

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis dari penelitian yang dilakukan ialah penelitian eksperimental dengan menggunakan 2 variabel, antara lain variabel bebas dan variabel terikat yang nantinya akan mengetahui adanya pengaruh antara satu variabel dengan variabel lainnya. Penelitian ini melakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun dan akar Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) terhadap bakteri *S.aureus* dengan variasi konsentrasi ekstrak 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%, clindamycin sebagai kontrol positif dan Na-CMC 0,5% sebagai kontrol negatif. Sedangkan rancangan penelitian yang digunakan adalah *post-test only control group design*. Pada desain ini terdiri atas 2 kelompok, yaitu kelompok eksperimen yang akan di berikan perlakuan dan kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan yang nantinya akan melihat pengaruh perlakuan yang diberikan. Pengujian dilakukan pengulangan sebanyak empat kali berdasarkan dengan perhitungan dengan menggunakan rumus Federer (Indratama & Yenita, 2019)

$$(n - 1) (t-1) \geq 15$$

n adalah jumlah minimal pengulangan dan t merupakan jumlah dari kelompok uji.

Perhitungan jumlah minimal pengulangan :

$$(n - 1) (t - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) (6 - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) 5 \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n = 4$$

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dimulai pada bulan Januari 2024 hingga bulan Juni 2024, tempat untuk melakukan penelitian ini adalah Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi Parasitologi Universitas Borneo Lestari.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Semua tumbuhan kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) yang diperoleh dari daerah Pemajatan Km. 2, Gambut Barat, Kabupaten Banjar, daerah ini memiliki karakteristik lahan gambut yaitu ekosistem dari kumpulan bahan organik yang sebagian atau keseluruhannya mengalami pembusukan dari sisa-sisa tanaman dengan pH yang rendah (Huda *et al.*, 2022).

3.3.2. Sampel

Sampel tumbuhan kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) yang diperoleh dari daerah Pemajatan Km. 2, Gambut Barat, Kabupaten Banjar, bagian Kelakai yang di gunakan adalah daun segar yang masih muda, dan bagian akar tanaman yang masih hidup subur.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Pada penelitian ini variabel bebas yang digunakan adalah kontrol negatif berupa Na-CMC 0,5 %, kontrol positif berupa antibiotik klindamisin, variasi masing-masing ekstrak etanol 70% daun dan akar yaitu 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%.

3.4.2. Variabel Terikat

Pada penelitian ini variabel terikat adalah diameter zona hambat dan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) bakteri *S. aureus* dari masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan.

3.5. Alat dan Bahan

3.5.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf (*Xinfeng*), inkubator (*Memmert*), oven (*Memmert*), lemari pendingin (*Sharp*), blender (*Miyako*®), waterbath (*Memmert*®), rotary evaporator (*IKA*), timbangan digital (*Ohaus*®), alat gelas (*Pyrex*®),

jarum ose bulat (*Rofa*), jangka sorong (*Krisbow*®), mikropipet (*Dragon Lab*®), *yellow-tip*, dan pengayak mesh 40 (*MBT*®).

3.5.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun dan akar (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.), etanol 70% (*CV Pandu Medika*), larutan FeCl_3 (*Merck*®), asam asetat anhidrat (*Merck*®), kloroform (*Merck*®), serbuk magnesium (*Merck*®), asam klorida (*Merck*®), pereaksi mayer (*Nitra Kimia*®), pereaksi magner (*Nitra Kimia*®), pereaksi Dragendorff (*Nitra Kimia*®), serbuk Na-CMC 0,5%, larutan asam sulfat, larutan BaCl_2 , serbuk *Nutrient Agar* (*Merck*®), serbuk *Muller Hinton Agar* (*Oxoid*®), *aquadest*, larutan NaCl 0,9%, biakan bakteri *S. aureus* dan cakram uji antibiotik klindamisin (*Oxoid*®).

3.6. Prosedur penelitian

3.6.1. Pengambilan Sampel

Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) diperoleh dari daerah Pemajatan Km. 2, Gambut Barat, Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan. Bagian tumbuhan yang diambil adalah daun dan akar.

3.6.2. Determinasi Tumbuhan Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.)

Tumbuhan kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) terdiri dari batang, daun dan akar kemudian melalui proses

determinasi di Laboratorium FMIPA Universitas Lambung Mangkurat, determinasi bertujuan untuk memastikan bahwa tumbuhan yang digunakan sesuai serta menghindari kesalahan saat pengambilan sampel penelitian.

3.6.3. Pembuatan Simplisia Daun dan Akar Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.)

Sampel tanaman yang diperoleh melalui tahapan sortasi basah dengan mencuci daun dan akar Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) menggunakan air bersih yang mengalir. Daun dipisahkan dari batangnya, dan Akar di lakukan perajangan menjadi bagian yang lebih kecil. Kemudian melalui proses pengeringan daun kelakai dan akar dengan mengangin-anginkan pada suhu ruangan. Setelah melalui proses pengeringan, dilakukan sortasi kering yang bertujuan agar memastikan simplisia bebas dari benda asing. Perlakuan terakhir yaitu menghaluskan daun dan akar kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) yang telah kering dengan menggunakan blender hingga hasil akhir yang didapat adalah serbuk halus daun dan akar Kelakai (Handayani & Rusmita, 2017; Widayati *et al.*, 2022). Pengayakan simplisia yang sudah menjadi serbuk halus baik akar maupun daun dengan ayakan mesh no.40 (Elisa *et al.*, 2020; Handayani & Rusmita, 2017).

Tahap selanjutnya penimbangan dan perhitungan rendemen simplisia daun dan akar Kelakai. Menurut Safrina & Wahyu (2018) rumus rendemen simplisia adalah :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat simplisia}}{\text{Berat bahan baku}} \times 100\%$$

3.6.4. Pembuatan Ekstrak Daun dan Akar Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.).

Serbuk simplisia daun dan akar (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) ditimbang masing-masing sebanyak 20 g lalu dibungkus menggunakan kertas saring yang diikat kedua ujungnya, kemudian serbuk masing-masing dimasukkan ke dalam bindal soxhlet dan di ekstraksi masing-masing dengan pelarut etanol 70% sebanyak 250 mL, proses ekstraksi dibiarkan berjalan beberapa siklus selama 24 jam (Ndanusa *et al.*, 2020). Ekstrak cair yang di peroleh kemudian diuapkan dengan alat *rotary evaporator* dan *waterbath* menggunakan suhu 50°C hingga diperoleh bobot tetap ekstrak kental, simpan ekstrak kental pada suhu kamar (Rostinawati *et al.*, 2017)

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$

3.6.5. Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,1 g ekstrak sampel ditambahkan dengan 5 mL HCl 2 N, disaring, lalu dibagi ke 3 tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 mL. Kemudian ditambahkan dengan

masing-masing pereaksi. Hasil positif alkaloid pada pereaksi mayer akan terbentuk endapan putih atau kuning. Positif alkaloid wagner, apabila terlihat ada endapan coklat. Positif alkaloid dragendorff, apabila terbentuk endapan jingga (Mauludiyah *et al.*, 2020).

b. Uji Fenol

Sebanyak 0,1 g ekstrak dilarutkan dengan 2 mL pelarut, lalu di tambahkan dengan larutan FeCl_3 10% 2-3 tetes. Ekstrak positif fenol apabila larutan terbentuk warna hijau, biru, merah, ungu, atau hitam (Rahayu *et al.*, 2015).

c. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,1 g ekstrak ditambahkan dengan 2 mL pelarut, lalu ditambahkan 0,1 serbuk mg dan 10 tetes HCl pekat. Positif flavonoid apabila terjadi perubahan larutan menjadi warna merah jingga atau merah ungu (Rumagit *et al.*, 2020).

d. Uji Saponin

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil sampel sebanyak 0,1 g, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan aquades panas sebanyak 10 mL. selanjutnya dikocok kuat selama kurang lebih 1 menit. Kemudian diamkan selama 10 menit dan amati buih atau busa menunjukkan hasil positif saponin (Tarukbua *et al.*, 2018).

e. Uji Steroid/Triterpenoid

Sebanyak 0,1 g ditambahkan dengan 2 mL kloroform kemudian ditambah dengan asam asetat anhidrat sebanyak 10 tetes, lalu ditetesi H_2SO_4 pekat sebanyak 2-3 tetes yang ditetekan tidak langsung mengenai larutan namun melalui dinding tabung reaksi. Positif triterpenoid apabila terdapat cincin kecoklatan atau violet pada batas antara dua pelarut dan positif steroid apabila karutan berwarna hijau (Nugrahani *et al.*, 2016).

f. Uji Tanin

0,1 g ekstrak ditambahkan dalam 2 mL pelarut, pastikan terlarut lalu ditambah dengan 2-3 tetes $FeCl_3$ 1%. Dikatakan teridentifikasi tanin apabila terlihat larutan berwarna hijau kehitaman (Manongko *et al.*, 2020).

3.7. Pengujian Antibakteri *S.aureus*

3.7.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang akan disterilisasi pada penelitian ini untuk alat gelas seperti erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri dan gelas ukur menggunakan oven dengan suhu $180^{\circ}C$ yang dipertahankan dalam waktu satu jam. Untuk sterilisasi media seperti *Nutrien Agar* (NA) dan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) dengan menggunakan autoklaf pada suhu $121^{\circ}C$ yang dipertahankan selama 15 menit dan sterilisasi ose dilakukan dengan cara memanaskan langsung di atas

api bunsen. Segala proses pengerjaan harus di aseptiskan di dalam Laminar Air Flow (LAF) yang sebelum digunakan telah dibersihkan dengan alkohol 70% (Hafiz Ramadhan *et al.*, 2020; Handayani & Rusmita, 2017).

3.7.2. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Sebanyak 0,42 g dilarutkan dalam 15 mL *aquadest* (28g/1000ml) dengan erlenmeyer. Selanjutnya homogenkan dengan *magnetic stirrer* dan *hotplate*. Ukur sebanyak 5 mL yang kemudian dituangkan masing-masing pada tiga tabung reaksi lalu tutup dengan aluminium foil. Sterilkan media di dalam autoklaf dengan temperatur 121°C yang dipertahankan selama 15 menit, kemudian diamkan pada suhu ruangan selama 30 menit atau lebih sampai dengan media memadat. Media agar miring digunakan untuk inokulum suspensi bakteri uji (Fitriyanti *et al.*, 2020).

3.7.3. Peremajaan *S. aureus*

Peremajaan bakteri menggunakan media agar miring NA dengan mengambil satu ose bakteri *S. aureus* menggunakan ose steril yang sebelumnya telah dilakukan pemijaran kemudian, tusuk dan goreskan secara zig-zag pada permukaan media NA yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Fitriyanti *et al.*, 2020).

3.7.4. Pewarnaan Gram Bakteri *S. aureus*

Dilakukan Pewarnaan gram bakteri *S. aureus* dengan cara diambil 1 ose bakteri *S. aureus* lalu goreskan pada kaca objek steril dan difiksasi. Teteskan 1 tetes kristal violet pada permukaan preparat, ditunggu selama 1 menit kemudian bilas dengan aquades hingga luntur lalu keringkan, kemudian teteskan 1 tetes lugol pada permukaan preparat, ditunggu kembali selama 1 menit lalu bilas dengan aquades sampai warna luntur lalu keringkan. Preparat dibilas dengan alkohol 96% hingga zat warna luntur lalu cuci dengan aquades, keringkan. Selanjutnya, teteskan sebanyak 1 tetes safranin pada permukaan preparat, tunggu hingga 45 detik lalu bilas dengan aquades dan keringkan (Wulandari, 2019). Preparat ditetesi dengan minyak imersi kemudian amati dengan mikroskop dengan perbesaran 10 x 100 (Mahmudah *et al.*, 2016)

3.7.5. Pembuatan larutan Na-CMC 0,5%

Dimasukkan serbuk Na – CMC 0,5% sebanyak 500 g ke dalam 70 mL *aquadest* panas, lalu tambahkan dengan *aquadest* dingin sampai batas 100 mL. lakukan sterilisasi menggunakan autoklaf menggunakan suhu 121°C yang dipertahankan selama 15 menit (Hafiz Ramadhan *et al.*, 2020).

3.7.6. Pembuatan larutan Standar 0,5 Mc-Farland

Dibuat Larutan standar *Mc-Farland* 0,5 dengan melarutkan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL dan asam sulfat 1% sebanyak 9,95

mL. larutan standar *Mc-Farland* 0,5 dipakai sebagai media pembanding jumlah koloni bakteri yang terdapat pada medium cair yang akan digunakan pada pengujian daya anti bakteri (Rosmania & Fitri, 2020).

3.7.7. Pembuatan Suspensi Bakteri *S. aureus*

Pembuatan suspensi bakteri dengan cara mengambil biakan bakteri *S. aureus* dari NA menggunakan jarum ose lalu larutkan dalam larutan NaCl 0,9% secara aseptik. Tingkat kekeruhan suspensi disamakan dengan Mc Farland 0,5 (1×10^4 CFU/mL) secara visual (Fitriyanti *et al.*, 2020; Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021).

3.7.8. Pembuatan Media Mueller-Hinton Agar (MHA)

Media MHA timbang sebanyak 9,12 gram, masukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dihomogenkan dengan 240 mL *aquadest* steril (38 gram/1000mL) dan mensterilkan menggunakan *autoklaf* dengan suhu 121°C yang dipertahankan selama 15 menit.

3.7.9. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Etanol 70% Daun dan Akar Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.).

Variasi konsentrasi ekstrak etanol 70% daun dan akar yang digunakan adalah 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%. Berikut cara pembuatan variasi ekstrak :

a. Pembuatan Konsentrasi 12,5%

Sebanyak 1,25 g ekstrak etanol 70% daun dan akar Kelakai (*Stenochlaena Palustris* (Burm.f.) Bedd.) kemudian dilarutkan dalam 10 mL Na-CMC 0,5%.

b. Pembuatan Konsentrasi 6,25%

Diambil sebanyak 5 mL larutan konsentrasi 12,5% kemudian dilarutkan dengan 5 mL Na-CMC 0,5%.

c. Pembuatan Konsentrasi 3,125%

Diambil sebanyak 5 mL larutan konsentrasi 6,25% kemudian dilarutkan dengan 5 mL Na-CMC 0,5%.

d. Pembuatan 1,5625%

Diambil sebanyak 5 mL larutan konsentrasi 3,125% kemudian dilarutkan dengan 5 mL Na-CMC 0,5%.

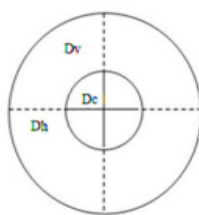
3.7.10. Uji Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Sumuran

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak akar dan daun Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) dengan menggunakan media MHA yang sudah dipadatkan dan disterilkan lalu ditanami bakteri *S. aureus* menggunakan *cotton swab* steril. 12 cawan petri yang telah diinokulasi bakteri *S. aureus* dibuat empat lubang sumuran pada setiap cawan petri dengan menggunakan alat *cork borer* steril. Kemudian masukkan sebanyak 20 μ L ekstrak akar maupun daun etanol 70% Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) dari berbagai variasi

konsentrasi pada setiap lubang sumuran yang telah dibuat dengan alat *cork borer* steril di media MHA, sebagai kontrol positif disk antibiotik klindamisin dan kontrol negatif Na-CMC 0,5%. Selanjutnya letakkan kultur tersebut ke dalam lemari pendingin pada suhu 4°C selama 2 jam agar senyawa dapat berdifusi pada media. Setelah itu dapat dilanjutkan dengan menginkubasi kultur pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian ukur diameter zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong dan klasifikasikan berdasarkan kategori (Fitriyanti *et al.*, 2020; Hafiz Ramadhan *et al.*, 2020).

Menurut Harti (2015), rumus perhitungan zona hambat sebagai berikut:

$$\text{Zona Hambat} = \frac{(Dv - Dc) + (Dh - Dc)}{2}$$



Dv : Diameter Vertikal

Dh : Diameter Horizontal

Dc : Diameter sumuran

3.7.11. Analisis Data

Data yang diambil berupa data kuantitatif yaitu besarnya zona hambat ekstrak etanol 70% daun dan akar Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.). Data yang didapat selanjutnya dianalisis dengan menggunakan SPSS versi 24.0 *for Windows*. Tujuan pengujian menggunakan SPSS untuk melihat

apakah ada perbedaan yang signifikan dari masing-masing kelompok uji mengandung berbagai variasi konsentrasi dari ekstrak etanol 70% akar dan daun Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) serta kontrol positif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Data yang telah didapat kemudian dianalisis menggunakan SPSS dengan uji pendahuluan yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Jika data yang didapat terdistribusi secara normal dan homogen kemudian dilanjutkan dengan uji parametrik yaitu *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95% dan uji *Post Hoc Tukey HSD* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok dengan taraf kepercayaan 95%. Namun, jika data tidak dapat terdistribusi secara normal atau data tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas antibakteri. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk melihat kelompok uji manakah yang terdapat perbedaan signifikan (Pao *et al.*, 2022).