

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *experiment laboratories* dengan desain *one-shot case study*, yang merupakan desain penelitian dengan perlakuan terhadap variabel *independen* yang diteliti dengan pengamatan atau pengukuran terhadap variabel *dependen*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Pengambilan Sampel

Tempat pengambilan sampel dalam penelitian ini yaitu kebun warga Perumahan Swarna Dwipa, Jalan Ade Irma Nasution, Kelurahan Watubangga, Kecamatan Baruga, Kota Kendari, Sulawesi Tenggara.

2. Tempat Penelitian

Pelaksanaan uji daya hambat dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Bina Husada Kendari.

3. Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada tanggal 28 Mei s/d 24 Juni 2024.

C. Bahan Uji

Bahan uji dari penelitian ini adalah daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) yang digunakan adalah bagian daunnya, yang dipetik secara manual. Kemudian ditimbang sebanyak 4000 gram daun bandotan dengan timbangan digital, lalu dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk, kemudian direndam dalam etanol 96%. Tujuannya untuk mendapatkan ekstrak daun bandotan yang pekat. Ekstrak daun bandotan tersebut dibuat dalam 5 variasi konsentrasi berbeda yaitu pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%, yang kemudian diuji apakah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

D. Prosedur Penelitian

1. Pra Analitik

- a. Metode : Metode difusi sumuran (*well diffusion*)

b. Prinsip : Metode sumuran dilakukan dengan membuat lubang yang dibuat tegak lurus pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji.

c. Persiapan alat dan bahan

- Alat

- | | |
|-----------------------------|------------------------------|
| 1) <i>Autoclave</i> | 15) Gelas ukur |
| 2) Neraca analitik | 16) Silinder cup |
| 3) Drigalski spatula | 17) Gunting |
| 4) Inkubator | 18) Spidol |
| 5) Oven | 19) Mikropipet |
| 6) Blender | 20) Tip biru |
| 7) Toples kaca | 21) Gelas kimia |
| 8) <i>Hotplate</i> | 22) Ose |
| 9) <i>Magnetic stir bar</i> | 23) Tabung reaksi |
| 10) Lampu spiritus | 24) Rak tabung |
| 11) Sendok tanduk | 25) <i>Rotary evaporator</i> |
| 12) Batang pengaduk | 26) Jangka sorong |
| 13) Erlenmeyer | 27) Pinset/penjepit |
| 14) Vortex | 28) Cawan petri |

- Bahan

- 1) Daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*)
- 2) Biakan murni *Streptococcus mutans*
- 3) Antibiotik *Chloramphenicol*
- 4) Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- 5) Media *Nutrient Agar* (NA)
- 6) *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO)
- 7) NaCl 0,9%
- 8) Etanol 96%
- 9) Aquadest
- 10) Aluminium foil
- 11) Kapas kering dan tisu

12) Kertas saring

13) Kertas label

d. Sterilisasi Alat Penelitian

Alat-alat yang terbuat dari gelas atau logam dengan tingkat ketelitian yang rendah disterilisasi di dalam oven pada suhu 180°C selama 1,5-2 jam. Sedangkan alat-alat yang terbuat dari kaca atau plastik dengan tingkat ketelitian yang sangat tinggi disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C.

e. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.

2) Media NA yang digunakan dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut: NA sebanyak 28 gram per liter, atau setara dengan volume 100 ml.

$$\text{gram MHA} = \frac{28 \text{ gram} \times 100 \text{ ml}}{1000} = 2,8 \text{ gram}$$

3) Jumlah serbuk media NA yang ditimbang adalah sebanyak 2,8 gram.

4) Serbuk media NA yang telah ditimbang dipindahkan ke dalam erlenmeyer dan kemudian ditambahkan 100 ml *aquadest*. Campuran tersebut diaduk secara merata.

5) Tutup labu erlenmeyer dengan menggunakan kapas kering.

6) Media dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk menggunakan *magnetic stir bar* hingga semua komponen media larut, dan jangan sampai mendidih.

7) Setelah semua komponen larut, media disterilkan di dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C.

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

1) Siapkan alat dan bahan akan digunakan.

2) Media MHA yang digunakan dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut: MHA sebanyak 38 gram per liter, atau setara dengan volume 250 ml.

$$\text{gram MHA} = \frac{38 \text{ gram} \times 250 \text{ ml}}{1000} = 9,5 \text{ gram}$$

- 3) Jumlah serbuk media MHA yang ditimbang adalah sebanyak 9,5 gram.
 - 4) Serbuk media MHA yang telah ditimbang dipindahkan ke dalam erlenmeyer dan kemudian ditambahkan 250 ml *aquadest*. Campuran tersebut diaduk secara merata.
 - 5) Tutup labu erlenmeyer dengan menggunakan kapas kering.
 - 6) Media dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk menggunakan *magnetic stir bar* hingga semua komponen media larut, dan jangan sampai mendidih.
 - 7) Setelah semua komponen larut media disterilkan di dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C.
 - 8) Media MHA lalu dituang sebanyak 35 ml ke dalam cawan petri ukuran besar dan 20 ml ke dalam cawan petri ukuran kecil, dalam keadaan aseptik.
 - 9) Setelah itu media didinginkan dan dibiarkan memadat di dalam cawan petri.
 - 10) Kemudian ukur media MHA dengan ketebalan 4 mm.
- g. Pewarnaan Bakteri *Streptococcus mutans*
- 1) Siapkan *object glass* yang bersih dan sterilkan jarum ose dengan pemijaran, kemudian dinginkan.
 - 2) Teteskan NaCl 0,9% pada *object glass*, lalu ambil satu ose steril bakteri *Streptococcus mutans* dan sebarkan setipis mungkin membentuk lingkaran.
 - 3) Fiksasi preparat dengan melewatkannya di atas api bunsen hingga kering.
 - 4) Genangi preparat dengan gentian violet selama 3 menit, kemudian bilas dengan air mengalir.
 - 5) Genangi dengan lugol selama 2 menit, kemudian bilas dengan air mengalir.

- 6) Genangi dengan alkohol aseton hingga jernih, lalu bilas kembali dengan air mengalir.
 - 7) Genangi dengan safranin selama 1 menit, kemudian bilas dengan air mengalir.
 - 8) Keringkan dan periksa di mikroskop dengan perbesaran 100×.
- h. Peremajaan Bakteri *Streptococcus mutans*

Bakteri yang digunakan sebelumnya diremajakan terlebih dahulu untuk mendapatkan bakteri yang muda dan bebas kontaminasi. Proses peremajaan bakteri dilakukan sehari sebelum pelaksanaan penelitian dengan memastikan kondisi aseptis, dekat dengan api bunsen dan menggunakan ose (Dola dkk, 2021). Berikut ini adalah prosedur peremajaan bakteri:

- 1) Media *Nutrient Agar* (NA) yang telah disterilkan dengan *autoclave* dituangkan dalam tabung reaksi sekitar ± 5 ml dan dimiringkan hingga padat.
 - 2) Jarum ose disterilkan dengan pemanas bunsen dan didiamkan sejenak. Kemudian bakteri *Streptococcus mutans* yang berasal dari biakan murni diambil menggunakan 1 ose dari tabung inokulasi bakteri, ambil pada bagian yang berbentuk titik.
 - 3) Selanjutnya, remajakan bakteri pada media agar NA miring dengan metode gores (*streak plate*), yaitu menggoreskannya dalam pola zig-zag di permukaan media NA miring.
 - 4) Inkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C untuk mendapatkan bakteri murni. Inkubasi ini bertujuan untuk menciptakan lingkungan dengan suhu optimal bagi perkembangan bakteri sehingga dapat memastikan bakteri tumbuh dengan baik.
- i. Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus mutans*
- 1) Siapkan bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diremajakan pada media agar miring *Nutrient Agar* (NA).

- 2) Bakteri *Streptococcus mutans* diencerkan dengan mencampur 1 ose suspensi bakteri ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan salin NaCl 0,9% pada tabung reaksi.
 - 3) Homogenkan suspensi bakteri menggunakan vortex hingga terbentuk kekeruhan.
 - 4) Standarisasi suspensi sesuai konsentrasi 0,5 *McFarland*.
- j. Pembuatan Ekstrak Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides L*)
- Proses Maserasi
 - 1) Bersihkan 4 kg daun bandotan yang telah dipetik dan dipisahkan dari tangkainya dengan air mengalir.
 - 2) Keringkan daun yang telah dicuci menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 150 menit.
 - 3) Kemudian haluskan daun yang sudah kering agar menjadi serbuk menggunakan blender.
 - 4) Serbuk ditimbang sebanyak 500 gram menggunakan timbangan analitik.
 - 5) Rendam serbuk daun dalam etanol 96% sebanyak 2000 ml di dalam wadah toples kaca selama 3×24 jam, melalui penyaringan fitrat untuk menghasilkan ekstrak cair.
 - 6) Lakukan pengadukan setiap 6 jam selama 5 menit.
 - 7) Setelah proses maserasi selama 3×24 jam, saring hasilnya dan gunakan corong yang dilapisi kertas saring untuk memisahkan ampas dan fitrat, sehingga menghasilkan ekstrak cair.
 - Proses Pembuatan Ekstrak
 - 1) Ekstrak daun bandotan yang telah dimaserasi diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C selama 1 jam hingga mendapatkan ekstrak yang lebih kental.
 - 2) Selanjutnya membuat ekstrak dengan konsentrasi berbeda, yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

k. Perhitungan Variasi Konsentrasi

Dari larutan pekat ekstrak daun bandotan ini akan dibuat variasi konsentrasi yang berbeda, yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% yang dihitung dengan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

Keterangan : V1 : Volume yang dicari

V2 : Volume yang diketahui

M1 : Konsentrasi dari larutan stok

M2 : Konsentrasi dari larutan perlakuan

Perhitungan volume ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L) dan DMSO dalam 10 ml untuk pembuatan variasi konsentrasi dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Volume pengenceran konsentrasi ekstrak daun bandotan

No.	Konsentrasi stok (M1)	Volume ekstrak daun bandotan yang digunakan (V1)	Volume DMSO yang ditambahkan	Konsentrasi akhir (M2)	Volume 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	-	100 %	10 ml

1. Pembuatan Kontrol Positif (*Kloramfenikol*)

Kloramfenikol sebanyak 250 mg dibuat dalam konsentrasi 5% dengan cara ditimbang sebanyak 0,025 gram *kloramfenikol* kemudian dilarutkan bersama dengan 5 ml pelarut DMSO sehingga diperoleh konsentrasi *kloramfenikol* 5%.

2. Analitik

Langkah-langkah untuk menguji kemampuan penghambatan dari ekstrak daun bandotan adalah sebagai berikut.

a. Masing-masing daerah cawan petri diberi label.

- b. Masukkan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* sebanyak 500 µl untuk cawan petri ukuran besar dan 100 µl untuk cawan petri ukuran kecil, lalu sebarkan ke seluruh permukaan media MHA menggunakan drigalski spatula.
- c. Buat lubang di media MHA yang telah diinokulasi dengan bakteri menggunakan silinder cup yang diameternya sebesar 6 mm.
- d. Selanjutnya, ekstrak daun bandotan dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dimasukkan ke dalam setiap lubang pada media MHA, dengan volume penetes 70 µL.
- e. Lakukan kontrol positif dan negatif:
 Kontrol Positif : Media *Mueller Hinton Agar* + *Kloramfenikol*
 Kontrol Negatif: Media *Mueller Hinton Agar* + DMSO
- g. Bungkus cawan petri dengan menggunakan kertas, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2×24 jam.
- h. Setelah itu, dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona terang atau zona bening (*clear zone*) yang terbentuk di sekitar lubang menggunakan jangka sorong.

3. Pasca Analitik

a. Pencatatan Hasil Penelitian

Mencatat seluruh kegiatan dan hasil penelitian, baik melalui penulisan manual atau diketik, dan rangkum informasinya dalam bentuk tabel atau ilustrasi dari data pengukuran dan pengamatan yang telah dilakukan. Berikut adalah rumus pencatatan hasil penelitian:

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

Keterangan : DV : Diameter Vertikal

DC : Diameter Cakram

DH : Diameter Horizontal

b. Pengolahan Data Hasil Penelitian

Hasil penelitian berdasarkan tingkat efektivitas, dilihat dari klasifikasi zona hambat yang muncul:

1) Efektif adanya zona hambat

Ditandai dengan ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L) yang daya hambatnya dalam kategori Sensitif ≥ 21 mm.

2) Kurang efektif adanya zona hambat

Ditandai dengan ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L) yang daya hambatnya dalam kategori Intermediet 18-20 mm.

3) Tidak efektif adanya zona hambat

Ditandai dengan ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L) yang daya hambatnya dalam kategori Resisten ≤ 17 mm atau tidak terbentuk zona bening di sekitar lubang sumuran ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L).

c. Dokumentasi Hasil Penelitian

Dokumentasi hasil penelitian dilakukan melalui pengambilan gambar atau foto dari proses pengamatan dan pengukuran pada objek yang sedang diteliti. Proses ini mencakup seluruh tahapan dari pra analitik hingga pasca analitik.

d. Pelaporan Hasil Penelitian

Setelah selesai melakukan pengukuran dan pengamatan terhadap objek penelitian, tahap selanjutnya adalah melaporkan hasil penelitian. Hasil ini dijadikan sebagai kesimpulan akhir dari penelitian yang telah dilakukan.

E. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian mencakup penjelasan mengenai jenis dan spesifikasi alat atau instrumen yang digunakan untuk memperoleh dan mengumpulkan data. Dalam penelitian ini, instrumen yang digunakan melibatkan kamera, pulpen, dan buku catatan yang berfungsi sebagai laporan harian kegiatan penelitian.

F. Jenis Data

1. Data Primer

Data primer dalam penelitian ini berasal dari hasil pengukuran zona hambat ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L) terhadap

pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* pada konsentrasi yang berbeda, yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Pengambilan data dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Bina Husada Kendari.

2. Data Sekunder

Data sekunder dalam penelitian ini diperoleh dari berbagai sumber, termasuk hasil penelitian sebelumnya, jurnal-jurnal yang memiliki akreditasi baik nasional maupun internasional, serta buku-buku yang telah dipublikasikan.

G. 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 menganalisis data dengan cara memberikan kode atau atribut pada data.
3. Mentabulasi (*tabulating*) tabulasi merupakan lanjutan langkah koding untuk mengelompokkan data ke dalam suatu data tertentu menurut sifat-sifat yang dimiliki sesuai dengan tujuan penelitian.

H. Analisa Data

Dalam penelitian ini akan dianalisis dengan metode deskriptif berdasarkan kategori zona hambat yaitu sensitif ≥ 21 mm, intermediet 18-20 mm, dan resisten ≤ 17 mm.

I. Penyajian Data

Data hasil penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel kemudian dideskripsikan sehingga diperoleh hasil analisis uji daya hambat ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.