

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian *ekperimental laboratories* dengan desain yang di gunakan *one-shot case study*. Desain penelitian ini adalah menggunakan satu kelompok tanpa kelompok pembanding. 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 kontrol positif yaitu *Chloramphenicol* dan kontrol negatif yaitu *Dimetil Sulfoxide* (DMSO) dan aquadest.

#### **B. Tempat Penelitian**

##### 1. Tempat Penelitian

Penelitian ini di lakukan di Laboratorium Mikrobiologi Bina Husada Kendari Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

##### 2. Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Mei s/d Juni 2024

#### **C. Bahan Uji**

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) yang diambil di Desa Mekar, Kecamatan Soropia, Kabupaten Konawe, Sulawesi Tenggara. Daun bandotan yang digunakan sebanyak 500 gram yang dibuat menjadi ekstrak daun bandotan sebanyak 5 konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, 100%.

#### **D. Prosedur Pengumpulan Data**

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

#### **E. Prosedur Penelitian**

##### 1. Pra Analitik

- a. Sampel : Daun bandotan tua

- b. Metode : *Well diffusion* (Sumuran)
- c. Prinsip Kerja : Metode sumur dilakukan dengan membuat lubang tegak lurus pada media agar padat yang telah diinokulasi bakteri.
- d. Persiapan Alat dan Bahan

- 1) Alat:

- Pada penelitian ini alat yang digunakan yaitu:

- Tabung reaksi, rak tabung, *Incubator*, *autoclave*, gelas kimia, gelas ukur, mikropipet, batang pengaduk, cawan petri, tip, korek api, bunsen, corong buchner, blender, pinset, hot plate, neraca analitik, ose, *Erlenmeyer* 100 ml, tabung durham, pengukur waktu, wadah meserasi, jangka sorong, shaker, kamera dan tisu

- 2) Bahan

- Pada penelitian ini bahan yang digunakan yaitu:

- Media *Mueller Hinton Agar* (MHA), biakan bakteri *Eschericia coli*, Ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.), aquades steril, etanol 96%, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), *Nutrient Agar* (NA), Nacl 0,9%, antibiotik *Cloramphenicol* 250 mg, kertas saring, kertas label, kapas alkohol, kapas kering, aluminium foil, dan tip biru.

- e. Sterilisasi Alat dan Bahan

- Alat yang akan digunakan dicuci bersih terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat-alat dengan ketelitian rendah yang terbuat dari kaca atau logam dibungkus dengan kertas kemudian di sterilisasi dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 1 jam. Sedangkan alat yang berbahan kaca atau plastic dengan ketelitian tinggi yaitu memiliki skala, di bungkus kemudain di sterilisasi dengan autoclave bersama dengan bahan Pada yang akan digunakan yaitu media MHA, NA, Nacl 0,9% dan aquades dimasukkan kedalam Erlenmeyer kemudian disumbat dengan

kapas, setelah itu ditutup dengan aluminium foil. Alat dan bahan kemudian disterilkan pada autoklaf dengan suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

f. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)

- 1.) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- 2.) Media MHA yang akan digunakan dihitung dengan rumus sebagai berikut: MHA 38 gram/liter, atau 250 ml

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

- 3.) Kemudian serbuk media MHA ditimbang sebanyak 9,5 gram
- 4.) Setelah ditimbang serbuk MHA dilarutkan kedalam labu *Erlenmeyer* dengan 250 ml aquades
- 5.) Setelah itu dipanaskan diatas hot plate sambil diaduk hingga larut sempurna, jangan biarkan sampai mendidih.
- 6.) Tutup *Erlenmeyer* dengan kapas kering dan aluminium foil
- 7.) Selanjutnya disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian masukkan media yang telah disterilkan kedalam cawan petri sebanyak 15 sampai 20 ml dan biarkan hingga padat. Ketebalan media 4 mm

g. Pembuatan *Nutrient Agar* (NA)

- 1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- 2) Media (NA) yang digunakan ditimbang dengan rumus : NA 28 gram/liter atau 1000 ml, membuat media NA sebanyak 100 ml.

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

- 3) Serbuk media NA ditimbang sebanyak 2,8 gram.
- 4) Serbuk Media NA yang ditimbang dilarutkan dalam labu erlenmeyer dengan 100 ml aquades, ditutup dengan kapas
- 5) Kemudian panaskan di atas *hot plate* sambil di aduk hingga larut sempurna dan jangan sampai mendidih.

- 6) Standarisasi pH 7
  - 7) Selanjutnya tutup labu erlenmeyer dengan kertas atau aluminium foil.
  - 8) Kemudian disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
  - 9) Masukkan media ke dalam tabung reaksi dan biarkan dalam posisi miring sampai memadat.
- h. Pembuatan Ekstrak daun bandotan
- 1) Daun bandotan yang telah dipetik kemudian dicuci hingga bersih
  - 2) Keringkan lalu diremas dan dihaluskan hingga menjadi serbuk
  - 3) Serbuknya kemudian direndam menggunakan etanol 96% sebanyak 2 liter selama 3×24 jam, melalui penyaringan fitrat sehingga menghasilkan ekstrak cair.
  - 4) Setiap 6 jam sekali diaduk selama 5 menit
  - 5) Setelah 3×24 jam hasil meserasi disaring kemudian rendaman menggunakan corong untuk memisahkan ampas dan fitrat sehingga menghasilkan ekstrak cair.
  - 6) Selanjutnya ekstrak daun bandotan tersebut di uap menggunakan rotary evaporator dengan suhu 60°C selama 1 jam hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang di peroleh sebanyak 41 gram
  - 7) Kemudian dibuat dalam konsentrasi yang berbeda yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.
- i. Pembuatan Konsentrasi Daun Bandotan

**Tabel 2.** Perbandingan Konsentrasi ekstrak daun bandotan dalam 1 ml

Konsentrasi	Ekstrak Daun Bandotan (b)	Pelarut DMSO
20%	0,2 gram	0,8 ml/ 800 mikron
40%	0,4 gram	0,6 ml/ 600 mikron
60%	0,6 gram	0,4 ml/ 400 mikron
80%	0,8 gram	0,2 ml/ 200 mikron
100%	1 gram	-

Dengan rumus pengenceran :

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

Keterangan:

b : Gram/ massa ekstrak

v : Volume pengenceran

% : Variasi konsentrasi

j. Peremajaan Bakteri

Bakteri yang digunakan sebelumnya telah di lakukan peremajaan terlebih dahulu, untuk mendapatkan bakteri yang muda dan tidak terkontaminasi. Peremajaan bakteri dilakukan di media NA. Berikut cara peremajaan bakteri

- 1) Peremajaan bakteri dilakukan pada media NA yang dimiringkan dalam tabung reaksi (NA miring).
- 2) Jarum ose diserilkan menggunakan pemanas Bunsen, lalu didiamkan beberapa saat. Setelah itu ambil satu cuplik ose dari cawan inokulasi bakteri, ambil bakteri pada bagian yang berbentuk titik.
- 3) Kemudian remajakan bakteri pada media agar NA miring, dengan cara menggoreskan bakteri dengan goresan zig zag di permukaan media NA miring.
- 4) Inkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C. Inkubasi dilakukan dengan tujuan untuk mengkondisikan lingkungan pada suhu optimum perkembangan bakteri sehingga dapat diketahui bahwa bakteri berkembang dengan baik.

k. Pembuatan Antibiotik *Cloramphenicol* (kontrol positif)

- *Cloramphenicol* 250 mg dibuat dengan konsentrasi 5%
- Timbang 0,25 gram *Cloramphenicol*
- kemudian dilarutkan dengan pelarut DMSO sebanyak 5 ml.

## 1. Pewarnaan Bakteri

Bakteri yang telah di remajakan di lakukan pewarnaan untuk membuktikan bahwa benar bakteri yang digunakan adalah bakteri yang di maksud dalam penelitian.

- 1) Dibuat preparat dengan cara menambahkan Nacl diatas gelas objek yang telah di strerilkan
- 2) Kemudian ambil sedikit bakteri dari media NA menggunakan ose yang telah dipanaskan. Biarkan ose dingin terlebih dahulu agar tidak mematikan bakteri
- 3) Buat diatas Nacl dengan cara melingkar diameter 2-3 cm
- 4) Fiksasi diatas api Bunsen hingga kering
- 5) Genangi dengan Gentian Violet selama 1 menit, cuci dengan air mengalir
- 6) Genangi dengan lugol selama 1 menit
- 7) Genangi dengan alcohol selama 30 detik
- 8) Cuci dengan air mengalir dan genangi dengan safranin selama 1 menit, lalu cuci dengan air mengalir
- 9) Keringkan dan periksa di mikroskop dengan perbesaran 100x

## 2. Analitik

- 1) Menyiapkan alat dan bahan
- 2) Bakteri diencerkan dengan mencampurkan 1 dosis suspensi bakteri *Esherichia coli* ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan Nacl.
- 3) Kemudian bakteri dimasukkan ke dalam media MHA
- 4) Setelah itu buat lubang pada media MHA yang telah diinokulasi bakteri dengan menggunakan tabung reaksi yang diameternya dapat disesuaikan seperti piring

- 5) Selanjutnya dimasukkan ekstrak daun bandotan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% kedalam setiap lubang pada setiap media MHA.
- 6) Lalu diinkubasi dalam incubator dengan suhu 37°C selama 2x24 jam.
- 7) Setelah 2x24 jam diamati dan diukur diameter zona transparan yang terbentuk disekitar lubang dengan menggunakan jangka sorong.

### 3. Pasca Analitik

#### 1) Pencatatan Hasil Penelitian

Pencatatan hasil penelitian dilakukan dengan mencatat semua aktivitas baik dalam bentuk tulisan maupun di ketik atau dalam bentuk grafik dan gambar dari hasil pengukuran atau pengamatan yang telah dilakukan.

Pencatatan hasil penelitian di tentukan dengan rumus:

$$\frac{D_v - D_c + (D_H + D_c)}{2}$$

Keterangan :

$D_v$  : Diameter vertikal

$D_H$  : Diameter Horizontal

$D_C$  : Diameter cakram

#### 2) Pelaporan Hasil Penelitian

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  $\geq 18$ .
- b) Tidak efektif : Ditandai dengan tidak terbentuknya zona hambat.

Adapun kriteria zona hambat meliputi :

1. Resisten :  $\leq 12$  mm

2. Intermediet : 13-17 mm
3. Sensitif :  $\geq 18$  mm (CLSI, 2021).

#### **F. Instrument Penelitian**

Instrumen penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah logbook (buku harian penelitian), pulpen, kamera, dan lembar hasil pengamatan yang digunakan pada saat penelitian.

#### **G. Jenis Data**

##### 1. Data Primer

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

##### 2. Data Sekunder

Data sekunder diperoleh melalui 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 *Escherichia coli*.

**J. Penyajian Data**

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