# BAB IV
# METODE PENELITIAN

## A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimen Laboratorium dengan menggunakan desain *One-Shot Case Study*.Dalam desain ini, penelitian yang dilakukan dengan memberikan perlakuan terhadap variabel *independent* yang diikuti dengan pengamatan terhadap variabel *independent*. Pada penelitian kelompok uji melibatkan 5 perlakuan yang masing-masing diberikan kandungan ekstrak daun bandotan pada tiapkonsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Adapun, kelompok kontrol terdiri dari *kloramfenikol* sebagai kontrol positif dan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) sebagai kontrol negatif.

## B. Tempat dan Waktu

1. Tempat penelitian
   a. Tempat pengambilan sampel daun bandotan (*Ageratum conyzoidesL*) dilakukan di Desa Nanga-nanga Kecamatan Kambu, Kota Kendari.
   b. Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Bina Husada Kendari.
2. Waktu penelitian

   Penelitian ini dilaksanakan pada 17 Februari-30 Juni 2024

## C. Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) yang digunakan adalah daun yang diambil berwarna hijau tua baik yang ada bunganya maupun tidak ada dengan panjang sekitar 1-10 cm dan lebar 0,5-7 cm serta tidak dalam kondisi rusak. Dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50℃ selama 150 menit dan diblender sampai membentuk serbuk selanjutnya dimaserasi menggunakan larutan etanol 96% selama 3 hari kemudian disaring dan diuapkan dengan *rotary evapator* pada suhu 40℃ sehingga diperoleh ekstrak daun dan dibuat konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%, yang kemudian diuji apakah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus sp.*

**D. Prosedur Pengambilan Data**

Data yang dikumpulkan mulai dari awal penyusunan proposal, dimana data yang dikumpulkan berasal darijurnal penelitian sebelumnya dan literatul yang mendukung penelitian ini.

**E. Instrument Penelitian**

Pada penelitian ini instrument yang digunakan yaitu lembar observasi pengumpulan data dengan cara melihat secara langsung objek yang akan diteliti yaitu dalam hal ini diameter zona hambat ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus sp* pada media MHA dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

**F. Prosedur Kerja Penelitian**

**1) Pra Analitik**

a. Persiapan sampel :Daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*)

b. Metode :*Difusi diskkirby bauer*

c. Prinsip :Cakram yang berisikan agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut, Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar.

d. Persiapan alat dan bahan yang akan digunakan :

1. Alat
    a. *Autoclave*
    b. Batang pengaduk
    c. Cawan petri
    d. Erlenmeyer
    e. Mikropipet
    f. Gelas ukur
    g. Gelas kimia
    h. Inkubator
    i. Jangka sorong
    j. Ose

k. Lampu spiritus
l. Oven
m. Pinset/penjepit
n. Rak tabung
o. Silider cup
p. Sendok tanduk
q. Spidol
r. Tabung reaksi
s. Neraca analitik
t. Pipet ukur
u. *Rotary evapator*
v. Tip biru
w. *Hotplate*
x. Gunting
y. Pipet tetes

2. Bahan
   a. Antibiotik *Chloramphenicol*
   b. *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO)
   c. Biakan bakteri *Bacillus sp*
   d. Daun tanaman bandotan (*Ageratum conyzoides L*)
   e. Kertas label
   f. Kertas saring
   g. Larutan etanol 96%
   h. Nacl 0,9%
   i. Aquadest
   j. Kapas alkohol dan kapas kering
   k. Aluminioum foil
   l. *Media Mueller Hilton Agar* (MHA)
   m. *Paper disk*
   n. Tisu

e. Sterilisasi alat penelitian

Alat-alat yang terbuat dari logam dan kaca serta memilik tingkat ketelitian yang rendah disterilkan dalam oven dengan suhu 180℃ selama 1,5-2 jam. Sedangkan alat-alat yang terbuat dari kaca atau plastik dengan tingkat ketelitian yang sangat tinggi disterilisasikan menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121℃ .

f. 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 larut sempurna, jangan sampai mendidih.
4. Tutup dengan aluminium foil dan sterilisasi media dalam autoklaf pada suhu 121℃ selama 15 menit.

g. Perbuatan media *Muller Hilton Agar* (MHA)

1. Siapakan alat dan bahan
2. Media MHA yang digunakan dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut: MHA sebanyak 38 gram per liter, atau setara dengan volume 200 ml.

$$gram\ MHA = \frac{38\ gram \times 200\ ml}{1000}$$

3. Jumlah serbuk media MHA yang sudah ditimbang 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. Media dipanaskan di atas *hotplate* hingga semua komponen media larut.
6. Tutup labu erlenmeyer dengan menggunakan kapas dan aluminium foil.

7. Setelah semua komponen larut media disterilkan di dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121℃.
8. Media lalu dihitung 15-25 ml ke dalam masing-masing cawan petri dalam keadaan aseptik.
9. Setelah itu media didinginkan dan dibiarkan memadat didalam cawan petri.
10. Setelah mengagar media dibungkus dengan kertas dengan posisi *plate* terbaik, diberi label lalu disimpan dilemari pendingin.

g. Perejamaan bakteri

Perejemaan bakteri dilakukan dengan keadaan aseptis didepan api Bunsen dengan menggunakan kawat ose. Media NA yang sudah disterilkan dengan menggunakan *autoclave* dituang kedalam tabung reaksi sebanyak ±5 mL setelah itu dimiringkan sampai memadat, selanjutnya bakteri *Bacillus sp* dari biakan murni diambil 1 ose dan diinokulasikan dengan menggunakan metode gores pada media NA miring dan diinkubasi pada suhu 37℃ selama 24 jam untuk mendapatkan bakteri murni.

h. Pembuatan suspensi bakteri uji

1. Biakan bakteri diambil dengan menggunakan kawat ose
2. Kemudian disuspensikan dalam 10 ml Nacl 0,9 dalam tabung reaksi steril lalu dan dihomogenkan sesuai standar Mc. Farland 0,5 yang ditandai dengan terbentuknya kekeruhan setelah disuspensi.

i. Pembuatan larutan Mc Farland

1. Campurkan 9,5 ml larutan H2SO4 1% dengan 0,5 ml larutan $BaCI_2$ 1%.
2. Dihomogenkan dan menjadi perbandingan suspensi bakteri

j. Pembuatan antibiotik (*Chloramphenicol*)

1. *Chloramphenicol* sebanyak 250 mg Dibuat konsentrasi 5% dengan menimbang *Chloramphenicol* sebanyak 0,05 gram

2. Lalu dilarutkan kedalam 5 ml DMSO sehingga diperoleh *Chloramphenicol* 5%.

k. Pembuatan ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*)

1. Disiapkan alat dan bahan
2. Daun bandotan ditimbang sebanyak 1000 gram, lalu dioven hingga kering selama 24 jam dengan suhu 50℃, kemudian dihaluskan menggunakan blender
3. Kemudian serbuk kering ditimbang sebanyak 500 gram kemudian dimasukkan ke dalam maserator dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 3500 ml atau serbuk terendam dengan sempurna kemudian diaduk sehingga homogen.
4. Diamkan selama 3 hari dan diaduk setiap 24 jam
5. Setelah 3 hari, dilakukan penyangan dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan fitrat dan ampas.
6. Hasil saringan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40℃ sehingga di dapatkan ekstrak kental
7. Pembuatan Konsentrasi Daun bandotan

   Ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) dibuat dalam 5 varian konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% Volume ckstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) yang sambil dihitung dengan rumus pengenceran sebagai berikut :

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

Keterangan:

% = Variasi Konsentrasi (Konsentrasi Akhir)

b = Massa Ekstrak

v = Volume Pengenceran

**Tabel 2. Volume pengenceran konsentrasi ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) pada masing-masing konsentrasi dalam 10 ml DMSO.**

| No | Konsentrasi Stok (M1) | Volume Ekstrak Daun Bandotan | Volume DMSO Yang Ditambahkan | Konsentrasi Akhir (M2) | Volume Akhir (V2) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 100% | 0,2 gr | 0,8 ml | 20 % | 1 gr |
| 2. | 100 % | 0,4 gr | 0,6 ml | 40 % | 1 gr |
| 3. | 100% | 0,6 gr | 0,4 ml | 60 % | 1 gr |
| 4. | 100% | 0,8 gr | 0,2 ml | 80 % | 1 gr |
| 5. | 100% | 1 gr | - | 100 % | 1 gr |

8. Pewarnaa Bakteri Uji
    a. Siapkan kaca objek yang bersih kemudian lakukan pemijaran jarum ose lalu dinginkan.
    b. Teteskan Nacl 0,9% ada kaca objek gelas kemudian ambil 1 ose steril bakteri *Bacillus sp* lalu sebar setipis mungkin membentul lingkaran.
    c. Lakukan fiksasi dengan cara melewatkan preparat diatas api bunsen sampai kering.
    d. Genangi preparat dengan gentian violet selama 3 menit kemudian bilas dengan air mengalir.
    e. Genangi dengan lugol selama 2 menit kemudian bilas dengan air mengalir.
    f. Genangi dengan alkohol aseton hingga jernih kemudian bilas lagi dengan air mengalir.
    g. Genangi dengan safranin selama 1 menit lalu bilas dengan air mengalir.
    h. Keringkan dan periksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x

**2) Analitik**

Langkah-langkah untuk menguji kemampuan penghambatan dari ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) adalah sebagai berikut.

a. Masing-masing daerah cawan petri diberi label
b. Bakteri *Bacillus sp* diencerkan dengan mencampur 1 ose suspensi bakteri ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9%, yang telah di standarisasi sesuai konsentrasi 0.5 Mc Farland.
c. Selanjutnya, bakteri yang telah diencerkan dioleskan ke dalam media MHA.
d. Buat lubang di media MHA yang telah diinokulasi dengan bakteri menggunakan tabung yang diameternya disesuaikan seperti *paper disk.*
e. Selanjutnya ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% dimasukkan ke dalam setiap lubang pada media MHA.
f. Cawan petri kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37℃ selama 24 jam.
g. Setelah itu, dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona bening (*clear zone*) yang terbentuk di sekitar lubang menggunakan jangka sorong.

**3) Pasca Analitik**

a. Pencatatan hasil penelitian

Pencatatan hasil penelitian merupakan hasil penelitian yang dilakukan pencatatan suatu aktivitas dalam bentuk tulisan baik diketik maupun ditulis dengan atau dalam bentuk grafik atau 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. 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 (*Ageratumconyzoides L*) yang hambatnya dalam kategori ≥ 14 mm.

4) Kurang efektif adanya zona hambat

Ditandai dengan ekstrak daun bandotan (*ageratumconyzoides L*) yang daya hambatnya dalam kategori Intermediet 15-19 mm.

5) Tidak efektif adanya zona hambat

Dintadai dengan ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) yang daya hambatnya dalam kategori Resisten ≤ 20 mm atau tidak terbentuk zona bening di sekitar lubang sumuran ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*).

b. Dokumentasi hasil penelitian

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

c. Pelaporan hasil

Pelaporan hasil setelah dilakukan pengukuran dan pengamatan, hasil penelitian dilaporkan berdasarkan hasil pengukuran yang dijadikan sebagai hasil penelitian.

## G. Jenis Data

1. Data Primer

   Data primer dalam penelitian ini diperoleh langsung dari hasil pengamatan Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides L*) terhadap *Bacillus sp*.

2. Data Sekunder

   Data sekunder adalah data yang dikumpulkan dari hasil penelitianterdahulu dan dari buku-buku yang dipublikasikan.

## 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. Mentabulasi *(tabulating*) merupakan kelanjutan langkah *coding* dalam mengelompokkan data kedalam suatu data tertentu menurut sifat-sifat yang dimiliki sesuai dengan tujuan penelitian.

## I. Analisis Data

Analisis ini dilakukan secara deskriptif berdasarkan kategori zona hambat sensitif ≥ 14 mm, intermediet 15-19 mm, dan resisten ≤ 20 mm.

## J. 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 *Bacillus sp*.