

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang diterapkan adalah penelitian laboratorium eksperimental dengan desain penelitian *post-test only control design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi khasiat antibakteri *Staphylococcus aureus* dari ekstrak metanol daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) yang diekstraksi dengan metode *soxhlet* menggunakan metode difusi sumuran.

Pada penelitian ini, khasiat antibakteri ekstrak metanol daun Balik Angin diuji menggunakan delapan konsentrasi ekstrak, yaitu 0,2%, 0,4%, 0,8%, 1,6%, 3,2%, 6,4%, 12,8%, dan 25,6 dengan kontrol positif klindamisin dan kontrol negatif Na-CMC 0,5% terhadap bakteri *S. aureus*. Pengujian ini menggunakan metode sumuran dan diekstraksi dengan metanol sebagai pelarut metode *soxhlet*. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali, berdasarkan rumus Federer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$, yang mana (t) adalah kelompok dan (n) adalah jumlah minimal pengulangan (Ariyani, 2022).

Perhitungan jumlah minimal pengulangan :

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

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Laboratorium Farmakognosi dan Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Palangka Raya menjadi lokasi penelitian ini. Penelitian berlangsung selama 6 bulan, mulai dari Januari 2024 hingga Juni 2024.

3.3 Populasi dan Sampel

Tumbuhan Balik Angin menjadi populasi dalam penelitian ini serta digunakan daun Balik Angin sebagai sampel.

3.4 Variabel Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam bentuk eksperimen, dengan variabel-variabel yang terlibat dalam penelitian ini meliputi:

3.4.1 Variabel Bebas

Dalam penelitian ini, variabel bebas yang digunakan meliputi konsentrasi ekstrak metanol daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) yaitu 0,2%, 0,4%, 0,8%, 1,6%, 3,2%, 6,4%, 12,8%, dan 25,6% terhadap bakteri *S. aureus* dengan control positif klindamisin, serta kontrol negatif Na-CMC 0,5% yang diekstraksi menggunakan metode *soxhlet*.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini yaitu diameter zona hambat ekstrak metanol daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) terhadap bakteri *S. aureus*.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Peralatan yang diperlukan untuk penelitian ini adalah autoklaf (*Hirayama*), alat gelas (*Pyrex*®), blender (*Philips*), inkubator (*Memmert*®), jarum ose bulat (*Rofa*), jangka sorong (*Trickle Brand*), mikropipet (*Dragon Lab*®), *yellow-tip*, oven (*Memmert*®), pengayak mesh 40 (*MBT*®), timbangan digital (*Ohaus*®), *rotary evaporator* (*IKA*), lemari pendingin (*Sharp*), bunsen, cawan petri (*Pyrex*®) dan *waterbath* (*Memmert*®).

3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan untuk penelitian ini mencakup daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz), metanol (CV Pandu Medika), aluminium foil (*Klin Pak*), larutan FeCl_3 (*Merck*®), *acetic anhydride* (*Merck*®), kloroform (*Merck*®), serbuk magnesium (Mg) (*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 (H_2SO_4) (*Merck*®), larutan BaCl_2 (*Merck*®), serbuk *Brain Heart Infusion* (BHI), serbuk *Manitol Salt Agar* (*Merck*®), serbuk *Mueller Hinton Agar* (*Oxoid*®), *aquadest*, larutan garam fisiologis (NaCl) 0,9% (*PT Widatra Bakti*®), biakan bakteri *S. aureus*, dan cakram uji antibiotik klindamisin (*Oxoid*®).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pemilihan dan Pengambilan Simplisia

Daun hijau segar dari pohon Balik Angin yang masih berada di pohon tersebut dipilih untuk digunakan dalam penelitian ini, dengan budidaya tumbuh pada lahan terbuka dan terkena cahaya yang diperoleh dari Gunung Tahura, Kota Banjarbaru, Provinsi Kalimantan Selatan.

3.6.2 Determinasi Daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

Sampel Balik Angin dideterminasi di Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) di Bogor melakukan determinasi untuk memastikan identitas tanaman tersebut. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies dari famili *Rhamnaceae*.

3.6.3 Pembuatan Simplisia Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

Sampel tumbuhan yang diperoleh dilakukan sortasi basah, pencucian, perajangan dan pengeringan terhadap daun Balik Angin. Daun dikeringkan dalam ruangan yang tidak terkena sinar matahari langsung (Fuentes *et al.*, 2020). Simplisia kering disortasi untuk menghilangkan kotoran dan bagian daun yang tidak diinginkan. Simplisia kemudian dihaluskan menggunakan blender sampai menjadi

serbuk, lalu diayak dengan ukuran 40 mesh untuk memperoleh serbuk simplisia (Sandra *et al.*, 2022).

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

3.6.4 Pembuatan Ekstrak Metanol Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

Serbuk simplisia daun Balik Angin kemudian ditimbang sebanyak 50 g lalu dibungkus menggunakan kertas saring yang ujung-ujungnya telah diikat. Serbuk tersebut dimasukkan ke dalam alat *soxhlet* untuk diekstraksi menggunakan 358 mL pelarut metanol pada suhu 50°C (Rosyada, 2022). Ekstrak cair yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* pada suhu 50°C hingga mencapai bobot tetap. Setelah proses ini, ekstrak disimpan pada suhu kamar. (Ahmed *et al.*, 2019).

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

3.7 Skrining Fitokimia Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

a. Uji Fenol

Dalam 2 mL pelarut, 0,1 g sampel dilarutkan. Kemudian, beberapa tetes larutan FeCl₃ 10% ditambahkan. Jika ada warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam, itu menunjukkan bahwa ada fenol (Ramadhan *et al.*, 2020a).

b. Uji Flavonoid

0,1 g sampel dilarutkan dalam 2 mL pelarut, kemudian ditambahkan dua tetes NaOH 10% dan dikocok dengan kuat. Adanya flavonoid menunjukkan perubahan warna yang signifikan menjadi kuning, merah, atau coklat (Idris, 2017).

c. Uji Alkaloid

5 mL HCl ditambahkan ke 0,1 g sampel dan dibagi ke dalam tiga tabung. Tambahkan pereaksi *Mayer* ke tabung pertama, pereaksi *Dragendorff* ke tabung kedua, dan pereaksi *Wagner* ke tabung ketiga. Adanya endapan kuning di tabung pertama, endapan coklat di tabung kedua, dan endapan kecoklatan di tabung ketiga menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Ramadhan *et al.*, 2020b).

d. Uji Tanin

0,1 g sampel dilarutkan dalam 2 mL pelarut. Selanjutnya, beberapa tetes larutan natrium klorida dan larutan gelatin 1% ditambahkan. Adanya senyawa tanin menunjukkan terbentuknya endapan putih (Ramadhan *et al.*, 2020b).

e. Uji Saponin

5 mL air panas dicampur dengan 0,1 g sampel dan dikocok dengan kuat selama sekitar sepuluh detik. Jika busa yang terbentuk tetap stabil selama sepuluh menit dan tidak hilang setelah penambahan satu tetes HCl 2N, ini menunjukkan adanya senyawa saponin (Ramadhan *et al.*, 2020b).

f. Uji Steroid-Triterpenoid

Melalui dinding tabung, 0,1 g sampel dicampur dengan 2-3 ml kloroform, 10 tetes asam asetat anhidrat, dan 2-3 tetes H₂SO₄ (pereaksi *Lieberman-Burchard*). Warna biru hingga hijau menunjukkan adanya steroid, sedangkan merah atau ungu menunjukkan adanya triterpenoid. (Ramadhan *et al.*, 2020a).

3.8 Pengujian Antibakteri *Staphylococcus aureus*

S. aureus yang dipakai dalam penelitian yaitu berasal dari Laboratorium Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Palangka Raya.

3.8.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua peralatan yang digunakan dalam penelitian harus disterilkan sesuai ketentuan yang berlaku. Alat-alat gelas disterilkan dengan memasukkannya ke dalam oven pada suhu 170°C selama satu jam. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C yang dipertahankan selama 15 menit, dan jarum ose disterilkan dengan pemijaran menggunakan api bunsen. Uji mikrobiologi dilakukan secara aseptis dan meja kerja telah dibersihkan dengan alkohol (Arsyad, 2019; Fitriyanti *et al.*, 2019).

3.8.2 Pembuatan Larutan Na-CMC 0,5%

Serbuk Na-CMC sebanyak 0,5 g ditimbang dan dilarutkan dalam 70 mL aquadest yang dipanaskan. Larutan kemudian dilengkapi dengan aquadest dingin sampai volume total mencapai 100 mL.

Selanjutnya, larutan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C yang dipertahankan selama 15 menit (Arsyad, 2019).

3.8.3 Pembuatan Larutan Standar McFarland 0,5

Larutan standar McFarland 0,5 disiapkan dengan mencampurkan 9,95 mL larutan H₂SO₄ 1% dengan 0,05 mL larutan BaCl₂ 1%, kemudian dikocok hingga terbentuk larutan keruh (Sandra *et al.*, 2022).

3.8.4 Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Metanol dari Daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

Larutan uji yang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri *S. aureus* dibuat dengan mengencerkan ekstrak metanol daun Balik Angin menjadi beberapa kelompok konsentrasi bertingkat. Konsentrasi yang digunakan antara lain 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 menimbang 1,28 g ekstrak kemudian tambahkan 5 mL larutan Na-CMC 0,5% gerus sampai homogen menggunakan mortir. Dari konsentrasi 25,6% diambil 2,5 mL larutan dan masukan pada vial yang berisi larutan Na-CMC 0,5% sebanyak 2,5 mL untuk memperoleh konsentrasi 12,8%. Untuk pengenceran berikutnya pada konsentrasi 6,4%, 3,2%, 1,6%, 0,8%, 0,4%, dan 0,2%, dilakukan dengan cara yang sama seperti yang telah dilakukan sebelumnya (Subareng, 2023).

3.8.5 Pembuatan Media *Brain Heart Infusion* (BHI)

Timbang 1,11 g media BHI dan campurkan dengan 30 ml aquadest dalam tabung erlenmeyer. Dengan menggunakan *magnetic stirrer*, larutan tersebut diaduk hingga homogen. Setelah itu, autoklaf dipanaskan hingga 121°C yang dipertahankan selama 15 menit untuk mensterilkan media. Media yang telah disterilkan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil. Media cair BHI siap untuk kultur bakteri (Ortez, 2005 dalam Undap *et al.*, 2017).

3.8.6 Pembuatan Media *Manitol Salt Agar* (MSA)

Media MSA disiapkan dengan menimbang 11,1 g media, kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquadest steril di tabung erlenmeyer. Larutan tersebut dipanaskan hingga seluruh komponen media larut (Mamay, 2022). Selanjutnya, media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C yang dipertahankan selama 15 menit dan didinginkan pada suhu kamar selama sekitar 30 menit hingga mengeras, siap digunakan untuk peremajaan bakteri (Fitriyanti *et al.*, 2019).

3.8.7 Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Media miring MSA digunakan untuk meremajakan bakteri. Satu ose *S. aureus* diambil dari ose steril yang telah dibersihkan melalui pemijaran. Kemudian, ose tersebut digoreskan secara zig-zag

pada permukaan media. Selama 24 jam, media diinkubasi pada suhu 37°C (Fitriyanti *et al.*, 2019).

3.8.8 Pewarnaan Gram Bakteri *Staphylococcus aureus*

Untuk identifikasi sifat Gram dan morfologi bakteri, pewarnaan Gram dilakukan dengan cara menyiapkan sediaan ulas di atas kaca objek, kemudian difiksasi dengan pemijaran bunsen. Preparat lalu ditetesi *crystal violet* dan dibiarkan selama 1-2 menit. Setelah itu, sisa pewarna dibuang dan preparat dibilas dengan air mengalir. Preparat ditetesi larutan lugol selama 30 detik, kemudian dibilas dengan air. Selanjutnya, alkohol 96% digunakan untuk melunturkan pewarna, diikuti dengan pencucian air. Safranin ditetesi dan dibiarkan selama 2 menit sebelum proses bilas air dilakukan. Setelah kering, preparat diberi tetesan minyak imersi dan diperiksa menggunakan mikroskop dengan pembesaran 10 x 100 (Mahmudah *et al.*, 2016).

3.8.9 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Setelah inkubasi, jarum ose digunakan untuk mengambil biakan *S. aureus* dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril berisi 1 mL garam fisiologis (NaCl) 0,9%. Kekeruhan dalam tabung dibandingkan dengan larutan standar McFarland 0,5 (Fitriyanti *et al.*, 2019).

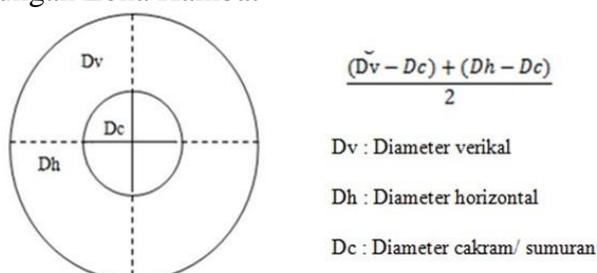
3.8.10 Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media MHA seberat 2,28 g dilarutkan dalam 60 mL aquadest dengan pemanasan pada *hotplate*. Setelah larut, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C yang dipertahankan selama 15 menit. Setelah pendinginan hingga suhu sekitar 50°C, media dibagi ke dalam 15 cawan petri steril dan didinginkan hingga mengeras. Setelah media menjadi padat, cawan petri disimpan dalam kulkas (Subareng, 2023).

3.8.11 Uji Efektivitas Antibakteri Dengan Metode Sumuran

Pengujian efektivitas antibakteri ekstrak metanol daun Balik Angin dilakukan menggunakan media MHA yang telah disterilkan, kemudian bakteri *S. aureus* diinokulasi menggunakan *cotton swab* steril. Ekstrak metanol daun Balik Angin sebanyak 20 µL dari berbagai konsentrasi dimasukkan pada setiap sumuran media MHA. Sebagai kontrol positif digunakan disk antibiotik klindamisin, dan Na-CCM 0,5% sebagai kontrol negatif yang berfungsi sebagai pelarut kontrol sampel tumbuhan. Kultur tersebut kemudian ditempatkan dalam kulkas pada suhu 2-8°C selama 14-18 jam agar senyawa dapat berdifusi ke dalam media. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah periode inkubasi selesai, area hambat diukur dengan jangka sorong dan diklasifikasikan sesuai kategorinya (Fitriyanti *et al.*, 2019; Ramadhan *et al.*, 2020).

Perhitungan Zona Hambat



Gambar 5. Perhitungan Diameter Zona Hambat (*Calculation Formula of Inhibition Zone Diameter*)

Tabel 2. Kategori Daya Hambat Bakteri

Diameter Zona Hambat (Zona Terang)	Respon Hambatan Pertumbuhan
≥ 20 mm	Sangat Kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

Sumber : Nopiyanti *et al.*, (2016)

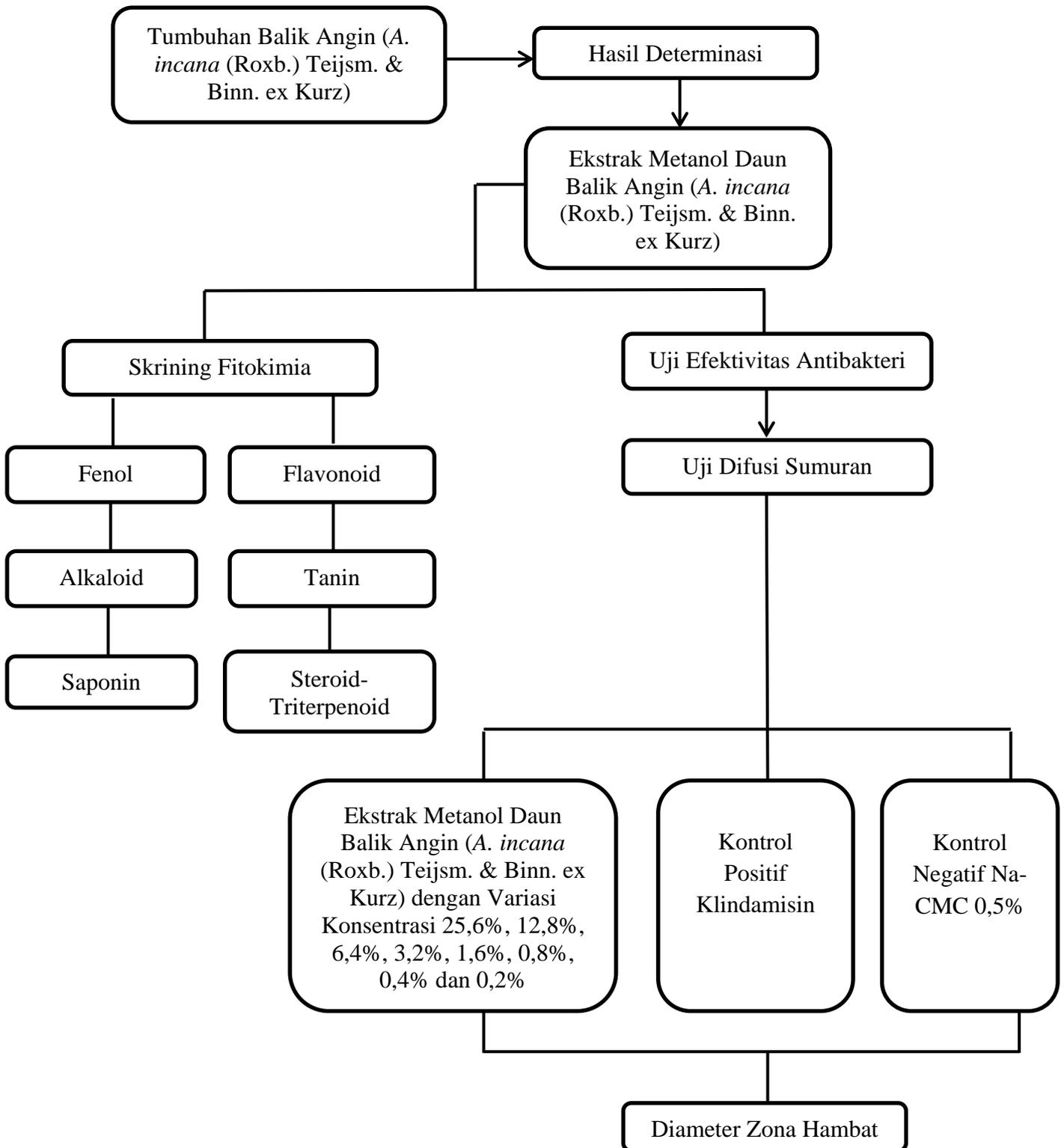
3.9 Analisa Data

Untuk membandingkan perbedaan antara kelompok uji, analisis diameter zona hambat dilakukan menggunakan program SPSS yang meliputi kontrol positif klindamisin, kontrol negatif Na-CMC 0,5%, dan berbagai konsentrasi ekstrak metanol daun Balik Angindalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Analisis yang diterapkan dalam penelitian ini melibatkan uji normalitas *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas *Levene*. Data yang berdistribusi normal dan homogen akan dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95%. Apabila perbedaan signifikan terdeteksi, uji *Post Hoc Tukey HSD* dilakukan untuk menentukan perbedaan spesifik antara

kelompok dengan tingkat kepercayaan yang sama. Untuk data yang tidak memenuhi syarat normalitas atau homogenitas, uji *Kruskal-Wallis* digunakan sebagai metode nonparametrik untuk mengidentifikasi perbedaan signifikan antara kelompok variabel. Selanjutnya, uji *Mann-Whitney* diterapkan untuk mengevaluasi perbedaan antar kelompok dengan tingkat kepercayaan 95%.

3.10 Skema Penelitian



Gambar 6. Skema Kerja Penelitian