

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen Laboratorium dengan menggunakan desain *One-Shot Case Study*, yaitu desain penelitian yang dilakukan dengan memberikan perlakuan terhadap variabel *independent* yang diikuti dengan pengamatan terhadap variabel *dependent*. Pada penelitian ini kelompok uji dilakukan dengan 5 kelompok perlakuan masing-masing perlakuan diberikan ekstrak daun bandotan pada tiap konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Pada kelompok kontrol terdiri dari *ciprofloxacin* sebagai kontrol positif dan *Dimetil Sulfoxide* (DMSO) sebagai kontrol negatif.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

- a. Tempat pengambilan sampel daun bandotan dilakukan Jl. Motaha, belakang kantor pengairan PU, Desa wonua sangia, Kecamatan Landono, Kabupaten Konawe Selatan.
- b. Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kampus Politeknik Bina Husada Kendari.

2. Waktu penelitian

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

C. Bahan Uji

- a. Daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bandotan tua, memiliki tekstur yang tidak mudah sobek, serta daun bandotan segar memiliki aroma yang khas dan sedikit menyengat. 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 sehingga diperoleh ekstrak daun dan dibuat konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

- b. Bakteri *Salmonella typhi* yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah biakan murni yang telah diremajakan pada media *Nutrient Agar* (NA) yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Terpadu Politeknik Bina Husada Kendari.

D. Prosedur Pengumpulan Data

Pengumpulan data ini berdasarkan jurnal penelitian sebelumnya dan literatur yang mendukung penelitian ini. Data yang diperoleh dari hasil penelitian di olah dan dicatat.

E. Prosedur Kerja Penelitian

1. Pra Analitik

- a. Persiapan sampel : Daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*)
- b. Metode : Difusi Sumuran
- c. Prinsip : Metode sumuran dilakukan dengan membuat lubang tegak lurus pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji.
- d. Persiapan alat dan bahan.
 - 1) Alat
 - a) Autoklaf
 - b) Oven
 - c) Inkubator
 - d) Waterbath
 - e) *Rotary evaporator*
 - f) Neraca analitik
 - g) Lampu spiritus
 - h) Blender
 - i) Cawan petri
 - j) Cawan porselin
 - k) Tabung reaksi
 - l) Rak tabung
 - m) Gelas ukur

- n) Gelas kimia
- o) Labu ukur
- p) Erlenmeyer
- q) Pipet ukur
- r) Kawat ose
- s) Batang pengaduk
- t) Sendok tanduk
- u) Kaki tiga
- v) Pulpen atau spidol
- w) Pinset
- x) Jangka sorong

2) Bahan

- a) Daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*)
- b) Biakan bakteri *Salmonella typhi*
- c) *Nutrient agar* (NA)
- d) *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- e) Etanol 96%
- f) Aquades steril
- g) *Ciprofloxacin* 500 mg
- h) NaCl 0,9%
- i) H₂SO₄ 1%
- j) BaCl₂ 1%
- k) Kertas cakram
- l) Kapas dan tissue
- m) Kertas dan kertas label
- n) Kertas aluminium foil

e. Sterilisasi Alat dan Bahan

1. Sebelum digunakan alat-alat gelas dan media dicuci dan dikeringkan
2. Kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan menggunakan oven dengan suhu 180°C selama 1 jam

3. Kemudian didinginkan dan disimpan pada tempat yang telah disiapkan
- f. Pembuatan media
- a) Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)
 1. *Nutrient Agar* (NA) ditimbang 2,8 gr
 2. Masukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan 100 ml aquadest lalu dihomogenkan
 3. Panaskan di *hot plate* sambil diaduk hingga larutan mendidih
 4. Tutup dengan aluminium foil dan sterilisasi media dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
 5. Standarisasi pH 7
 - b) Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)
 1. Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
 2. Media MHA yang digunakan ditimbang dengan rumus : MHA 38 gram/liter atau 250 ml
$$\text{Gram MHA} : \frac{38 \text{ gram} \times 250 \text{ ml}}{1000} = 9,5 \text{ gram.}$$
 3. Serbuk media MHA ditimbang sebanyak 9,5 gram.
 4. Serbuk Media MHA yang ditimbang dilarutkan dalam labu *erlenmeyer* dengan 250 ml aquades.
 5. Kemudian panaskan di atas hot plate sambil di aduk hingga larut sempurna dan jangan sampai mendidih.
 6. Selanjutnya tutup labu *erlenmeyer* dengan kapas dan *aluminium foil* .
 7. Kemudian disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
 8. Media dituang kedalam cawan petri (35 ml) dan dilakukan dalam keadaan aseptik
 9. Media di diamkan beberapa saat hingga mengagar di dalam cawan petri dan diberi label lalu disimpan di dalam lemari pendingin.

g. 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 *Salmonella typhi* pada Nacl 0,9% hingga merata dan fiksasi preparate diatas api spirtus 2-3x
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 alcohol 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 100x menggunakan oil imersi.

h. Peremajaan Bakteri

1. Media NA yang telah disterilkan, dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril sebanyak 5 ml lalu dimiringkan hingga memadat
2. Bakteri *Salmonella typhi* diambil menggunakan ose steril dan digoreskan pada media NA yang telah dimiringkan, pengerjaannya dilakukan dibelakang api lampu spiritus, dengan suhu 37°C selama 24 jam.

i. Pembuatan suspense 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

j. Pembuatan larutan *Mc Farland*

- 1) Campurkan 9,5 ml larutan H₂SO₄ 1% dengan 0,5 ml larutan BaCl₂ 1%
- 2) Dihomogenkan dan menjadi perbandingan suspensi bakteri

k. Pembuatan antibiotik *ciprofloxacin* (kontrol positif)

ciprofloxacin 500 mg di buat konsentrasi 5 % , timbang 0,5 gram *ciprofloxacin* dan larutkan dengan pelarut DMSO sebanyak 5 ml.

l. Pembuatan Ekstrak daun bandotan

1. Ekstrak

- a) Daun bandotan dibersihkan lalu ditimbang dan dikeringkan
- b) Daun bandotan yang telah kering dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk.
- c) Serbuk kering ditimbang 500 gram dan dimasukkan ke dalam maserator dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 2000 ml atau sampai serbuk terendam dengan sempurna, kemudian diaduk hingga tercampur.

2. Maserasi

- a) Diamkan selama 3 hari dan diaduk setiap 24 jam
- b) Setelah 3 hari, dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan ampas.
- c) Hasil saring diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40 °C sehingga diperoleh ekstrak kental dari daun bandotan.

m. Pembuatan Konsentrasi Daun bandotan

Ekstrak daun bandotan di buat dalam 10 ml pada masing-masing konsentrasi. Volume ekstrak daun bandotan di hitung dengan rumus pengenceran berikut:

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

Keterangan :

% = variasi konsentrasi (konsentrasi akhir)

b = massa ekstrak

v = volume pengenceran

Tabel 3. Perbandingan Volume Konsentrasi Ekstrak Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides L*) dan DMSO dalam 10 ml.

No.	Konsentrasi Stok (M1)	Massa Ekstrak daun bandotan	Pelarut DMSO yang ditambahkan	Konsentrasi Akhir (%)	Volume Akhir (V)
1.	100%	2 gram	8 ml	20 %	10 ml
2.	100%	4 gram	6 ml	40%	10 ml
3.	100%	6 gram	4 ml	60%	10 ml
4.	100%	8 gram	2 ml	80%	10 ml
5.	100%	10 gram	-	100%	10 ml

2. Analitik

- 1) Siapkan biakan murni bakteri *Salmonella typhi*
- 2) Buat suspensi bakteri dengan cairan okulasi biakan pada NaCl 0,9 %
- 3) Tambahkan 0,1 mL suspensi bakteri pada media MHA dan kemudian ratakan menggunakan *drigle sky*
- 4) Selanjutnya diamkan selama 5-10 menit agar biakan terdifusi kedalam media
- 5) Kemudian buat lubang sumuran pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun bandotan yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.
- 6) Pembuatan control positif dan control negative
 1. Control positif : media *Mueller Hinton Agar + Ciprofloxacin*
 2. Control negative: media *Mueller Hinton Agar + DMSO*
- 7) Bungkus cawan petri menggunakan kertas, lakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 8) Setelah 24 jam, amati adanya zona bening yang terbentuk disekitar lubang sumuran dan ulur diameter zona hambat yang terbentuk pada sekitar lubang dengan menggunakan jangka sorong.

3. Pasca Analitik

- a. Daya hambat bakteri *Salmonella typhi* dilihat dari terbentuknya zona bening disekitar lubang sumuran dan dilakukan pengukuran dengan rumus :

$$\frac{Dv - Dc + (DH + Dc)}{2}$$

Keterangan :

Dv : Diameter vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter lubang sumuran

Hasil penelitian dilaporkan berdasarkan hasil pengukuran zona hambat yang terbentuk kemudian di jadikan sebagai hasil penelitian.

- a) Efektif : Ditandai terbentuknya zona hambat dengan kategori sensitif ≥ 31
- b) Tidak efektif : Ditandai dengan tidak terbentuknya zona hambat.

Adapun kriteria zona hambat meliputi :

1. Resisten : ≤ 20 mm
2. Intermediet : 21-30 mm
3. Sensitif : ≥ 31 mm (CLSI, 2021).

F. Instrument Penelitian

Penelitian ini instrument yang digunakan yaitu lembar observasi pengumpulan data dengan cara mengamati secara langsung objek yang akan diteliti yaitu dalam hal ini diameter zona hambat ekstrak daun Bandotan (*Ageratum conyzoides L*) terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* pada media MHA dengan 5 konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

G. Jenis Data

1.Data Primer

Data primer pada uji daya hambat ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) terhadap bakteri *Salmonella typhi* yang di inkubasi selama 24 jam pada setiap konsentrasi ekstak daun bandotan. Data yang di kumpulkan di catat dalam bentuk tabel.

2.Data Sekunder

Data sekunder diperoleh malalui buku literatur perpustakaan dan informasi-informasi yang berkaitan dengan penelitian ini.

H. Pengolahan Data

Pengolahan data dari hasil penelitian ini diperoleh beberapa tahapan sebagai berikut:

1. *Editing*: Pemeriksaan data bertujuan untuk memastikan data yang telah dikumpulkan dari pengamatan dengan cara melengkapi data yang ada
2. *Coding*: Pemeriksaan kode data yang bertujuan untuk mempermudah dalam menganalisa data dengan memberikan kode yang yang mudah dipahami pada sampel.
3. *Tabulating*: Tabulasi data dilakukan dengan cara menyusun data-data yang sudah diperoleh dalam bentuk grafik sehingga mudah di pahami

I. Analisis Data

Dalam penelitian ini analisis data yang digunakan adalah metode deskriptif berdasarkan kategori efektif, kurang efektif dan tidak efektif dari ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) terhadap bakteri *Salmonella typhi*.

J. Penyajian Data

Bentuk penyajian data dari hasil penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel serta gambar lalu dijelaskan dalam bentuk narasi.