

## BAB IV METODE PENELITIAN

### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen laboratorium, dengan desain penelitian *one-shot case study* yaitu sekelompok subjek yang diberi perlakuan tertentu (sebagai variabel bebas), kemudian dilakukan pengukuran terhadap variabel bebas (Taher & Nurhikmah, 2022). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun bandotan (*Ageratum Conyzoides L*) dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%.

**Tabel 4.1** Desain Penelitian *One-Shot Case Study*

Subjek	Pra	Perlakuan	Pasca
<b>1 Kelompok</b> (Variabel bebas)	-	<b>X</b> (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%)	<b>O</b> (Resisten, Intermediet atau Sensitif)

### B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat pengambilan sampel

Tempat pengambilan sampel penelitian ini yaitu di Lrg. Epic, Jl, Ade Irma Nasution, Watubangga, Kec. Baruga, Kota Kendari, Sulawesi Tenggara.

2. Tempat penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Terpadu Politeknik Bina Husada Kendari.

3. Waktu penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada tanggal 20 Mei s/d 14 Juni 2024.

### C. Bahan Uji

1. Daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) dalam penelitian ini adalah daun tua yang ada bunganya maupun tidak ada dengan ukuran 1-10 x 0,5-7 cm, tidak dekat dengan pucuk, serta tidak dalam kondisi rusak. Dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 150 menit dan diblender sampai berbentuk serbuk selanjutnya dimaserasi menggunakan larutan etanol 96% selama 3 hari kemudian disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak daun kental dan dibuat konsentrasi 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%.
2. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* dalam penelitian ini adalah biakan murni yang telah diremajakan pada media *Nutrient Agar* (NA), diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Terpadu Politeknik Bina Husada Kendari.

### D. Prosedur Pengumpulan Data

#### 1. Pra Analitik

- a. Persiapan sampel : 4 kg Daun tua bandotan (*Ageratum conyzoides L*)
- b. Metode : Difusi cakram (*Kirby-Bauer*)
- c. Prinsip : Menempatkan kertas cakram yang telah diberi perlakuan senyawa antibakteri dengan konsentrasi berbeda pada media yang telah diinokulasi organisme dan akan diuji secara merata (Sundari, 2022).
- d. Persiapan alat dan bahan:
  - 1) Alat
 

a) Autoklaf	j) Blender bahan
b) Oven	kering
c) Inkubator	k) Toples kaca
d) <i>Hot plate</i>	l) Cawan petri dan
e) <i>Rotary evaporator</i>	porselin
f) <i>Colony counter</i>	m) Tabung reaksi
g) Neraca analitik	n) Rak tabung
h) <i>Hot magnetic stirer</i>	o) Gelas ukur
i) Lampu spiritus	p) Gelas kimia

- |                      |                       |
|----------------------|-----------------------|
| q) Erlenmeyer        | v) Sendok tanduk      |
| r) Pipet ukur        | w) <i>Stir bar</i>    |
| s) Kawat ose         | x) Pulpen atau spidol |
| t) <i>Drigle sky</i> | y) Pinset             |
| u) Batang pengaduk   | z) Jangka sorong      |

## 2) Bahan

- |   |   |
|---|---|
| a) Daun bandotann<br>( <i>Ageratum conyzoides L</i> ) | i) NaCl 0,9%                                    |
| b) Biakan bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i>        | j) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%            |
| c) <i>Nutrient agar</i> (NA)                          | k) BaCl <sub>2</sub> 1%                         |
| d) <i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA)                   | l) Gentian violet                               |
| e) Etanol 96%   | m) Lugol  |
| f) Alkohol aseton                                     | n) Safranin                                     |
| g) Aquades steril                                     | o) Kertas cakram                                |
| h) Kloramfenikol 250 mg                               | p) Kapas dan tissue                             |
|   | q) Kertas, plastik <i>wrap</i> dan kertas label |
|   | r) Kertas aluminium foil                        |
- e. Sterilisasi alat
- 1) Sebelum digunakan alat-alat gelas dan media dicuci dan dikeringkan
  - 2) Kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
  - 3) Ose dan pinset disterilkan dengan cara pemanasan langsung dengan api.
- f. Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)
- 1) *Nutrient Agar* (NA) ditimbang 2,8 gr dan masukkan ke erlenmeyer kemudian larutkan dengan 100 ml aquades, ditutup dengan kapas.
  - 2) Media dipanaskan diatas *hot magnetic stirrer*, diaduk dengan menggunakan *stir bar* hingga serbuk larut sempurna.
  - 3) Sterilisasi media dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit

g. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

- 1) *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang 9,5 gr dan masukkan ke erlenmeyer kemudian larutkan dengan 250 ml aquades, ditutup dengan kapas.
- 2) Media dipanaskan diatas *hot magnetic stirrer*, diaduk dengan menggunakan *stir bar* hingga serbuk larut sempurna.
- 3) Sterilisasi media dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
- 4) Dibiarkan selama beberapa menit sampai suhu sekitar 45-50°C
- 5) Selanjutnya larutan dituangkan ke dalam cawan petri steril ukuran sedang ( $\pm$  20 ml setara 4 mm) ukuran besar ( $\pm$ 35 ml setara 4 mm) dan biarkan memadat.

h. Pewarnaan gram

- 1) Fiksasi objek glass dan ose yang akan digunakan diatas api spirtus
- 2) Teteskan NaCl 0,9% diatas objek glass dan oleskan sedikit bakteri uji pada NaCl 0,9% hingga merata dan fiksasi preparat diatas api
- 3) spirtus 2-3x.
- 4) Genangi preparat dengan larutan gentian violet selama 1 menit, lalu bilas dengan air mengalir
- 5) Genangi preparat dengan larutan lugol selama 1 menit, lalu bilas dengan air mengalir
- 6) Bilas dengan larutan alkohol sampai warna tidak tampak, lalu bilas
- 7) Genangi preparat dengan larutan safranin selama 30 detik, lalu bilas dengan air mengalir dan keringkan preparat
- 8) Amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x menggunakan oil imersi

i. Peremajaan bakteri

- 1) Media NA yang telah disterilkan, dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril sebanyak 5 ml lalu dimiringkan hingga memadat
- 2) Bakteri *Klebsiella pneumoniae* diambil menggunakan ose steril dan digoreskan pada media NA yang telah dimiringkan,

pengerjaannya dilakukan dibelakang api lampu spiritus.  
Peremajaan ini dilakukan untuk stok bakteri.

- 3) Inkubasi media kultur pada suhu 37°C selama 24 jam.
- j. Pembuatan larutan Mc Farland
- 1) Campur 9,5 ml larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% dengan 0,5 ml larutan BaCl<sub>2</sub> 1%
  - 2) Homogenkan dan menjadi perbandingan suspensi bakteri
- k. Pembuatan suspensi bakteri
- 1) Ambil bakteri uji menggunakan ose steril
  - 2) Suspensikan 9 ml NaCl 0,9 % dalam tabung reaksi dan dihomogenkan sesuai standar Mc Farland 0,5 yang ditandai dengan adanya kekeruhan setelah disuspensikan
- l. Pembuatan kontrol positif (antibiotik kloramfenikol)
- 1) Kloramfenikol 250 mg dibuat 5% dengan menimbang 0,25 mg kloramfenikol.
  - 2) Larutkan dengan aquades steril sebanyak 5 ml.
- m. Proses maserasi
- 1) Daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) dibersihkan lalu ditimbang dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 150 menit.
  - 2) Daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) yang telah kering dihaluskan menggunakan blender khusus bahan kering sampai menjadi serbuk
  - 3) Serbuk kering ditimbang 500 gram dimasukkan ke dalam maserator dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 2000 ml atau sampai serbuk terendam dengan sempurna kemudian diaduk hingga tercampur.
  - 4) Maserasi selama 3 x 24 jam dengan diaduk sesekali
- n. Pembuatan ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*)
- Setelah 3 hari, filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental dari daun bandotan

(*Ageratum conyzoides L*) yang kemudian akan dibuatkan pada masing-masing konsentrasi 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%.

o. Pembuatan konsentrasi

Pembuatan konsentrasi ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) dibuat dalam 10 ml pada masing-masing konsentrasi, dengan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

$$\% = \frac{b}{v} \times 100\%$$

Keterangan:

% = Variasi Konsentrasi (Konsentrasi Akhir)

b = Massa Ekstrak

v = Volume Pengenceran

**Tabel 4.2** Massa Ekstrak Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides L*) pada masing-masing konsentrasi dalam 10 ml

No.	Konsentrasi Stok	Massa Ekstrak Bandotan (b)	Volume Aquades yang Ditambahkan	Konsentrasi Akhir (%)	Volume Pengenceran (v)
1.	100%	3 gr	7 ml	30%	10 ml
2.	100%	4 gr	6 ml	40%	10 ml
3.	100%	5 gr	5 ml	50%	10 ml
4.	100%	6 gr	4 ml	60%	10 ml
5.	100%	7 gr	3 ml	70%	10 ml
6.	100%	8 gr	2 ml	80%	10 ml
7.	100%	9 gr	1 ml	90%	10 ml
8.	100%	10 gr	-	100%	10 ml

## 2. Analitik

- a. Siapkan alat dan bahan
- b. Tambahkan 400 $\mu$ l suspensi bakteri pada media MHA dan ratakan menggunakan *drigle sky* dan biarkan selama 15 menit agar suspensi meresap ke dalam media
- c. Selanjutnya ambil kertas cakram dan rendam pada ekstrak daun bandotan selama 30 menit pada masing-masing konsentrasi 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% dan simpan diatas permukaan media MHA menggunakan pinset steril
- d. Kemudian rendam kertas cakram pada:
  - 1) Antibiotik kloramfenikol (kontrol positif) dan disimpan diatas media MHA menggunakan pinset steril
  - 2) Aquades (kontrol negatif) dan disimpan diatas media MHA menggunakan pinset steril
- e. Tekan perlahan satu-satu kertas cakram agar menempel dengan baik pada media
- f. Cawan petri dibungkus menggunakan plastik *wrap* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam
- g. Amati zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dan lakukan pengukuran dengan satuan milimeter (mm).

## 3. Pasca Analitik

- a. Daya hambat bakteri *Klebsiella pneumoniae* dilihat dari terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram dan dilakukan pengukuran dengan rumus:

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

Keterangan:

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

Berdasarkan hasil pengukuran terdapat kategori aktivitas antibakteri menurut (CLSI, 2021), yaitu:

- 1) Resisten :  $\leq 12$  mm
  - 2) Intermediet : 13-17 mm
  - 3) Sensitif :  $\geq 18$  mm
- b. Tidak terbentuk zona bening menandakan tidak adanya aktivitas antibakteri.

#### **E. Instrumen Penelitian**

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

1. Laporan harian penelitian
2. Lembar hasil pengamatan
3. Kertas catatan dan alat dokumentasi

#### **F. Jenis Data**

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

1. Data primer

Data primer yang digunakan adalah data yang diperoleh secara langsung dari tempat penelitian. Data yang diperoleh berupa daun bandotan di Lrg. Epic, Jl, Ade Irma Nasution, Watubangga, Kec. Baruga, Kota Kendari, Sulawesi Tenggara. Data lainnya diperoleh dari pemeriksaan di laboratorium mikrobiologi Politeknik Bina Husada Kendari.

2. Data Sekunder

Data sekunder yang digunakan adalah data yang diperoleh dari berbagai macam buku dan jurnal terkait penelitian yang dijadikan sebagai landasan teori.

#### **G. Pengolahan Data**

Proses pengolahan data yang dilakukan untuk penelitian ini yaitu:

1. Pemeriksaan (*editing*) yaitu pengecekan data yang telah diperoleh.
2. Pengkodean (*coding*) yaitu memberikan kode pada setiap data yang dikumpulkan dari instrumen penelitian.
3. Metabulasi (*tabulating*) yaitu memasukkan data yang diperoleh dalam bentuk tabel agar mudah untuk dipahami.



## **H. Analisis Data**

Analisis data dalam penelitian ini menggunakan metode deskriptif berdasarkan kategori zona hambat yaitu resisten:  $\leq 12$  mm, intermediet: 13-17 mm dan sensitif:  $\geq 18$  mm.

## **I. Penyajian Data**

Penyajian data dalam penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel dan pembahasan mengenai hasil penelitian yang telah diperoleh.