

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian experimental Laboratorium dengan desain yang digunakan *one-shot study*. Desain penelitian ini adalah menggunakan satu kelompok tanpa kelompok pembanding. Pada penelitian ini kelompok uji dilakukan dengan 5 kelompok masing-masing diberikan ekstrak daun bandotan pada tiap konsentrasi 20%,40%,60%,80%,100%. Pada kelompok terdiri dari control positif yaitu *chloramphenicol* dan Kontrol negatif yaitu *Dimetil sulfoxide* (DMSO).

B. Tempat Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini telah di laksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Bina Husada Kendari Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Mei-juni 2024

C. Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) yang di ambil. Jl. Haluoleo Btn Haluoleo Garden Kec.Kambu Kota Kendari. Daun bandotan yang digunakan sebanyak 500gram kemudian 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 di olah dan dicatat.

E. Prosedur Penelitian

1. Pra Analitik

- a. Sampel: Daun Bandotan Segar
- b. Metode: Difusi *kirby bauer*

- c. Prinsip: Metode difusi *kirby bauer* adalah mendifusikan sejumlah senyawa antibakteri pada media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri.
- d. Persiapan alat dan bahan.

1) Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Tabung reaksi
- Bunsen
- Mikropipet
- Cawan petri
- Rak tabung
- Gelas kimia
- Gelas ukur
- *Ose*
- *Autoclave*
- *Colony counter*
- Tisu
- *Erlenmeyer* 100 ml
- Spatula besi
- Korek api
- Kamera
- *Hot plate*
- Neraca analitik
- Pengukur waktu
- *Blender*
- Jangka sorong
- Tabung durham
- Inkubator
- Batang pengaduk
- Vial

- *Laminar air flow*
- Corong *Buchner*
- Shaker
- Pinset
- *drigalski spatula*
- *Paper disks*
- Mikroskop
- Pipet tetes
- Objek glass

2) Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

- Aquades steril
- Ekstrak daun bandotan
- Biakan bakteri *Proteus sp.*
- Etanol 96%
- Nacl 0,9%
- Kertas saring
- Aluminium foil
- *Media Mueller Hinton Agar (MHA)*
- *Media Nutrient Agar (NA)*
- *Dimetil Sulfoxide (DMSO)*
- Kapas
- Tip biru
- Kertas label
- Reagen getian violet
- Reagen lugol
- Reagen karbol fucshin
- Alkohol

e. Sterilisasi Alat dan Bahan

- Alat yang tahan terhadap suhu tinggi disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit dengan menggunakan autoklave.
- Alat-alat logam disterilkan dengan cara dipanaskan langsung dengan menggunakan api bunsen hingga terbentuk nyala pada logam.
- Alat yang tidak tahan terhadap suhu tinggi disterilkan dengan merendamnya dalam etanol 70%.
- Alat-alat yang digunakan harus dicuci dan dikeringkan terlebih dahulu
- Cawan petri dan ujung mikropipet di bungkus kertas.
- Alat di bungkus dengan kapas steril kemudian dibungkus menggunakan *aluminium foil*.
- Ose dan pingset di sterilkan dengan cara pemijaran.
- Bahan yang digunakan adalah benium MHA, akuades, NaCl 0,9% n, dimasukkan kedalam *Erlenmeyer*, lalu disumbat dengan kapas steril, lalu ditutup dengan *aluminium foil*
- Selanjutnya alat dan bahan disterilkan dalam *autoklave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

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

- Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- Media MHA yang digunakan ditimbang dengan rumus: MHA 38 gram/liter atau 200 ml
Gram MHA: $(38\text{gram} \times 250\text{ml})/1000\text{ml} = 9,5 \text{ gram}$
- Serbuk media MHA ditimbang sebanyak 9,5 gram.
- Serbuk Media MHA yang ditimbang dilarutkan dalam labu erlenmeyer dengan 250 ml aquades
- Kemudian panaskan di atas hot plate sambil di aduk hingga larut sempurna dan jangan sampai mendidih.
- Standarisasi pH 7

- Selanjutnya tutup labu *erlenmeyer* dengan kapas dan *aluminium foil*.
- Kemudian disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

g. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

- Ditimbang media NA sebanyak 2,8gram lalu dimasukkan kedalam Erlenmeyer kemudian dilarutkan kedalam 100ml aquadest, ditutup dengan kapas.
- Dipanaskan media diatas hot magnetic stirrer, diaduk dengan menggunakan stir bar hingga serbuk larut sempurna.
- Disterilkan media didalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, media NA siap digunakan.

h. Pembuatan Ekstrak daun bandotan

- Menimbang sebanyak sebanyak 500gram pada neraca analitik dan dicuci bersih.
- Kemudian keringkan, dan di haluskan menggunakan blender sampai menjadi serbuk.
- Serbuk direndam dalam etanol 96% sebanyak 600 ml selama 3x24 jam, melalui penyaringan filtrat daun bandotan ini didapatkan.
- Aduk tiap 6 jam sekali selama 5 menit.
- Setelah 3x24 jam saring menggunakan corong untuk memisahkan ampas dan filtart sehingga menghasilkan ekstrak cair.
- Lalu di ekstrak daun bandotan dan di uap menggunakan rotary evaporator dengan suhu 60 °C selama 1 jam hingga diperoleh ekstrak kental.

i. Kemudian dibuat dalam konsentrasi yang berbeda yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, Pembuatan Konsentrasi Daun bandotan

Tabel 3. Bagan pembuatan konsentrasi daun bandotan

No	Konsentrasi	Massa Ekstrak Daun Bandotan	Pelarut DMSO
1.	20%	0,2 gram	0,8ml
2.	40%	0,4 gram	0,6ml
3.	60%	0,6gram	0,4ml
4.	80%	0,8gram	0,2ml
5.	100%	1 gram	-

Dengan rumus pengenceran:

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

Keterangan:

% = Variasi konsentrasi (Konsentrasi akhir)

b = Massa Ekstrak

v = Volume Pengenceran

j. Peremajaan Bakteri

Bakteri yang digunakan sebelumnya dilakukan peremajaan bakteri terlebih dahulu untuk meregenerasi bakteri agar diperoleh bakteri yang muda dan tidak terkontaminasi. Berikut Langkah-langkah peremajaan bakteri menurut (Helmi dkk, 2023).

- 1) Peremajaan bakteri dilakukan pada media NA yang dimiringkan dalam tabung reaksi (NA miring).
- 2) Jarum ose disterilkan menggunakan pemanas Bunsen, lalu didiamkan beberapa saat. Setelah itu diambil satu cuplik ose dari cawan inokulasi bakteri dengan goresan zig zag dipermukaan media NA miring.

- 3) Kemudian remajakkan bakteri pada media NA miring, dengan cara menggoreskan bakteri dengan goresan zig zag dipermukaan media NA miring
- 4) Inkubasi selama 24 jam dalam incubator 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 Chloramphenicol (Kontrol positif).

Chloramphenicol 250 mg di buat konsentrasi 5 %, timbang 0,25gram Chloramphenicol dan larutkan dengan pelarut DMSO sebanyak 5 ml.

l. Pewarnaan Gram

Setelah dilakukan peremajaan bakteri dilanjutkan dengan pewarnaan gram yang bertujuan untuk melihat kesesuaian bakteri yang dimaksud. Berikut Langkah-langkah pewarnaan gram.

- Buat preparate dengan cara melingkar diameter 2-3 cm
- Fiksasi diatas api Bunsen sampai kering
- Genangi dengan getian violet 3 menit, dicuci dengan air mengalir
- Genangi dengan lugol selama 2 menit
- Genangi alkohol hingga jernih
- Cuci dengan air dan genangi dengan fuchsin selama 1 menit, lalu cuci lagi dengan air
- Keringkan dan periksa dimikroskop dengan pembesaran 100 kali.

2. Analitik

- 1) Siapkan alat dan bahan
- 2) Masing-masing daerah dari cawan petri diberi label
- 3) Suspensi bakteri *Proteus* sp. Yang telah dibuat diambil sebanyak 0,1 ml kemudian disebar diatas permukaan media MHA dengan menggunakan drigalski spatula

- 4) Media yang sudah diinokulasi bakteri dibiarkan dan disimpan selama 5-15 menit yang bertujuan agar suspensi bakteri dapat meresap ke dalam media
- 5) Celupkan masing-masing *Paper disk* pada sari daun bandotan pada masing-masing konsentrasi (20%,40%,60%,80% dan 100%)
- 6) Letakkan kertas cakram (*Paper disk*) dengan pinset steril, atur jarak masing-masing *paper disk*
- 7) Bungkus cawan petri dengan menggunakan kertas, kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 2×24 jam
- 8) Amati ada tidaknya zona bening pada daerah sekitar *Paper disk*

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:

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

Keterangan:

Dv: Diameter vertikal

DH: Diameter Horizontal

DC: 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 ≥ 18 .

b) Tidak efektif: Ditandai dengan tidak terbentuknya zona hambat.

Adapun kriteria zona hambat meliputi:

1. Resisten: ≤ 12 mm
2. Intermediet: 13-17 mm
3. Sensitif: ≥ 18 mm (CLSI, 2021).

3) Dokumentasi Penelitian

Dokumentasi hasil kegiatan dalam bentuk foto atau gambar yang di ambil dari hasil pengamatan dan pengukuran dari bahan uji yang diteliti mulai dari pra analitik, analitik dan pasca analitik.

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. Data

1. Data Primer

Data primer pada uji daya hambat ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) terhadap bakteri *Proteus sp.* 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 *Proteus sp.*

J. Penyajian Data

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