

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

1. Jenis rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental murni (true experimental) yang dilakukan di laboratorium dengan tujuan menganalisis efektivitas senyawa antimikroba dari ekstrak kulit batang kesambi (*Schleichera oleosa*) terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* yang diisolasi dari pasien ISK. Pengujian dilakukan menggunakan metode uji daya hambat untuk mengetahui kemampuan ekstrak dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen secara in vitro.

2. Objek penelitian

- a. Subyek dalam penelitian ini mencakup kulit batang pohon kesambi yang terdapat di Kelurahan Liliba, Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur, sedangkan sampel penelitian berupa bagian kulit batang kesambi yang diambil dari populasi tersebut untuk dianalisis lebih lanjut di laboratorium.

- b. Teknik sampling

Penelitian ini menggunakan teknik purposive sampling, yaitu pengambilan sampel berdasarkan kriteria tertentu yang ditetapkan peneliti. Sampel berupa kulit batang pohon kesambi (*Schleichera oleosa*) dipilih dari pohon yang sehat dan tidak mengalami kerusakan,

sehingga dapat mewakili karakteristik sampel yang diperlukan untuk pembuatan ekstrak dan pengujian daya hambat terhadap *E. coli*.

B. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari hingga Maret tahun 2026 dan bertempat di Laboratorium Bakteriologi Program Studi Teknologi Laboratorium Medis dengan pengambilan sampel dilakukan dirumah sakit S.K Lerik.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Aktivitas daya hambat ekstrak kulit batang kesambi

2. Variabel terikat

Pertumbuhan bakteri *E. coli*

D. Batasan Istilah/Definisi operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

Pertumbuhan	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Pertumbuhan <i>E. coli</i>	Pertumbuhan <i>E. coli</i> setelah pemberian ekstrak kulit batang kesambi ditentukan melalui pengamatan terhadap	Pengamatan dilakukan secara visual terhadap tingkat kekeruhan media, kemudian dilanjutkan dengan uji	Keruh (+) = Menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Jernih (-) = Menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri	Nominal

Pertumbuhan	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
	tingkat kejernihan atau kekeruhan media setelah inkubasi	penegasan menggunakan media NA		
Konsentrasi ekstrak kulit batang kesambi	Konsentrasi ekstrak kulit batang kesambi yang digunakan untuk mengetahui kemampuan dalam menghambat pertumbuhan <i>E.coli</i>	Ekstrak kulit batang kesambi konsentrasi 1%, 5%, 20%, 40%, 60%, dan 80% diuji dengan metode dilusi cair untuk menentukan KHM, kemudian dilanjutkan dengan uji penegas pada media NA	Konsentrasi 1%, 5%, 20%, dan 40% menunjukkan pertumbuhan bakteri (keruh), sedangkan 60% dan 80% jernih. Pada uji penegas menggunakan media NA, konsentrasi 60% tidak menunjukkan pertumbuhan, sedangkan 80% menunjukkan pertumbuhan yang diduga akibat kesalahan teknis saat penggoresan	Rasio

E. Prosedur Penelitian

1. Persiapan penelitian

- a. Menyusun dan mengajukan proposal penelitian untuk kemudian memperoleh persetujuan dari dosen dosen pembimbing.
- b. Mengajukan permohonan serta mengurus persetujuan kode etik penelitian sesuai prosedur yang berlaku
- c. Mengurus izin pelaksanaan penelitian sebagai syarat administrasi sebelum kegiatan penelitian dilakukan

2. Pelaksanaan penelitian

- a. Peneliti menjelaskan tentang tujuan penelitian yang akan dilakukan.
- b. Peneliti menjelaskan prosedur pengambilan sampel urin.
- c. Peneliti menentukan waktu pengambilan sampel urin berdasarkan jadwal yang telah disepakati.

3. Sterilisasi alat

Alat- alat yang terbuat dari kaca terlebih dahulu dicuci hingga bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus menggunakan kertas buram sebelum disterilkan. Proses sterilisasi alat nonvolumetrik dari kaca dilakukan dengan oven pada suhu 160°C selama satu jam. Sementara itu, jarum ose dan pinset berbahan logam disterilkan melalui pemijaran langsung di atas nyala api. Adapun aquadest dan media yang telah dilarutkan dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang ditutup kapas dan dibungkus aluminium foil,

kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

4. Pembuatan ekstrak kulit batang Kesambi

- a. **Alat:** blender, erlenmeyer, neraca analitik, gelas ukur, gelas beaker, pipet tetes, pipet volume, spatula, batang pengaduk, rotary evaporator, magnetic stirrer DIY, gelas ukur, alumunium foil, kertas saring whatman, botol semprot, spektrofotometer UV-Visible dan Fourier Transfer Infrared (FTIR).
- b. **Bahan:** kulit batang kesambi (*Schleichera oleosa*), metanol 96%, n-Heksan, etil asetat, etanol 70%, aquadest, HCl pekat (p.a), H₂SO₄ 98% (p.a), silika gel G60, alumunium foil, serbuk Mg, FeCl₃ 10%, bakteri *Staphylococcus aureus*, ciprofloxacin, vitamin C (asam askorbat), lactoce broth dan DPPH.
- c. **Cara kerja :** Kulit batang kayu kesambi dibersihkan dari kotoran kemudian dikeringkan dan digiling menjadi bubuk. Bbubuk ini diayak menggunakan ayakan. Serbuk kulit kayu kesambi ditimbang seberat 300 gram, ditempatkan dalam wadah maserasi, dan dibasahi dengan etanol 96% sebelum ditambahkan sedikit demi sedikit hingga volume 3000 mL hingga sampel terendam, ditutup, dan didiamkan selama 3 x 24 jam pada suhu ruang dengan pengadukan berkala. Proses maserasi diulangi sebanyak lima kali. Ekstrak disaring, dan cairannya diuapkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak pekat, yang kemudian

ditimbang untuk menentukan rendemennya. Sebanyak 20 g ekstrak dilarutkan dalam 25 ml etanol 96% dan 25 ml air distilat. Fraksinasi pertama dengan 50 mL n-heksana diaduk selama 15 menit dengan pengaduk magnet sebelum didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Refraksi dilakukan dua kali lebih sering. Fraksi n-heksana yang larut kemudian dikumpulkan dan diuapkan, menghasilkan fraksi n-heksana. Jumlah etil asetat yang sama (1:1) digunakan untuk memfraksinasi fraksi n-heksana yang tidak larut. Selanjutnya, dua bagian yang sama dari fraksi etil asetat yang tidak larut dipisahkan. Fraksi etil asetat kemudian diperoleh dengan mengumpulkan dan menguapkan fraksi yang larut dalam etil asetat. Fraksi air kemudian diperoleh dengan mengumpulkan dan menguapkan fraksi yang tidak larut dalam etil asetat (Masduqi et al. 2025).

d. Pembuatan konsentrasi

Pembuatan konsentrasi dilakukan berdasarkan rumus pengenceran, yaitu sebagai berikut:

Rumus pengenceran:

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

Keterangan:

V1: Volume sebelum pengenceran

V2: Volume sesudah pengenceran

M1: Konsentrasi sebelum pengenceran

M2: Konsentrasi setelah pengenceran

Konsentrasi	Volume Ekstrak	Volume Pelarut
1%	0,15 ml	9,85 ml
5%	0,5 ml	9,5 ml
10%	1 ml	9 ml
20%	2 ml	8 ml
40%	4 ml	6 ml
60%	6 ml	4 ml
80%	8 ml	2 ml

Tabel 3. 2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Kulit Batang Kesambi

5. Pembuatan media

a. Pembuatan Nutrien Agar (NA)

Sebanyak 1000 mL aquades dimasukkan ke dalam beker gelas kemudian dipanaskan di atas hot plate hingga mencapai titik didih. Setelah itu, 40 gram bubuk Nutrient Agar (NA) ditambahkan sedikit demi sedikit sambil terus diaduk hingga seluruhnya larut. Ketika NA sudah benar-benar larut, medium diangkat dari pemanas dan dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer. Labu tersebut kemudian ditutup dengan sumbat kapas dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C

dengan tekanan 2 atm selama 35 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, medium NA dituangkan secara aseptik ke dalam 15 cawan petri steril (Tokan, Lika, & Ardan 2022).

b. Pembuatan Media Mac Conkey Agar (MCA)

Siapkan alat dan bahan yang diperlukan. Timbang Mac Conkey sebanyak 18,03 gram menggunakan timbangan analitik, lalu masukkan ke dalam erlenmeyer. Tuangkan aquades sebanyak 350 mL untuk melarutkan. Panaskan dan aduk hingga larutan mendidih dan rata. Ukur pH larutan tersebut agar mencapai pH 7. Sterilkan larutan dalam otoklaf dengan tekanan 0,5 atm dan suhu 121 derajat Celcius selama 15 menit. Setelah itu, tuangkan larutan ke dalam cawan petri, lakukan sebelum media mulai dingin dan mengental. Biarkan hingga media memadat dan siap digunakan (Artauli et al. 2023).

c. Pembuatan media EMBA

Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan. Mengambil 5,4 gram media EMBA lalu melarutkannya dengan aquades sebanyak 145 ml. Masukkan larutan tersebut ke dalam erlenmeyer, tutup mulut erlenmeyer dengan aluminium foil. Panaskan larutan di atas hot plate sampai larut secara sempurna. Sterilkan larutan tersebut dalam autoklav selama 15 menit dengan suhu 121 derajat Celsius. Setelah selesai, angkat dan tuangkan ke dalam cawan petri secukupnya. Biarkan larutan

dingin terlebih dahulu, lalu simpan dalam lemari pendingin (Mardiah 2017).

d. Pembuatan media MHA

Media MHA adalah media yang digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri. Pembuatan media ini dimulai dengan menimbang 1,7 gram MHA, lalu mencampurkannya ke dalam 40 ml air laut steril (80%) dan 10 ml aquades (20%). Campuran tersebut dipanaskan di atas hotplate dan diaduk menggunakan magnetic stirrer hingga mendidih. Setelah itu, media yang sudah merata disterilkan dengan menggunakan autoklav pada suhu 121°C selama 15 menit (Maarisit et al, 2021).

6. Identifikasi bakteri *E. coli* pada urine pasien ISK

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara mengumpulkan urine tengah aliran, dan sampel urine harus dibawa ke laboratorium dalam waktu 30 menit. Langkah berikutnya adalah menanam sampel pada media Chromagar dengan cara mengaduk rata sampel urine, membuka tutup botol urine, lalu menggunakan loop steril yang sudah diukur 1 mikroliter (0,001 ml) untuk menyelupkan secara vertikal sampai batas tertentu, setelah itu dikeluarkan dengan arah vertikal juga. Sampel urine ditanam pada media Chromagar Orientation secara aseptis dengan loop steril 1 mikroliter dengan cara membuat garis tengah pada media Chromagar Orientation dari atas ke bawah lalu menggosokkan urine secara merata dari bagian atas media ke seluruh permukaan agar, kemudian inkubasi selama 24 jam pada

suhu 37 derajat Celcius. Pengecekan hasil dilakukan pada media Chromagar Orientation, jika ada pertumbuhan kuman, maka dihitung jumlah koloni yang tumbuh pada media dan dilakukan pemeriksaan pengecatan gram terhadap koloni yang dicurigai. Lalu dilakukan penanaman kuman yang dicurigai pada media darah atau Mac Conkey, dan inkubasi pada suhu 37 derajat Celcius selama 18 hingga 24 jam. Pemeriksaan terhadap koloni yang tumbuh dilakukan dengan cara mengidentifikasi koloni yang dicurigai pada media Mac Conkey. Berdasarkan hasil pengecatan gram, langkah selanjutnya adalah menggunakan kartu identifikasi Gram Positif (GP) dan kartu Gram Negatif (GN), lalu dilanjutkan dengan penggunaan alat Vitek (Megawati, Prasetya, & Sanjiwani 2023).

7. Pembuatan suspensi bakteri

Larutan suspensi bakteri dibuat dengan mengambil 1 tetes bakteri, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl fisiologi 0,9%, lalu diambil biakan murni dalam tabung reaksi dan dikocok hingga merata, kemudian dihomogenkan dengan standar McFarland (Shindi et al,2021).

a. Pembuatan kontrol positif dan negatif

Larutan kontrol positif dibuat dari tablet obat Ciprofloxacin 500 mg. Caranya adalah dengan mengambil satu tablet Ciprofloxacin lalu menghancurkannya. Setelah itu, diambil 65 mg dari tablet tersebut dan

dilarutkan dalam 50 ml air suling. Kemudian diambil 1 ml larutan tersebut dan ditambahkan air suling hingga volumenya mencapai 10 ml, sehingga diperoleh larutan ciprofloxacin dengan konsentrasi 5 mikrogram per 50 mikroliter. Larutan ini digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian. Untuk larutan kontrol negatif, digunakan hanya air suling (Wangkanusa, Lolo, & Wewengkang 2016).

8. Uji efektivitas daya hambat ekstrak kulit batang kesambi terhadap bakteri *E. coli*

Cara kerja:

Pengujian kadar hambat minimum dilakukan menggunakan metode turbidimetri yang mengacu pada penelitian terdahulu dengan beberapa penyesuaian sesuai kebutuhan penelitian.

- a. Suspensi bakteri *E.coli* disiapkan menggunakan media kaldu steril hingga mencapai tingkat kekeruhan yang setara dengan standar McFarland 0,25 kemudian di inkubasi selama 4-8 jam.
- b. Ekstrak kulit batang kesambi dibuat dalam beberapa variasi konsentrasi, yaitu 1%, 5%, 10%, 20%, 40%, 60%, dan 80%. Masing-masing konsentrasi dilarutkan menggunakan aquades steril, kemudian disaring hingga diperoleh larutan yang homogen dan bebas dari partikel
- c. Sebanyak 7 tabung reaksi steril disediakan untuk perlakuan dan kontrol. Ke dalam setiap tabung dimasukkan 1 ml ekstrak sesuai

konsentrasi yang telah ditentukan. Selanjutnya ditambahkan 1 ml suspensi bakteri *E.coli* yang telah diinkubasi sebelumnya. kemudian semua tabung diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-48 jam

- d. Setelah masa inkubasi selesai, setiap tabung diamati untuk mengetahui adanya pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan ditentukan berdasarkan tingkat kekeruhan media, di mana media yang tampak keruh menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri, sedangkan media yang tetap jernih menunjukkan adanya aktivitas penghambatan oleh ekstrak kulit batang kesambi.

9. Uji daya hambat atau sensitivitas.

Pada pengujian daya hambat atau sensitivitas, terdapat dua metode yang umum digunakan, yaitu metode difusi dan metode dilusi. Metode difusi adalah cara yang sering digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri. Cara kerjanya adalah dengan membiarkan senyawa antibakteri menembus ke dalam media padat yang sudah ditanami mikroba uji. Hasil yang dilihat adalah adanya atau tidaknya area yang jernih di sekitar kertas cakram, yang menunjukkan adanya zona hambat pertumbuhan bakteri (Nurhayati *et al*, 2020). Terdapat tiga metode difusi yang digunakan, yaitu metode silinder, metode cakram kertas, dan metode sumur. Metode silinder digunakan untuk membandingkan area penghambatan pertumbuhan mikroorganisme yang terpapar berbagai dosis antibiotik yang diuji dengan area penghambatan dari antibiotik standar pada lempeng agar. Metode

cakram kertas menggunakan cakram kertas yang telah direndam dengan zat antimikroba untuk mengetahui tingkat aktivitas antibakteri. Metode sumur dilakukan dengan membuat sumur-sumur pada media agar yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme, dan agen antibakteri yang diuji ditempatkan di dalam sumur-sumur tersebut (Disk et al. 2023). Sementara metode dilusi merupakan salah satu metode pengujian aktivitas antimikroba yang digunakan untuk menilai potensi suatu senyawa terhadap pertumbuhan mikroorganisme melalui penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode ini terbagi menjadi dua jenis, yaitu dilusi cair dan dilusi padat (Pareda, Edy, & Lebang 2020). Dilusi cair digunakan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM), sedangkan dilusi padat digunakan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Pada metode dilusi cair, agen antimikroba dibuat dalam serangkaian pengenceran pada media cair kemudian diinokulasikan dengan mikroorganisme uji. Sementara itu, metode dilusi padat dilakukan dengan menambahkan agen antimikroba ke dalam media agar, kemudian mikroorganisme uji diinokulasikan pada media tersebut. Salah satu keunggulan metode dilusi adalah satu seri konsentrasi agen antimikroba dapat digunakan untuk menguji beberapa jenis mikroorganisme, sehingga pengujian menjadi lebih efisien dalam menentukan aktivitas antimikroba suatu senyawa (Arinda et al. 2019).

F. Analisi Hasil

Hasil pengamatan tingkat kekeruhan pada berbagai konsentrasi ekstrak ditabulasikan dalam tabel, kemudian diberi narasi dan di interpretasikan.