproses dan dicatat.

F. Instrumen Penelitian

Pada penelitian ini instrumen yang digunakan adalah lembar observasi pengumpulan data dengan mengamati secara langsung objek yang diteliti dalam hal ini diameter zona hambat ekstrak tanaman lamun (*Enhalus acoroides*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada media NA dengan 5 varian konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

G. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer yang digunakan pada penelitian ini adalah lamun (*Enhalus acoroides*) yang diperoleh dari Desa Lalowaru, Kecamatan Moramo utara, Kabupaten Konawe Selatan. Data lainnya diperoleh dari pemeriksaan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Bina Husada Kendari.

2. Data Sekunder

Data sekunder pada penelitian ini diperoleh dari hasil penelitian terdahulu, buku-buku yang dipublikasikan kemudian dijadikan landasan teoritis dalam penulisan proposal penelitian ini.

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 dan 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) yang bertujuan untuk mengelompokan data kedalam suatu data tertentu menurut sifat-sifat yang dimiliki sesuai dengan tujuan penelitian.

I. Analisi Data

Analisis data dari penentuan hasil penelitian dengan menggunakan rumus zona hambatan. Adapun rumus zona hambatan sebagai berikut:

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

Keterangan:

DV = Diameter Vertikal

DH = Diameter Horizontal

DC = Diameter cakram

- a. Efektif apabila menunjukkan daerah zona bening atau zona hambatan, besarnya zona hambatan terdiri dari tiga kategori yaitu:

Resisten: ≤ 17 mm

Intermediate: 18-20 mm

Sensitive: ≥ 21 mm

- b. Tidak efektif apabila tidak menunjukkan daerah zona bening atau zona hambatan.

J. Penyajian Data

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

K. Etika Penelitian

1. Anonymity

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

2. Confidentiality (Kerahasian)

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