

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan *the post-test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dari daun Balik Angin *Alphitonia incana* (Roxb) Teijsm. & Binn. Ex Kurz yang diekstraksi dengan metode sokhlet yaitu menggunakan pelarut etanol 70%.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilakukan mulai dari bulan Januari - Juni 2024 serta tempat yang digunakan untuk melaksanakan penelitian ini adalah di Laboratorium Farmakognosi dan Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Palangka Raya.

3.3 Variable Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variable bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi uji ekstrak etanol 70% Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb). Teijsm. & Binn. Ex Kurz) kontrol positif (klindamisin) dan kontrol negatif Na-CMC 0,5%.

3.3.2 Variabel Terikat

Variable terikat pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri yaitu ditandai dengan diameter zona hambat.

3.4 Populasi dan sampel

Populasi pada penelitian ini adalah tumbuhan Balik Angin. Sampel yang digunakan adalah Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb) Teijsm. & Binn. Ex Kurz).

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoclave (*Hirayama*®), blender (*Philips*®), toples kaca, pengayak mesh 40 (*MBT*®), oven (*Fisher*®), timbangan, gelas ukur (*Pyrex*®), gelas beaker (*Pyrex*®), labu ukur (*Pyrex*®), cawan porcelain (*Pyrex*®), cawan petri (*Pyrex*®), *aluminium foil*, *vacuum rotary evaporator* (*IKA RP 10*®), *water bath* (*Memmert*®), Desikator (*Duran*®), pelubang media agar No.5, tabung reaksi (*Pyrex*®), pipet ukur (*Pyrex*®), batang pengaduk, sendok tanduk, *hot plate* (*Thermo Scientific*®), lemari pendingin (*Panasonic*®), *ball pipet*, ose, pinset, lampu spiritus, jangka sorong.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Balik Angin *Alphitonia incana* (Roxb) Teijsm. & Binn. Ex Kurz, etanol 70% (Pandu medika), Besi (II) Klorida (FeCl_3) (*Merck*®),

asam asetat anhidrat ((CH₃CO)₂O) (Merck®), kloroform (Merck®), serbuk magnesium (Merck®), asam klorida (HCl) (Merck®), pereaksi mayer (Nitra Kimia®), pereaksi wagner (Nitra Kimia®), pereaksi dragendroff (Nitra Kimia®), gelatin 1% (Merck®), serbuk Na-CMC 0,5% (Himedia®), larutan asam sulfat (H₂SO₄) (Merck®), larutan BaCl₂ (Merck®), serbuk *brain heart infusiom* (Oxoid®), serbuk *Muller Hiton Agar* (Oxoid®), aquadest, larutan NaCl 0,9% (PT Widatra Bakti®), cakram uji antibiotik klindamisin (Oxoid®), alumunium foil (Klin Pak).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengambilan Sampel

Tanaman Balik Angin didapatkan dari Gunung Tahura, Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Sampel yang digunakan berupa daun hijau tua yang masih berada dipohon.

3.6.2 Determinasi Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb) Teijsm. & Binn. Ex Kurz)

Sampel Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb) Teijsm. & Binn. Ex Kurz) di Determinasi di Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Bogor. Determinasi ini dilakukan untuk mengetahui kebenaran identitas tumbuhan tersebut. Hasil determinasi yang telah dilakukan menyatakan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis spesies (*Alphitonia incana* (Roxb) Teijsm. & Binn. Ex Kurz) family *Rhamnaceae*.

3.6.3 Pembuatan Simplisia Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb) Teijsm. & Binn. Ex Kurz)

Daun balik Angin dikumpulkan dengan mengambil daun yang sudah matang yaitu daun yang berwarna hijau tua. Sampel tanaman yang diperoleh dilakukan sortasi basah yaitu daun Balik Angin di cuci menggunakan air bersih dan mengalir. Lalu daun Balik Angin dipotong kecil-kecil agar dapat mempercepat proses pengeringan. Daun dikeringkan pada suatu ruangan yang bebas dari paparan sinar matahari langsung (Fuentes *et al.*, 2020). Simplisia yang telah dikeringkan kemudian disortasi kering untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang tertinggal serta bagian daun yang tidak diinginkan, selanjutnya daun yang telah disortasi kering dihaluskan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk dan kemudian diayak menggunakan ayakan ukuran 40 mesh untuk memperoleh serbuk simplisia (Sandra *et al.*, 2022).

Rendemen simplisia = $\frac{\text{Bobot Simplisia}}{\text{Bobot Daun balik angin}} \times 100\%$ (Aprillinia, 2022).

3.6.4 Pembuatan Ekstrak daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb) Teijsm. & Binn. Ex Kurz)

Serbuk simplisia daun Balik Angin (*A. incana*) kemudian ditimbang sebanyak 50 g lalu dibungkus dengan menggunakan kertas saring yang kedua ujungnya telah diikat, kemudian dimasukkan ke dalam bindal sokhlet dan diekstraksi dengan 358 mL (1:7,16) pelarut etanol 70% dengan suhu 60°C (Rosyada,

2022). Ekstrak cair yang didapatkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* pada suhu 50°C hingga diperoleh bobot tetap ekstrak kental, simpan ekstrak kental pada suhu kamar (Ahmed *et al.*, 2019).

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\% \text{ (Aprillinia, 2022).}$$

3.6.5 Skrining Fitokimia

a. Uji Fenol

Sampel sebanyak 0,1 gr dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan dengan tetes larutan FeCl₃ 10%. Terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam menunjukkan positif mengandung fenolik (Ramadhan *et al.*, 2020).

b. Uji Flavonoid

Sampel sebanyak 0,1 gr dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan 2 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, setelah itu ditambahkan dengan amil alcohol dan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Ramadhan *et al.*, 2020).

c. Uji Alkoloid

Sampel sebanyak 0,1 gr ditambahkan 5 mL HCl, kemudian dibagi ke dalam tiga tabung, pada tabung 1 ditambah pereaksi *Mayer*, tabung 2 ditambah pereaksi

Dragendroff, tabung tiga ditambah pereaksi *wagner*. Hasil terbentuknya endapan putih pada tabung satu, endapan kuning kejinggaan dan pada tabung tiga merah kecokelatan. Endapan berwarna tersebut menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Ramadhan *et al.*, 2020).

d. Uji Tanin

Sampel sebanyak 0,1 gr dilarutkan masing-masing, pelarutnya sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan larutan gelatin 1%, terbentuknya endapan bewarna putih menunjukkan adanya senyawa tanin (Ramadhan *et al.*, 2020).

e. Uji Saponin

Sampel sebanyak 0,1 gr ditambahkan 5 mL air panas dikocok kuat selama kurang lebih 10 detik. Apabila terbentuk busa stabil selama kurang lebih 10 menit dan setelah ditambahkan satu tetes HCl 2N, busa tersebut tidak hilang (Ramadhan *et al.*, 2020).

f. Uji Steroid-Triterpenoid

Sampel sebanyak 0,1 gr ditambahkan 2-3 mL kloroform dan 10 tetes asetat anhidrat serta dua-tiga tetes H₂SO₄ (pereaksi *Lieberman-burchard*) melalui dinding tabung. Apabila terbentuk warna biru sampai hijau positif mengandung steroid sedangkan apabila terbentuknya warna

merah atau ungu positif mengandung triterpenoid (Ramadhan *et al.*, 2020).

3.7 Pengujian Antibakteri *Staphylococcus aureus*

3.7.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian harus disterilkan terlebih dahulu, sesuai dengan ketentuan masing masing yaitu, untuk media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi dengan waktu 10-15 menit. Kondisi tersebut sangat efektif untuk membunuh bakteri dan spora jamur. Kemudian untuk alat-alat gelas disterilkan menggunakan oven dengan suhu 170 °C dengan waktu selama satu jam. Perlu diperhatikan alat yang ingin disterilkan dibungkus menggunakan *aluminium foil* dan tidak disarankan menggunakan kertas, Lalu untuk jarum ose disterilkan dengan cara pemijaran api Bunsen (Wulandari *et al.*, 2021).

3.7.2 Pembuatan Larutan Na-CMC 0,5%

Serbuk Na-CMC ditimbang sebanyak 0,5 g lalu dimasukkan kedalam 70 mL *aquadest* panas, kemudian ditambah *aquadest* dingin sampai tanda batas 100 mL. Lakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C (Arsyad, 2019).

3.7.3 Pembuatan Larutan Standar 0,5% *Mc-Farland*

Dicampurkan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 mL dan larutan BaCl₂ sebanyak 0,05 mL lalu dikocok hingga terbentuk larutan yang keruh (Sandra *et al.*, 2022).

3.7.4 Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Etanol 70% dari daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb) Teijsm. & Binn. Ex Kurz)

Larutan uji yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri dibuat dengan cara diencerkan ekstrak etanol 70% daun Balik Angin menjadi beberapa kelompok konsentrasi bertingkat. Konsentrasi yang digunakan adalah 25,6%, 12,8%, 6,4%, 3,2%, 1,6%, 0,8%, 0,4 % dan 0,2%. Untuk membuat larutan konsentrasi 25,6% dengan cara ditimbang 1,28 g ekstrak kemudian ditambahkan 5 mL larutan Na-CMC 0,5% gerus sampai homogen menggunakan mortar. Konsentrasi 25,6% diambil 2,5 mL larutan masukan ke dalam vial yang berisi larutan Na-CMC sebanyak 2,5 mL untuk memperoleh konsentrasi 12,8%. Untuk pengenceran selanjutnya yaitu pada konsentrasi 6,4%, 3,2%, 1,6%, 0,8%, 0,4% dan 0,2% dilakukan dengan cara yang sama seperti yang tertera diatas (Lihimi, 2022; Soleha, 2022).

3.7.5 Pembuatan Media *Brain Heart Infusion* (BHI)

Brain Heart Infusion (BHI) dibuat dengan cara ditimbang media sebanyak 1,35 g dan dimasukkan ke dalam

erlenmeyer, kemudian larutkan dengan *aquadest* sebanyak 30 mL dan dipanaskan hingga semua komponen dalam media agar larut menggunakan *magnetic stirring-hot plate*. Dimasukan ke dalam autoklaf menggunakan suhu 121°C selama 15 menit, selanjutnya dituang pada tabung reaksi 7 mL dan ditutup dengan alumunium foil. Media cair *Brain Heart Infusion* (BHI) siap digunakan sebagai media kultur bakteri (Undap *et al*, 2017).

3.7.6 Pembuatan Media Peremajaan Bakteri

Manitol Salt Agar (MSA) dibuat dengan dengan cara menimbang media sebanyak 11,1 g dan dimasukan ke dalam erlenmeyer, kemudian dilarutkan dengan *aquadest* sebanyak 100 mL dan dipanaskan hingga semua komponen dalam media agar larut menggunakan *magnetic stirring-hot plate*. Dimasukan ke dalam autoklaf menggunakan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian biarkan pada suhu ruang selama 30 menit hingga media memadat (Mamay, 2022).

3.7.7 Peremajaan *Staphylococcus aureus*

Proses peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri *staphylococcus aureus* menggunakan ose steril yang telah dipanaskan dengan cara pemijaran kemudian digoreskan pada permukaan media *Manitol Salt Agar* (MSA) dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37° C (Mamay, 2022).

3.7.8 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Biakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah diinkubasi kemudian diambil dengan menggunakan jarum ose dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah berisi 1 ml larutan garam fisiologis (NaCl) 0,9% yang telah steril lalu diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam selanjutnya dibandingkan kekeruhan dengan larutan standart *Mc Farland* 0,5 (Fitriyanti *et al.*, 2019).

3.7.9 Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

Media *Muller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 20,52 g, lalu dilarutkan dalam 540 mL *aquadest* kemudian dipanaskan menggunakan *magnetic stirring-hot plate*. Lalu media disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 ° C. Lalu dinginkan media sampai suhu ruang, bagi media kedalam 9 cawan petri steril untuk pengujian aktivitas antibakteri. Setelah dingin, media padat disimpan dalam kulkas (Fitriyanti *et al.*, 2019).

3.7.10 Uji Efektivitas Antibakteri Dengan Metode Sumuran

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun Balik Angin dilakukan dengan menggunakan media MHA yang telah disterilkan, lalu ditanami bakteri *staphylococcus aureus* menggunakan *cotton swap steril*. Dimasukan sebanyak 20 µL ekstrak etanol 70% daun Balik Angin dari berbagai macam

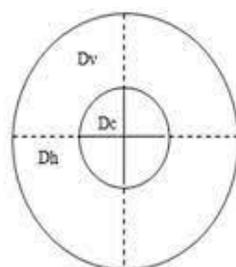
variasi konsentrasi pada setiap lubang sumuran media MHA. Sebagai kontrol positif klindamisin dan kontrol negatif Na-CMC 0,5%. Lalu selanjutnya letakan kultur tersebut kedalam kulkas pada suhu 8° C selama 18 jam agar senyawa dapat berdifusi pada media. Setelah itu dapat dilanjutkan dengan menginkubasi kultur pada suhu 37° C selama 24 jam. Kemudian ukur diameter zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong dan klasifikasi berdasarkan kategorinya (Fitriyanti *et al.*, 2019; Ramadhan *et al.*, 2020). Berikut tingkat standar klafikasi hambatan pada proses pengukuran diameter zona hambat.

Tabel 1. Kategori penghambatan antibakteri berdasarkan interpretasi klindamisin pada CLSI (2020)

Diameter (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤ 14 mm	<i>Resistent</i>
15-20 mm	<i>Intermediate</i>
≥ 21 mm	<i>Sensitive</i>

Rumus perhitungan zona hambat:

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



Keterangan:

Dv: Diameter vertical

Dh: Diameter horizontal

Dc: Diameter disk cakram

Gambar 4. Diameter Zona Hambat

Uji dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan, berdasarkan rumus Federer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$ dimana (t) adalah kelompok dan (n) adalah jumlah minimal pengulangan (Aryani, 2022).

Perhitungan jumlah minimal pengulangan :

$$\begin{aligned}
 (n-1)(t-1) &\geq 15 = (n-1)(10-1) \geq 15 \\
 &= (n-1)9 \geq 15 \\
 &= 9n-9 \geq 15 \\
 &= 9n \geq 15+9 \\
 &= 9n \geq 24 \\
 &= n \geq \frac{24}{9} = \\
 n &\approx 2,666 = 3
 \end{aligned}$$

3.7.11 Pemusnahan Media Uji (Dekontaminasi)

Pemusnahan media uji atau dekontaminasi merupakan langkah penting untuk memastikan bahwa bakteri benar-benar musnah dan tidak menimbulkan risiko bagi kesehatan manusia dan lingkungan. Proses dekontaminasi pada penelitian ini menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. autoklaf dinyalakan dan ditunggu hingga siklus sterilisasi selesai. Selanjutnya, autoklaf mendingin hingga suhunya aman untuk disentuh. Keluarkan wadah berisi peralatan media uji dari autoklaf. Kemudian limbah media uji dialirkan ke sistem

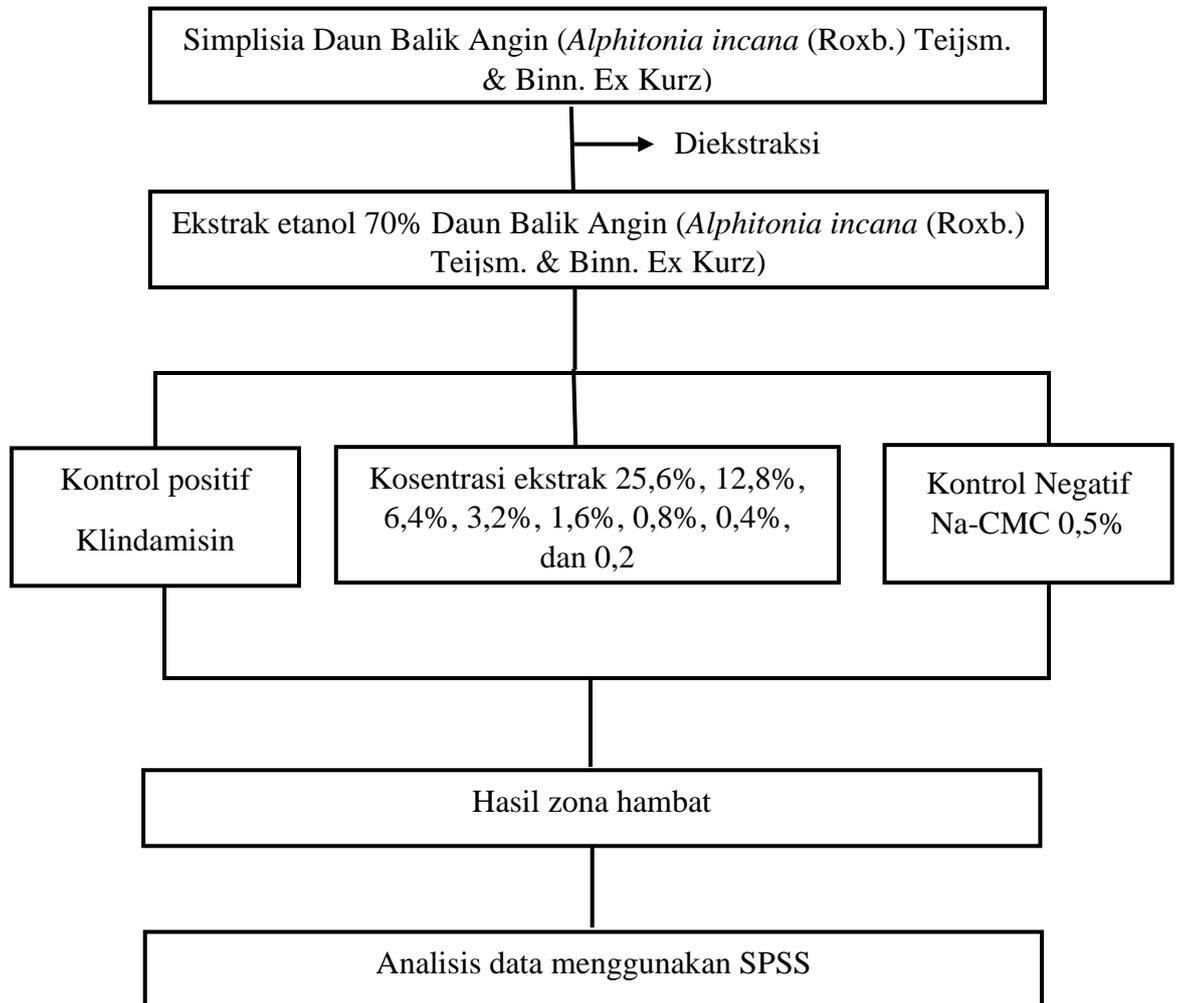
pengolahan air limbah laboratorium yang telah dirancang khusus untuk menetralkan dan menghilangkan mikroorganisme (Jayanti *et al.*, 2023).

3.8 Analisis Data

Data hasil yang diperoleh berupa diameter zona hambat kemudian dianalisis dengan menggunakan SPSS untuk melihat apakah ada efektivitas antibakteri yang mengandung kontrol positif klindamisin dan kontrol negatif Na-CMC 0,5% dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol 70% daun Balik Angin dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Uji analisis yang digunakan adalah uji normalitas dan uji homogenitas. Jika data yang diperoleh berdistribusi normal dan homogen maka selanjutnya dilakukan uji *one-way anova* dengan taraf kepercayaan 95%, kemudian dilanjutkan dengan uji *post-hoc tukey HSD* untuk mengetahui keefektifitasan antibakteri daun Balik Angin dengan taraf kepercayaan 95%. Jika data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen maka dilakukan uji nonparametric yaitu uji *Kruskall Wallis*, untuk menentukan apakah ada efektivitas antibakteri yang signifikan secara statistik antara dua atau lebih kelompok variable, maka analisis menggunakan uji *Mann-Whitney test* dengan taraf kepercayaan 95%.

3.9 Skema Alur Penelitian



Gambar 5. Skema alur penelitian