

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

1. Jenis rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan desain ekperimental laboratorium murni untuk menilai kemampuan ekstrak ekstrak kulit batang faloak terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli* yang diisolasi dari feses pasien diare.

2. Objek penelitian

a. Objek penelitian ini mencakup kulit batang faloak, sedangkan sampel penelitian berupa bagian kulit batang faloak yang diambil dari Kelurahan Tofa, Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur.

b. Teknik Sampling

Sampel penelitian ditentukan dengan teknik purposive sampel berdasarkan kriteria khusus yang telah disesuaikan dengan tujuan penelitian.

B. Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga Maret Tahun 2026, bertempat di Laboratorium Bakteriologi Program Studi Teknologi Laboratorium Medis, dengan pengambilan sampel dilakukan di rumah sakit SK. Lerik

C. Variabel Penelitian

a. Variabel bebas

Daya hambat ekstrak kulit batang faloak.

b. Variabel terikat

Pertumbuhan bakteri *E.coli*.

D. Defenisi operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

Variabel	Defenisi Operasional	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i>	Pertumbuhan <i>E.coli</i> setelah diberikan ekstrak kulit batang faloak yang diamati berdasarkan kekeruhan media setelah inkubasi	Pengamatan secara visual terhadap kekeruhan media dan uji penegasan pada media NA	Keruh (+)= Terdapat pertumbuhan bakteri. Jernih (-)= tidak terdapat pertumbuhan bakteri	Nominal
Konsentrasi ekstrak kulit batang faloak	Konsentrasi ekstrak kulit batang faloak yang digunakan untuk menguji kemampuan menghambat pertumbuhan <i>E.coli</i>	Ekstrak dibuat dengan konsentrasi 1,5%, 5%, 20% , 40%, 60%, dan 80%, kemudian diuji dengan metode dilusi cair (MIC), dan dilakukan uji penegasan menggunakan media NA	Pada konsentrasi 60% dan 80% tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Sedangkan pada konsentraaasi 1,5%, 5%, 20%, dan 40% terdapat pertumbuhan bakteri	Rasio

E. Prosedur penelitian

1. Persiapan Penelitian

- a. Menyusun proposal penelitian serta memperoleh persetujuan dari dosen pembimbing.
- b. Mengajukan dan mengurus kelayakan etik penelitian.
- c. Mengurus perizinan pelaksanaan penelitian.

2. Pelaksanaa penelitian

- a. Peneliti memberikan penjelasan mengenai tujuan penelitian.
- b. Peneliti menyampaikan prosedur pengambilan spesimen feses.
- c. Peneliti menentukan waktu pelaksanaan pengambilan spesimen feses.

3. Sterilisasi alat

Semua alat berbahan kaca terlebih dahulu dibersihkan, dikeringkan, lalu dibungkus menggunakan kertas buram. Proses sterilisasi untuk alat-alat kaca nonvolumetric dilakukan dengan menggunakan oven pada suhu 160°C selama 1 jam. Sementara itu, alat logam seperti itu, alat logam seperti jarum ose dan pinset disterilkan dengan teknik pemijaran. aquadest dan media yang telah dilarutkan dimasukkan ke erlenmeyer, ditutup rapat dengan kapas serta aluminium foil, kemudian disterilkan dalam autoklat pada suhu 121°C dengan tekanan 1 jam selama 15 menit(Jungjunan *et al.*, 2023).

4. Pembuatan ekstrak kulit batang faloak

a. Pengambilan sampel

Kulit faloak diperoleh dari pohon faloak yang telah tua, kemudian dibersihkan dengan cara dicuci dan dikeringkan. Setelah kering, kulit

faloak dipotong kecil-kecil dan dihaluskan dengan cara ditumbuk hingga menjadi serbuk.

b. Alat: Autoclave, batang pengaduk, beaker glass 50 mL dan 100 mL, bejana maserasi, otol coklat steril, cawan petri, cawan porselin, colony counter, disposable steril 5 ml, gelas ukur 25 mL dan 100 mL, hot plate, waterbath, incubator, kain jangka sorong, kassa steril, kapas, karet hisap, labu erlenmeyer 250 mL, labu ukur 5 mL dan 10 mL, laminar air flow, lampu Bunsen, silinder, pinset, pipet ukur, 0,1 mL, 5 mL, pipet volume 1 mL, dan 10 mL, tabung reaksi.

c. Bahan: Spesimen *E.coli* dari feses diare, Ekstrak kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br.) (1,5%, 5%, 20%, 40%, 60%, 80%), Muller Hilton Agar (MHA), NaCL 0,9%, larutan etanol 70%, DMSO, Aquadest.

d. Cara kerja: Kulit batang faloak yang telah dikumpulkan dibersihkan dari kotoran, kemudian dicuci hingga bersih dan dikeringkan. Setelah kering, kulit batang dirajang menjadi potongan kecil lalu dihaluskan dengan cara ditumbuk hingga menjadi serbuk. Serbuk yang diperoleh kemudian ditempatkan ke dalam wadah maserasi dan didiamkan selama 3 x 24 jam pada suhu kamar dengan pengadukan sesekali. Setelah proses maserasi selesai, campuran disaring untuk memisahkan filtrat dari ampas. Filtrat kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental tersebut selanjutnya ditimbang untuk mengetahui rendemen, dan kemudian

diencerkan menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 1,5%, 5%, 20%, 40%, 60% dan 80%, untuk digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap *E.coli* (Masduqi et al., 2025).

e. Pembuatan konsentrasi

Pembuatan konsentrasi ekstrak dilakukan dengan menggunakan rumus pengenceran, yaitu sebagai berikut:

$$V1 \times M1 = V2 \times M2 \text{ (Klau et al., 2021).}$$

Keterangan:

V1: Volume sebelum pengenceran

V2: Volume sesudah pengenceran

M1: Konsentrasi sebelum pengenceran

M2: Konsentrasi sesudah pengenceran

Tabel 3. 2Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Kulit Batang Faloak

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

5. Pembuatan Media

a. Pembuatan Nutrien Agar (NA)

Sebanyak 100 mL aquades dipanaskan dalam beaker glass menggunakan hot plate hingga mencapai titik didih. Selain itu, 40 gram bubuk Nutrient Agar ditambahkan sedikit demi sedikit sambil terus diaduk sampai seluruh bahan larut sempurna. Larutan NA yang telah homogen kemudian dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer, ditutup dengan kapas, dan selanjutnya disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 35 menit. Usai proses sterilisasi, media dituangkan secara aseptik ke dalam 15 cawan petri steril hingga mengeras dan media siap digunakan (Nikmah et al., 2022).

b. Pembuatan Media Mac Conkey Agar (MAC)

Alat dan bahan terlebih dahulu disiapkan. Sebanyak 10,03 g bubuk Mac Conkey Agar ditimbang menggunakan timbangan analitik, kemudian dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan dilarutkan dengan 350 mL aquades. Campuran tersebut dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih dan tercampur homogen. Setelah itu, pH media diukur dan berada pada pH 7. Media kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 0,5 atm selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi, medium dituangkan secara aseptik ke dalam cawan petri sebelum mengental. Media dibiarkan hingga memadat dan siap digunakan (Toruan et al., 2023).

c. Pembuatan Media Eosin Methylen Blue Agar (EMBA)

Media EMBA ditimbang sebanyak 18,75 gram kemudian dilarutkan dalam 800 mL aquades didalam gelas beaker sambil diaduk hingga seluruh komponen tercampur merata. Setelah larut campuran tersebut dipindahkan kedalam wadah yang sesuai, lalu disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk memastikan media bebas dari kontaminan. Setelah proses sterilisasi selesai, media dituangkan secara aseptik kedalam cawan petri sebelum mengental, kemudian dibiarkan memadat hingga siap digunakan untuk proses inokulasi (Hadiansyah et al., 2021).

d. Pembuatan Media Muller Hilton Agar (MHA)

Pembuatan media MHA diawali dengan menimbang 3,8 gram media, kemudian memasukkannya ke dalam Erlenmeyer 250 mL yang telah steril. media tersebut dilarutkan dengan 100 mL aquades, lalu dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk sampai homogen. setelah mencapai titik didih, bagian atas Erlenmeyer ditutup menggunakan kain kasa berisi kapas. Selanjutnya, media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, Erlenmeyer dikeluarkan dan media dibiarkan mendingin hingga hingga mencapai suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Media yang telah hangat kemudian dituangkan kedalam cawan petri steril masing-masing sebanyak kurang lebih 20-25 mL, lalu dibiarkan memadat. Setelah media dalam cawan petri mengeras, media

siap digunakan untuk pengujian(Wahyu Margi Sidoretno, 2021).

6. Identifikasi Bakteri *E.coli* pada Fases Pasien Diare

Sampel feses pasien diare yang telah dimasukkan ke dalam media transport Carry-Blair kemudian diinokuasikan ke dalam media pengaya Brain Heart Infusion Broth (BHIB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah proses pengayaan, biakan diambil satu ose dan ditanam pada media isolasi Nutrient Agar (NA), salmonella Shigella Agar (SSA), serta sprbitol MacConkey Agar (SMAC). Seluruh media tersebut kembali diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam untuk mengamati pertumbuhan koloni. Koloni yang muncul pada media isolasi selanjutnya diperiksa secara mikroskopis melalui pewarnaan Gram untuk melihat karakteristik bakteri. Pada pewarnaan ini, *E.coli* tampak sebagai langkah konfirmasi, sehingga biakan yang digunakan pada pengujian daya hambat benar-benar merupakan *E.coli*(Rizky et al., 2021).

7. Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri disiapkan dengan mengambil satu ose bakteri kemudian memasukkannya kedalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCL fisiologis 0,9%. Biakan tersebut kemudian dikocok hingga tercampur homogen. Setelah itu, kekeruhan suspensi disesuaikan dengan standar McFarland untuk memperoleh konsentrasi bakteri yang seragam(Rizki et al., 2021).

a. Pembuatan kontrol positif dan negative

Larutan kontrol positif disiapkan menggunakan tablet Ciprofloxacin 500 mg. Satu tablet digerus hingga halus, kemudian ditimbang sebanyak 65 mg dan dilarutkan dalam 50 mL aquades. Setelah larut, diambil 1 mL larutan tersebut dan ditambahkan aquades sampai volume 10 mL untuk memperoleh konsentrasi 50 μ L. Larutan digunakan sebagai kontrol positif. Sementara itu, aquades digunakan sebagai kontrol negatif (Wangkanusa et al., 2016).

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

Cara kerja:

Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak daun kelor terhadap bakteri *E coli* dilakukan dengan metode dilusi cair (turbidimetri) mengacu pada (Subekti & Sim, 2018) yang dimodifikasi.

- a. Suspensi bakteri *E.coli* disiapkan setara standar McFarland 0,25 dan 0,5, kemudia diinkubasi 4-8 jam.
- b. Ekstrak kulit batang faloak dibuat dalam berbagai konsentrasi (1,5%, 5%, 20%, 40%, 60% dan 80%) menggunakan aquades steril atau DMSO.
- c. Sebanyak 6 tabung reaksi steril disiapkan, masing-masing diisi ekstrak dan suspensi bakteri, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-48 jam.
- d. Hasil diamati berdasarkan tingkat kekeruhan media. Media keruh

menunjukkan pertumbuhan bakteri, sedangkan media jernih menunjukkan adanya terhambatnya pertumbuhan bakteri.

Uji Daya Hambat atau Sensitivitas

Uji daya hambat atau uji sensitivitas merupakan metode untuk menilai respon pertumbuhan suatu mikroorganisme setelah diberi perlakuan dengan agen antimikroba. Pada pengujian ini, yang diamati adalah kemampuan senyawa antibakteri dalam menekan atau menghambat pertumbuhan bakteri uji. Suatuagen antimikroba dianggap efektif apabila mampu menghasilkan zona hambat atau menunjukkan adanya penurunan pertumbuhan bakteri pada area sekitar aplikasi senyawa tersebut. Metode pengujian antibakteri pada umumnya dikelompokkan kedalam dua Teknik utama, yaitu metode difusi dan metode dilusi(Retnaningsih et al., 2019). Dalam penelitian ini, teknik yang digunakan adalah teknik dilusi.

Metode dilusi:

Metode dilusi cair merupakan metode yang digunakan untuk menentukan nilai Minimum Inhibitory Concentration dengan menggunakan media cair yang telah dicampurkan dengan suspensi bakteri dan ekstrak uji pada berbagai konsentrasi. Metode ini dilakukan untuk mengamati perubahan media setelah inkubasi, yaitu adanya kekeruhan atau kejernihan sebagai indikator pertumbuhan bakteri.

Pada penelitian ini, pengujian dilakukan menggunakan media Nutrient Broth (NB) yang dicampur dengan ekstrak kulit pohon fal oak dan suspensi bakteri *E.coli*. etelah diinkubasi selama 24 jam hasil diamati

berdasarkan kekeruhan pada media. Untuk memastikan hasil pengujian MIC, suspensi dari masing-masing konsentrasi kemudian diinokulasikan kembali pada media Nutrient Agar (NA) guna melihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri (Nurul et al., 2023).

F. Analisis Hasil

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