

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis penelitian true experimental laboratories yang bertujuan mengetahui bagaimana efektivitas daya hambat antimikroba ekstrak biji kelor (*M. oleifera*) dalam menghambat bakteri *E. coli* dari isolasi urine pasien infeksi saluran kemih.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Kampus Prodi Teknologi Laboratorium Medis pada bulan Februari – April 2025.

C. Variabel Penelitian

1. Varibel Bebas

Ekstrak biji kelor (*M. oleifera*) dengan konsentrasi 80%, 60%, 40%, dan 20%

2. Variabel Terikat

Diameter zona hambat yang terbentuk dari ekstrak biji kelor terhadap bakteri *E. coli* yang diisolasi dari urine pasien infeksi saluran kemih.

D. Sampel dan Populasi

Sampel dan populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Biji kelor (*M. oleifera*) di Kota Kupang.

E. Definisi Operasional

TABEL 3.1 DEFINISI OPERASIONAL

Variabel	Definisi	Parameter	Hasil Ukur	Skala Ukur
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> yang diisolasi dari sampel urine pasien ISK yang diinokulasi pada media Mac Conkey Agar dan Media Eosin Methylene Blue Agar serta pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan gram negatif	Inokulasi pada Media Selektif Mac Conkey Agar (MCA). Media Eosin Methylene Blue Agar (EMBA). pemeriksaan secara mikroskopis dengan Pewarnaan Gram negatif, Uji Biokimia dengan Uji IMVIC dan Gula-gula.	Pada media EMBA. Perubahan warna koloni kehijau-hijauan-hitam, metalik, koloni sedang. Smooth, keping. Pada perwarnaan gram, berbentuk batang pendek, berwarna merah. Pada media IMVIC (perubahan warna) +, +, +, dan media Gula-gula (adanya gas di dalam tabung durham)	Nominal
Biji kelor	Biji kelor tanaman khas NTT, yang di ambil di Tuak Daun Merah, Kecamatan Oebobo, Kota Kupang, Nusa Tenggara Timur.	Pengambilan Biji kelor pada pagi hari dan diambil polong yang tua.	Didapat Biji kelor yang matang berwarna hitam kecokelatan dan bebas dari hama.	Nominal
Simplisia Biji Kelor	Simplisia biji kelor adalah biji kelor yang dikumpulkan dari buah yang telah tua, dibersihkan dari kotoran dan sisa kulit buah, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan di oven hingga kadar airnya	Metode Simplisia	Serbu	Nominal

	berkurang, lalu dihaluskan		k simplisia biji kelor	
Metode Maserasi	Metode maserasi adalah proses perendaman simplisia biji kelor ke dalam pelarut etanol 70%.	Metode maserasi	Ekstraksi Biji kelor	Nominal
Konsentrasi ekstrak biji kelor	Ekstrak biji kelor yang dibuat dengan konsentrasi 80%, 60%, 40%, dan 20%.	Rumus Pengenceran	Terdapat 4 konsentrasi ekstrak biji kelor yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80%.	Nominal
Aktivitas daya hambat	Diameter zona bening yang terbentuk di sekitar cakram pada media MHA yang dihasilkan dari ekstrak biji kelor yang menandakan adanya aktivitas daya hambat menggunakan metode difusi agar.	Metode Difusi Agar	Sampel: Ekstrak biji kelor. Interpretasi daerah hambatan pertumbuhan bakteri mengacu pada kategori daya hambat menurut David-Stout ≥ 20 mm: Sangat Kuat 10-22mm: Kuat 5-10 mm: Sedang ≤ 5 mm: Lemah(Sakul et al., 2020) Control Positif: Antibiotik Ciprofloxacin. Interpretasi daerah hambatan bakteri mengacu pada <i>Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI)</i> ≤ 14 mm: Resistant 15-18mm: Intermediate ≥ 19 mm: Susceptible.	Interval

F. Prosedur Penelitian

Alat: Toples kaca, erlenmeyer, sendok tandu, batang pengaduk, gelas ukur

Iwaki, corong kaca Iwaki, blender, saringan. tabung reaksi Iwaki, neraca

analitik, bunsen, spuit 3cc OneMade, hotplate SH-2, autoclave All

American, inkubator B-ONE, mikropipet RBO-100, ose, pemantik, kaca objek, LAF Innotech, pipet tetes, rak tabung, cawan petri, oven Memmert IN55, pinset, penggaris, waterbath Envilife.

Bahan: Biji kelor, tisu, kapas, aquadest, etanol 70%, aluminium foil, kertas saring Whatmant, Nutrient Agar, Mac Conkey Agar Milipore, Eosin Methylen Blue (EMB) Agar Milipore, Mueller Hinton Agar Milipore, urine, NaCl, reagen kristal violet, larutan lugol, etanol atau alkohol, larutan safranin, air, oil imersi, lensa, swab steril, suspensi bakteri, antibiotik Ciprofloxacin, ekstrak biji kelor, cakram, biakan bakteri.

1. Tahap Persiapan

- a. Pengurusan ijin pada komisi etik penelitian Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Pembuatan ekstrak biji kel

Cara kerja:

Pembuatan ekstrak biji kelor dilakukan melalui tahapan yang terstandar untuk memastikan bahwa senyawa bioaktif seperti flavonoid, fenolik, alkaloid, dan saponin dapat diekstraksi secara optimal. Proses dimulai dengan pemilihan bahan baku, yaitu biji kelor yang telah matang secara fisiologis, berwarna coklat tua, bebas dari jamur, dan tidak mengalami kerusakan mekanis. Biji yang telah dipilih kemudian dipisahkan dari cangkangnya dan dicuci menggunakan aquadest guna menghilangkan kotoran maupun kontaminan mikroba pada permukaannya. Setelah tahap pembersihan, biji dikeringkan dalam oven bersuhu rendah (40–

45°C) selama 24–48 jam, karena pengeringan suhu rendah berfungsi mempertahankan stabilitas fitokimia dan mencegah degradasi senyawa aktif akibat panas berlebih. Biji yang telah kering kemudian digiling hingga menjadi serbuk simplisia, yang bertujuan memperbesar luas permukaan kontak sehingga proses ekstraksi pelarut menjadi lebih efisien. Tahap berikutnya adalah proses ekstraksi, yang umumnya dilakukan menggunakan metode maserasi karena mampu mempertahankan integritas senyawa aktif tanpa paparan panas berlebihan. Serbuk biji kelor ditimbang sesuai kebutuhan (misalnya 200–500 gram) dan direndam dalam pelarut etanol 70% dengan rasio 1:10 hingga 1:15 (bahan: pelarut). Campuran ini kemudian disimpan dalam wadah tertutup selama 48–72 jam sambil sesekali dilakukan pengadukan untuk meningkatkan perpindahan massa antara pelarut dan bahan. Etanol 70% dipilih karena sifatnya mampu melarutkan senyawa polar dan semipolar, sehingga dapat menarik metabolit bioaktif yang memiliki peran dalam aktivitas antibakteri. Setelah periode maserasi selesai, campuran disaring menggunakan kertas saring Whatman No.1 untuk memisahkan filtrat dari residu.

Filtrat hasil maserasi kemudian menjalani proses evaporasi menggunakan rotary evaporator pada suhu 40–50°C untuk menghilangkan pelarut tanpa merusak senyawa aktif yang bersifat termo-sensitif. Proses evaporasi ini menghasilkan ekstrak kental berwarna coklat tua yang mengandung konsentrasi tinggi metabolit

sekunder. Ekstrak kental dapat dikeringkan kembali menggunakan water bath atau *freeze dryer* untuk memperoleh bentuk ekstrak kering (dry extract), yang lebih stabil dan mudah untuk ditimbang ketika digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri. Ekstrak yang telah jadi kemudian disimpan dalam wadah kaca gelap pada suhu rendah untuk mencegah oksidasi dan degradasi kimia (Mora-coto et al., 2025).

3. Pembuatan konsetrasi ekstrak biji kelor

Proses pembuatan variasi konsentrasi ekstrak biji kelor dilakukan dengan mengacu pada rumus pengenceran $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ (Kiagus Roni & Herawati, 2019), di mana V_1 adalah volume awal ekstrak, M_1 adalah konsentrasi awal ekstrak (100%), V_2 adalah volume akhir larutan (10 ml), serta M_2 adalah konsentrasi akhir yang diinginkan. Berdasarkan perhitungan tersebut, pembuatan ekstrak konsentrasi 20% membutuhkan 2 ml ekstrak pekat yang dilarutkan dalam 8 ml pelarut. Selanjutnya, untuk konsentrasi 40%, volume ekstrak yang diperlukan adalah 4 ml dengan penambahan 6 ml pelarut. Sementara itu, untuk mencapai konsentrasi 60%, digunakan 6 ml ekstrak pekat dan 4 ml pelarut. Terakhir, pada konsentrasi 80%, campuran dibuat dengan mencampurkan 8 ml ekstrak pekat ke dalam 2 ml pelarut hingga mencapai volume total 10 ml.

4. Sterilisasi alat

Sterilisasi peralatan untuk persiapan media dan kultur jaringan dimulai dengan membersihkan semua alat gelas seperti tabung reaksi dan labu

ukur menggunakan deterjen, kemudian dibilas dengan air bersih untuk menghilangkan sisa kotoran dan mikroba sebelum proses sterilisasi. Tahapan pertama adalah sterilisasi basah menggunakan autoklaf, di mana alat-alat yang telah disiapkan disusun sedemikian rupa agar uap dapat bersirkulasi bebas di antara permukaannya, kemudian autoklaf dioperasikan pada suhu 121 °C dengan tekanan sekitar 15 psi ($\pm 1,5$ atm) selama 15-20 menit untuk memastikan kematian semua mikroorganisme yang tahan panas. Setelah siklus autoklaf selesai dan alat-alat tersebut keluar dalam kondisi steril, dilakukan sterilisasi kering dengan oven, yakni alat-alat yang telah dikeringkan dan dibungkus dengan kertas coklat dimasukkan ke dalam oven pada sekitar 100 °C selama 15 menit untuk menghilangkan kelembapan sisa dan meminimalkan risiko kontaminasi ulang sebelum penyimpanan atau penggunaan dalam kultur (Sri Wulandari, 2021).

5. Pembuatan media Eosin Methylen Blue Agar (EMBA)

Pembuatan media EMBA mengacu pada modul pembuatan media dengan modifikasi. Pembuatan media Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) ditimbang menggunakan neraca analitik sebanyak 9,365 g, kemudian bubuk tersebut dilarutkan dengan 150 mL aquades hingga menjadi 150 mL di dalam Erlenmeyer. Campuran media dipanaskan sambil diaduk menggunakan batang pengaduk sampai seluruh komponen larut sempurna dan homogen. Setelah itu, Erlenmeyer ditutup dengan kertas kapas atau penutup aseptik dan media disterilkan

menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama ± 15 menit untuk memastikan media bebas kontaminan mikroba. Media yang telah disterilkan dibiarkan hingga mencapai suhu 45–50 °C, kemudian dihomogenkan kembali dan dituangkan secara aseptik ke dalam cawan petri steril masing-masing sebanyak 15–20 mL. Media dibiarkan memadat pada permukaan yang bersih dan aseptik sampai padat, sehingga media EMB siap digunakan (Sagar Aryal, 2022).

6. Pembuatan media Nutrient Agar (NA)

Pembuatan media NA mengacu pada modul praktek media dengan modifikasi. Pembuatan media Nutrient Agar (NA) dimulai dengan penimbangan bubuk NA menggunakan neraca analitik sebanyak 5,0 g, lalu bubuk tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan 250 mL aquadest. Campuran media dipanaskan sambil diaduk dengan batang pengaduk hingga semua komponen larut sempurna dan media homogen. Selanjutnya, Erlenmeyer ditutup dengan kertas kapas atau plastik dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama ± 15 menit, sesuai standar sterilisasi media agar mikrobiologi sebelum digunakan. Proses sterilisasi ini memungkinkan media bebas dari kontaminan mikroba sehingga siap dipakai untuk kultur bakteri. Setelah sterilisasi, media dibiarkan mendingin hingga mencapai suhu sekitar 45–50 °C, kemudian dihomogenkan kembali dan dituang secara aseptik ke dalam cawan petri steril masing-masing sekitar 15–20 mL untuk 12 cawan petri. Media dibiarkan memadat pada permukaan yang bersih dan

aseptik sampai padat, sehingga media Nutrient Agar siap digunakan (sagar aryal, 2022).

7. Pembuatan media Mac Conkey Agar (MAC)

Pembuatan media MacConkey Agar (MCA) dilakukan dengan mengacu pada modul praktikum pembuatan media dengan beberapa modifikasi. Serbuk MCA ditimbang menggunakan neraca analitik sebanyak 12,5 g, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan 250 mL aquadest. Campuran media dipanaskan sambil diaduk menggunakan batang pengaduk hingga seluruh komponen larut sempurna dan media homogen. Selanjutnya, Erlenmeyer diangkat dan dibiarkan hingga suhu suam-suam, kemudian ditutup menggunakan kertas kapas atau plastik penutup dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, dengan total waktu proses sekitar 45–60 menit. Setelah sterilisasi, media didinginkan hingga mencapai suhu 45–50 °C, kemudian dihomogenkan kembali dan dituangkan secara aseptik ke dalam 12 cawan petri steril masing-masing sebanyak 15–20 mL. Media diratakan secara perlahan dengan gerakan membentuk pola angka delapan dan dibiarkan hingga memadat. Media MacConkey Agar yang telah memadat siap digunakan (Artanti et al., 2018).

8. Pembuatan media Muller Hilton Agar (MHA)

Pembuatan media Mueller Hinton Agar (MHA) mengacu pada modul praktikum pembuatan media dengan beberapa modifikasi. Serbuk MHA ditimbang menggunakan neraca analitik sebanyak 9,5 g,

kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquadest hingga volume yang ditentukan. Campuran media dipanaskan sambil diaduk menggunakan batang pengaduk hingga media larut sempurna dan homogen. Selanjutnya, Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit, dengan total waktu proses sekitar 46–60 menit. Setelah sterilisasi, media dituangkan secara aseptik ke dalam 11 cawan petri steril masing-masing sebanyak 15–20 mL, kemudian dibiarkan pada suhu ruang hingga memadat. Media Mueller Hinton Agar yang telah memadat siap digunakan (Artanti et al., 2018).

9. Identifikasi bakteri *E. coli* pada urine pasien penderita ISK dan melakukan pemeriksaan mikroskopis dengan Pewarnaan Gram serta Uji Biokimia

Identifikasi bakteri *Escherichia coli* pada sampel urine pasien dengan infeksi saluran kemih dilakukan melalui pemeriksaan mikroskopis menggunakan pewarnaan Gram, serta uji biokimia dan fermentasi karbohidrat, yang mengacu pada metode Widianingsih dan Jesus serta Amin *et al.* dengan beberapa modifikasi. Sebelum proses inokulasi, sampel urine sebanyak 5–10 mL disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 2.500–3.000 rpm untuk memperoleh endapan bakteri. Selanjutnya, isolasi *E. coli* dilakukan dengan menginokulasikan sedimen urine ke dalam media diferensial MacConkey Agar (MCA). Biakan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, kemudian isolat yang

menunjukkan karakteristik khas dipilih dan dilakukan pewarnaan Gram sebagai tahap awal identifikasi bakteri (Widianingsih & Jesus, 2018). Pewarnaan Gram dilakukan dengan terlebih dahulu memfiksasi suspensi bakteri menggunakan larutan fisiologis pada kaca objek, kemudian difiksasi dengan pemanasan di atas nyala bunsen. Preparat selanjutnya diberi pewarna kristal violet selama 1 menit, diikuti dengan larutan iodin selama 1 menit sebagai mordant. Proses dekolorisasi dilakukan menggunakan etanol 70% selama ± 30 detik, kemudian dilanjutkan dengan pemberian pewarna safranin selama 1 menit sebagai pewarna tandingan. Setelah proses pewarnaan selesai, preparat bakteri diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran $40\times$ (Amin et al., 2023). Tahap selanjutnya dilakukan inokulasi pada media reaksi biokimia. Media yang digunakan meliputi media karbohidrat yang mengandung glukosa, laktosa, maltosa, dan sukrosa sebagai sumber karbon, media Kligler Iron Agar (KIA), media urea, media uji motilitas, serta media IMViC yang terdiri atas uji indol, Methyl Red (MR), Voges–Proskauer (VP), dan sitrat. Seluruh media tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Selanjutnya, isolat diinokulasikan ke dalam media Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) dan diinkubasi pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Apabila terbentuk koloni dengan kilap hijau metalik, maka isolat tersebut diinokulasikan kembali ke media MacConkey Agar (MCA) dan diinkubasi pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

selama 24 jam untuk konfirmasi karakteristik bakteri(Widianingsih & Jesus, 2018).

10. Pembuatan suspensi bakteri

Pembuatan suspensi bakteri mengacu pada Badan Standar Nasional Indonesia dengan modifikasi. Tabung reaksi dimasukkan 10 ml larutan NaCl 0,9% steril. Bakteri diambil dengan jarum ose steril. Kemudian disuspensikan ke dalam 10 ml larutan NaCl 0,9% steril. Suspensi bakteri dibuat hingga didapat kekeruhan yang sesuai dengan standar kekeruhan Mc. Farland

11. Pembuatan kontrol positif dan kontrol negatif

Suspensi bakteri *Escherichia coli* diinokulasikan secara merata pada permukaan media Mueller-Hinton Agar (MHA) menggunakan kapas swab steril, kemudian dibiarkan selama ± 15 menit pada suhu ruang agar suspensi bakteri meresap sempurna ke dalam media. Selanjutnya, antibiotik ciprofloxacin diaplikasikan pada permukaan media menggunakan pinset steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebagai kontrol negatif digunakan aquadest steril yang diaplikasikan pada media MHA dan diinkubasi pada kondisi yang sama. Evaluasi uji sensitivitas antibiotik dilakukan berdasarkan terbentuknya zona hambat di sekitar area aplikasi antibiotik, sesuai metode difusi agar (Khusuma et al, 2019).

12. Uji efektivitas daya hambat ekstrak biji kelor terhadap bakteri *E. coli*

Cara kerja:

Uji efektivitas daya hambat ekstrak biji kelor (*Moringa oleifera* L.) terhadap bakteri *Escherichia coli* dilakukan dengan metode difusi agar mengacu pada (Dima & Lolo, 2016) dengan modifikasi.

- a. Cakram kosong steril diletakkan ke dalam cawan petri steril, kemudian masing-masing cakram ditetesi 50 μ L ekstrak biji kelor pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100% yang telah dibuat sebelumnya. Cakram yang telah mengandung ekstrak selanjutnya dikeringkan dan dibiarkan hingga ekstrak meresap sempurna.
- b. Suspensi bakteri *Escherichia coli* disiapkan dengan menyetarakan kekeruhan suspensi terhadap standar McFarland, kemudian diinokulasikan secara merata pada permukaan media Mueller-Hinton Agar (MHA) menggunakan lidi kapas swab steril dan dibiarkan selama ± 15 menit pada suhu ruang agar suspensi bakteri terserap dengan baik.
- c. Cakram yang telah mengandung ekstrak biji kelor pada berbagai konsentrasi dipindahkan ke permukaan media MHA yang telah diinokulasi bakteri *E. coli* menggunakan pinset steril. Setiap kali digunakan, pinset terlebih dahulu disterilkan dengan pemanasan di atas api bunsen. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- d. Setelah inkubasi selama 24 jam, media diamati dan diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram ekstrak biji
- e. kelor diukur menggunakan mistar berskala dalam satuan milimeter sebagai indikator aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*.

G. Analisis Hasil

Analisis data dilakukan dengan:

1. Mengacu pada standar klasifikasi respon hambatan *Clinical and Laboratory Standart Institute* (CLSI) untuk Metode Difusi Disk.
2. Uji Normalitas, dilanjutkan Uji One Way Anova jika normal dan Uji Metrik *Kruskal Wallis* jika tidak normal dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* dengan analisis *Mann Whitney*.