

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang diterapkan adalah eksperimen laboratorium dengan *the post-test only control group design*. Tujuannya agar melihat efektivitas anti-*S. epidermidis* dari Daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) diekstraksi dengan pelarut metanol menggunakan metode *soxhlet*.

Dalam penelitian ini, efektivitas ekstrak metanol daun Balik Angin terhadap bakteri *S. epidermidis* diuji dengan menggunakan 8 konsentrasi ekstrak yang berbeda, yaitu 25,6%, 12,8%, 6,4%, 3,2%, 1,6%, 0,8%, 0,4% dan 0,2 %. Selain itu, klindamisin digunakan sebagai kontrol positif dan Na-CMC 0,5% sebagai kontrol negatif. Pengujian ini menggunakan metode sumuran dan diekstraksi dengan pelarut metanol menggunakan metode *soxhlet*. Uji dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan, menurut rumus Federer $(n-1)(t-1) \geq 15$ dimana (t) adalah kelompok dan (n) adalah jumlah minimal pengulangan (Ariyani, 2022). Perhitungan jumlah minimal pengulangan :

$$(n-1)(t-1) \geq 15 = (n-1)(10-1) \geq 15$$

$$= (n-1) 9 \geq 15$$

$$= 9n - 9 \geq 15$$

$$= 9n \geq 15 + 9$$

$$= 9n \geq 24$$

$$= n \geq \frac{24}{9}$$

$$= n \approx 2,666 = 3$$

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari Januari 2024 sampai Juni 2024 di Laboratorium Farmakognosi dan Mikrobiologi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Palangka Raya.

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu variasi konsentrasi ekstrak metanol daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) yaitu 25,6%, 12,8%, 6,4%, 3,2%, 1,6%, 0,8%, 0,4% dan 0,2 %, dengan ekstraksi dilakukan menggunakan metode *soxhlet*. Kontrol positifnya antibiotik klindamisin, sedangkan kontrol negatifnya Na-CMC 0,5%.

3.3.2. Variabel Terikat

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

3.4. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah tumbuhan Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz). Sampelnya adalah daun Balik Angin.

3.5. Alat dan Bahan

3.5.1. Alat

Alat yang diperlukan 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 *water bath* (Memmert®).

3.5.2. Bahan

Bahan yang diperlukan adalah daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz), metanol (CV Pandu Medika), aluminium foil (Klin Pak), larutan FeCl₃ (*Merck*®), asam asetat anhidrat (*Merck*®), kloroform (*Merck*®), serbuk magnesium (Mg) (*Merck*®), asam klorida (HCl) (*Merck*®), reagen Mayer (*Nitra Kimia*®), reagen Wagner (*Nitra Kimia*®), reagen Dragendroff (*Nitra Kimia*®), gelatin 1% (*Merck*®), serbuk Na-CMC 0,5% (*Himedia*®), larutan asam sulfat (H₂SO₄) (*Merck*®), larutan BaCl₂ (*Merck*®), bubuk *Nutrient Agar* (*Merck*®), bubuk *Muller Hinton Agar* (*Oxoid*®), air suling, larutan NaCl 0,9% (*PT Widatra Bakti*®), biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis*, dan cakram uji antibiotik klindamisin (*Oxoid*®).

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pengambilan Sampel

Tanaman daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) diperoleh dari Gunung Tahura, Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Sampel yang dimanfaatkan daun hijau segar yang masih berada dipohon.

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

Sampel Balik Angin di determinasi di Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor. Identifikasi dilakukan untuk mengetahui identitas tanaman yang sebenarnya dan untuk mengetahui apakah tanaman tersebut benar tanaman yang sesuai. Hasil pengukuran yang dilakukan mengatakan bahwa tanaman ini merupakan spesies *A. incana* (Roxb) Teijsm. & Binn. Ex Kurz dari famili *Rhamnaceae*.

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

Daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb) Teijsm. & Binn. Ex Kurz) dikumpulkan dengan cara memanen daun yang masih segar, hijau dan matang. Sampel tanaman disortasi basah dengan mencuci daun Balik Angin dengan air mengalir. Kemudian, daun tersebut dipotong kecil agar mempercepat proses pengeringan. Daun-daun dikeringkan di dalam ruangan yang tidak terkena sinar matahari langsung (Fuentes *et al.*, 2020). Simplisia yang sudah kering disortasi kering agar

menyingkirkan sisa kotoran dan bagian daun yang tidak diperlukan, dihaluskan dengan blender sampai menjadi serbuk, kemudian diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh untuk mendapatkan 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 Metanol Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

Serbuk simplisia daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) ditimbang 50 g lalu dibungkus menggunakan kertas saring yang kedua ujungnya diikat, dan dimasukkan ke dalam bindal *soxhlet* untuk diekstraksi dengan 358 mL metanol sebagai pelarut pada suhu 50°C (Rosyada, 2022). Ekstrak cair yang dihasilkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental, yang kemudian disimpan pada suhu kamar (Ahmed *et al.*, 2019).

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

3.6.5. Skrinning Fitokimia

a. Uji Fenol

Sampel ditimbang 0,1 g dilarutkan dalam 2 mL pelarut, kemudian ditambahkan tetes demi tetes FeCl₃ 10%. Jika warna hijau, merah, ungu atau hitam maka larutan mengandung senyawa fenol (Ramadhan *et al.*, 2020).

b. Uji Flavonoid

Sampel ditimbang 0,1 g dilarutkan dalam 2 mL pelarut. Kemudian, tambahkan 2 tetes Natrium Hidroksida (NaOH) 10% dan kocok. Terbentuknya warna kuning, merah atau coklat dalam larutan mengandung senyawa flavonoid (Lisi *et al.*, 2017).

c. Uji Alkaloid

Sampel ditimbang 0,1 g ditambahkan 5 ml HCl, lalu dibagi menjadi tiga tabung. Reagen *Mayer* ditambahkan ke tabung 1, reagen *Dragendorff* ke tabung 2 dan reagen *Wagner* ke tabung 3. Jika positif alkaloid maka akan terbentuk endapan berwarna jingga hingga coklat dan kemerahan dengan reagen *Dragendorff* (Robinson, 1995 dalam Tasmin *et al.*, 2014). Reagen *Mayer* akan terjadi endapan putih atau kuning, sedangkan reagen *Wagner* terbentuk endapan coklat hingga hitam (Marpaung *et al.*, 2017 dalam Ramadhan *et al.*, 2023).

d. Uji Tanin

Sampel seberat 0,1 g dilarutkan dalam 2 mL pelarut, kemudian tambahkan larutan gelatin 1% sampai terbentuk endapan putih dalam larutan. Hal ini menunjukkan adanya senyawa tanin (Ramadhan *et al.*, 2020).

e. Uji Saponin

Sampel sebanyak 0,1 g ditambahkan 5 mL air panas dan dikocok kuat kurang lebih 10 detik. Busa yang stabil terbentuk dalam waktu

sekitar 10 menit dan tetap ada meskipun satu tetes HCl 2N ditambahkan (Ramadhan *et al.*, 2020).

f. Uji Steroid-Triterpenoid

Sebanyak 0,1 g sampel ditambahkan 2 sampai 3 ml kloroform dan 10 tetes reagen *Lieberman-burchard* melewati dinding tabung. Jika sampel mengandung steroid, maka terbentuk warna biru hingga hijau dalam larutan. Sebaliknya sampel mengandung triterpenoid, akan muncul warna merah atau ungu pada larutan (Ramadhan *et al.*, 2020).

3.7. Pengujian Antibakteri *Staphylococcus epidermidis*

3.7.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang diperlukan untuk penelitian harus disterilkan dahulu sesuai ketentuan masing-masing yaitu : peralatan gelas dimasukkan ke oven di suhu 170⁰C selama 1 jam, dan media disterilkan menggunakan *autoclave* di suhu 121⁰C yang dipertahankan selama 15 menit. Panaskan jarum ose api bunsen. Pengujian mikrobiologi dilakukan secara aseptis dan meja dibersihkan dengan alkohol (Arsyad, 2019; Fitriyanti *et al.*, 2019).

3.7.2. Pembuatan Larutan Na-CMC 0,5%

Timbang 0,5 g serbuk Na-CMC dan tambahkan dalam 70 mL *aquadest* panas, kemudian tambahkan *aquadest* dingin hingga sampai batas 100 mL. Lakukan sterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit di suhu 121⁰C (Arsyad, 2019).

3.7.3. Pembuatan Larutan Standar 0,5 Mc-Farland

Siapkan larutan 0,5 Mc-Farland dengan melarutkan 9,95 mL larutan H₂SO₄ 1% dan 0,05 mL larutan BaCl₂ 1% lalu dikocok hingga terbentuk larutan keruh (Sandra *et al.*, 2022).

3.7.4. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Metanol dari Daun

Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

Larutan uji yang diperlukan untuk menguji aktivitas antibakteri *S. epidermidis* adalah ekstrak metanol daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) pada 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 menyiapkan larutan dengan konsentrasi 25,6%, timbang 1,28 g ekstrak kemudian tambahkan 5 mL larutan Na-CMC 0,5% gerus dalam mortir sampai homogen. Pada konsentrasi 25,6% ambil 2,5 mL larutan dan masukan ke dalam *beaker glass* berisi 2,5 mL larutan Na-CMC untuk memperoleh konsentrasi 12,8%. Pengenceran selanjutnya pada konsentrasi 6,4%, 3,2%, 1,6%, 0,8%, 0,4% dan 0,2% dilakukan dengan cara yang sama seperti sebelumnya (Subareng, 2023).

3.7.5. Pembuatan Media *Brain Heart Infusion* (BHI)

Media BHI seberat 1,11 g dan dilarutkan dalam 30 ml *aquadest* pada tabung erlenmeyer, lalu diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Media disterilkan dengan *autoclave* di suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian, tuangkan ke dalam tabung reaksi dan

tutup dengan aluminium foil. Media BHI dapat dimanfaatkan untuk media kultur bakteri (Ortez, 2005 dalam Undap, *et al.*, 2017).

3.7.6. Pembuatan Media *Manitol Salt Agar* (MSA)

Media MSA ditimbang 11,1 g dan larutkan dalam *aquadest* steril sebanyak 50 ml. Panaskan media hingga semua bahan larut dalam media agar (Mamay, 2022). Tempatkan dalam *autoclave* pada suhu 121⁰C dipertahankan selama 15 menit. Lalu media didiamkan pada suhu ruang selama \pm 30 menit sampai padat dan dapat digunakan untuk peremajaan bakteri (Fitriyanti *et al.*, 2019).

3.7.7. Peremajaan *Staphylococcus epidermidis*

Peremajaan bakteri dilakukan mengambil satu ose bakteri *S. epidermidis* menggunakan ose steril yang dipijarkan lalu digoreskan di permukaan media MSA dengan zig-zag dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam (Fitriyanti *et al.*, 2019)

3.7.8. Pewarnaan Gram Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Pewarnaan gram digunakan untuk mendeteksi karakteristik gram dan morfologi bakteri. Oleskan pada *object glass*, kemudian difiksasi pada bunsen, lalu ditetesi *crystal violet*, didiamkan 1 sampai 2 menit. Sisa pewarna dibuang dan dicuci. Teteskan larutan lugol dan diamkan selama 30 detik. Buang lugol dan cuci dengan air.

Preparat dilunturkan menggunakan alkohol 96% hingga semua pewarna hilang dan cuci. Pewarna safranin ditambahkan tetes demi tetes, dibiarkan selama 2 menit, dibilas menggunakan air dan keringkan, preparat ditetesi minyak imersi dan amati dengan mikroskop perbesaran 10 x 100 (Mahmudah *et al.*, 2016).

3.7.9. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Kultur *S. epidermidis* yang sudah diinkubasi kemudian diambil menggunakan jarum ose, dan ditempatkan pada tabung reaksi, berisi 1 mL larutan garam fisiologis (NaCl) 0,9% steril, diinkubasi di suhu 37⁰C selama 24 jam dan bandingkan kekeruhannya dengan larutan *Mc-Farland* 0,5 (Fitriyanti *et al.*, 2019).

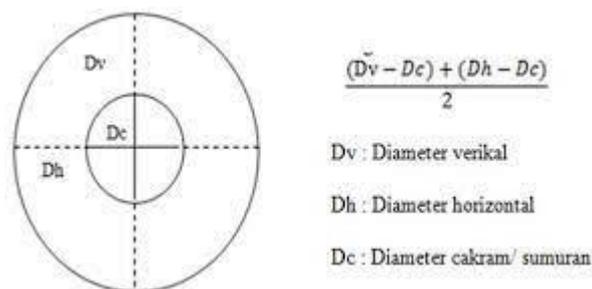
3.7.10. Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

Media MHA ditimbang 2,28 g lalu dilarutkan dalam 60 mL *aquadest* sambil dipanaskan di atas *hot plate*. Lalu media disterilisasi dengan *autoclave* di suhu 121⁰C dipertahankan selama 15 menit. Dinginkan media sampai suhu \pm 50⁰C dan bagi media dalam 15 cawan petri steril untuk diuji aktivitas antibakterinya. Setelah dingin, media padat disimpan di lemari es (Subareng 2023).

3.7.11. Uji Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Sumuran

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) dilakukan dengan media MHA steril dan diinokulasi *Staphylococcus epidermidis* menggunakan *cotton swap* steril. Tambahkan 20 μ L ekstrak metanol daun Balik Angin

dari variasi konsentrasi yang berbeda setiap sumur media MHA. Disk antibiotik klindamisin berfungsi menjadi kontrol positif dan Na-CMC 0,5% berfungsi menjadi kontrol negatif. Kultur tersebut kemudian ditempatkan dalam lemari es pada suhu 2-8⁰C selama 14-18 jam agar senyawa dapat berdifusi ke dalam media. Kultur kemudian diinkubasi di suhu 37⁰C selama 24 jam. Kemudian diameter zona hambat diukur dengan jangka sorong dan dikelompokkan ke kategorinya (Fitriyanti *et al.*, 2019; Ramadhan *et al.*, 2020).



Gambar 4. Rumus Perhitungan Daya Zona Hambat

Tabel 1. Kategori Daya Hambat Bakteri

Diameter Zona Hambat	Kategori
≥ 20 mm	Sangat Kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

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

3.8. Analisa Data

Data berupa diameter zona hambat kemudian, dianalisis data menggunakan SPSS setiap pengujian yang berisi klindamisin kontrol positif

dan kontrol negatif Na-CMC 0,5%, dan 8 konsentrasi ekstrak metanol daun Balik Angin (*A. incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) apakah dapat mencegah pertumbuhan *S. epidermidis*.

Uji analisis yang digunakan adalah uji normalitas yaitu *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas yaitu *Levene*. Jika data yang diperoleh berdistribusi normal dan homogen, selanjutnya uji *One Way ANOVA* tingkat kepercayaan 95%. Dilanjutkan uji *Post Hoc Tukey HSD* agar melihat perbedaan antara masing-masing kelompok dengan tingkat kepercayaan 95%. Jika data tidak berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan uji nonparametrik atau uji *Kruskall-Wallis*, untuk memastikan apakah terdapat beda yang signifikan secara statistik antar dua atau lebih kelompok variabel. Analisisnya kemudian menggunakan uji *Mann-Whitney Test* dengan tingkat kepercayaan 95%.

3.9 Diagram Alur Penelitian

