

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah penelitian kuantitatif atau eksperimental, yang dilakukan dengan mengukur hubungan sebab akibat. Penelitian dilakukan bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol 96% daun Langsat (*Lansium domesticum* Corr.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi sumuran.

#### **3.2. Waktu dan Tempat Penelitian**

Waktu penelitian dilakukan mulai dari bulan Januari 2023 hingga bulan Juni 2023, dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Borneo Lestari untuk pembuatan ekstrak dan Laboratorium Mikrobiologi Parasitologi Universitas Borneo Lestari untuk melakukan uji aktivitas bakteri.

#### **3.3. Variabel Penelitian**

##### **3.3.1. Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi pada masing-masing ekstrak untuk uji aktivitas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

### 3.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri yang ditandai dengan diameter zona hambat.

## 3.4. Alat dan Bahan

Pada penelitian ini memerlukan beberapa alat serta bahan untuk keperluan kegiatan kali ini, yaitu:

### 3.4.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (*Xinfeng*), aluminium foil (*Klin Pak*), gelas ukur (*Pyrex*®), blender (*National*®), tabung reaksi (*Pyrex*®), rak tabung reaksi, erlenmeyer (*Pyrex*®), incubator (*Memmert*®), timbangan analitik (*Ohaus*®), mikropipet (*Dragon Lab*®), oven, pengayak mesh 40 (*MBT*®), jangka sorong (*Krisbow*®), jarum ose (*Rofa*), batang pengaduk (*Pyrex*®), pipet tetes (*Pyrex*®), *rotary evaporator* (IKA), penjepit tabung, corong (*Pyrex*®), cawan petri (*Pyrex*®), *water bath* (*Memmert*®), lemari pendingin (*Sharp*), dan cawan porselen.

### 3.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Langsat (*Lansium domesticum* Corr.) sebanyak 1,4 kg, etanol 96 %, larutan  $\text{FeCl}_3$ , serbuk magnesium, asam klorida (HCl), pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendroff, gelatin 1%, serbuk Na-CMC 0,5%, larutan asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), larutan  $\text{BaCl}_2$ , serbuk

*Nutrient Agar*, serbuk *Muller Hinton Agar*, aquadest, larutan NaCl 0,9%, biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan cakram antibiotik klindamisin.

### **3.5. Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1. Pengambilan Sampel**

Tanaman daun Langsung (*Lansium domesticum* Corr.) didapat dari Desa Surian, Kecamatan Mataraman, Kalimantan Selatan. Sampel daun yang dipakai berupa daun hijau yang masih segar berada di pohon.

#### **3.5.2. Determinasi Tanaman Langsung (*Lansium domesticum* Corr.)**

Tanaman Langsung (*Lansium domesticum* Corr.) terdiri dari akar, batang, daun, dan buah kemudian dideterminasi di Laboratorium FMIPA Universitas Lambung Mangkurat. Determinasi tanaman ini bertujuan agar memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian sesuai sehingga tidak terjadi kesalahan saat mengambil sampel penelitian.

#### **3.5.3. Pembuatan Simplisia Daun Langsung (*Lansium domesticum* Corr.)**

Lakukan sortasi basah pada daun Langsung (*Lansium domesticum* Corr.) yang hijau dan segar, cuci dengan air bersih mengalir. Daun Langsung kemudian dirajang untuk memudahkan proses pengeringan. Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan ataupun dijemur di bawah sinar matahari langsung

menggunakan wadah, tutup dengan kain hitam. Jika simplisia sudah kering, lakukan sortasi kering untuk memisahkan tanaman dari kotoran yang tertinggal atau dari tanaman yang tidak diinginkan, kemudian blender hingga halus, ayak dengan pengayakan mesh 40 (Fitriyanti *et al.*, 2019).

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

#### **3.5.4. Pembuatan Ekstrak Daun Langsung (*Lansium domesticum* Corr.)**

Serbuk simplisia daun Langsung (*Lansium domesticum* Corr.) diekstraksi menggunakan metode *soxhlet* dengan cara timbang serbuk daun Langsung sebanyak 50 g lalu bungkus dengan menggunakan kertas saring, kemudian ikat kedua ujungnya. Masukkan sampel ke dalam bidal *soxhlet* dan ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 300 mL pada suhu <70°C hingga warna pelarut berubah seperti semula. Setelah proses ekstraksi dilakukan, didapat filtrat daun Langsung (Jaafar *et al.*, 2016). Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental, kemudian simpan ekstrak kental pada suhu kamar (Ahmed *et al.*, 2019).

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Bobot Ekstrak yang Diperoleh}}{\text{Bobot Simplisia yang Diekstraksi}} \times 100\% \text{ (Cock, 2020; Fitriyanti et al., 2019)}$$

### 3.5.5. Skrining Fitokimia

#### a. Identifikasi Fenolik

Sampel 0,1 g dilarutkan ke dalam 5 mL etanol 96%. Larutan kemudian diambil sebanyak 1 ml, tambahkan 2 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1%. Apabila terbentuknya warna hijau atau biru menunjukkan adanya senyawa fenolik (Yunus *et al.*, 2018).

#### b. Identifikasi Alkaloid

Sebanyak 0,1 g sampel ditambahkan dengan 5 mL HCl 2N, kemudian bagi menjadi tiga tabung. Tabung 1 tambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, tabung 2 tambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff, dan pada tabung 3 tambahkan 2 tetes pereaksi Wagner. Apabila pada tabung 1 terbentuk endapan berwarna putih, tabung 2 terbentuk endapan berwarna kuning kejinggaan dan tabung 3 terbentuk endapan berwarna merah kecoklatan menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Ramadhan *et al.*, 2020).

#### c. Identifikasi Flavonoid

Sampel sebanyak 0,1 g dilarutkan pada masing-masing pelarut sebanyak 2 mL, lalu tambahkan 2 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian tambahkan amil alkohol dan apabila terbentuk warna merah, kuning atau jingga menandakan positif adanya senyawa flavonoid (Ramadhan *et al.*, 2020).

d. Identifikasi Steroid-Triterpenoid

Sebanyak 0,1 g sampel ditambahkan 2-3 mL kloroform dan asetat anhidrat sebanyak 10 tetes serta 2 atau 3 tetes  $H_2SO_4$  (pereaksi *Lieberman-Burchard*) melalui dinding tabung. Apabila terbentuk warna biru sampai hijau menandakan positif senyawa steroid dan apabila terbentuk warna merah atau ungu menandakan positif mengandung triterpenoid (Ramadhan *et al.*, 2020).

e. Identifikasi Saponin

Sebanyak 0,1 g sampel ditambahkan 5 mL air panas kemudian dikocok kuat selama kurang lebih 10 detik. Apabila terbentuk busa yang stabil selama kurang lebih 10 menit, setelah itu tambahkan 1 tetes HCl 2N, busa tersebut tidak hilang menunjukkan positif senyawa saponin (Ramadhan *et al.*, 2020).

f. Identifikasi Tanin

Sebanyak 0,1 g sampel dilarutkan pada masing-masing pelarut sebanyak 2 mL, lalu tambahkan larutan gelatin 1%, apabila terbentuk endapan berwarna putih menandakan adanya senyawa tanin (Ramadhan *et al.*, 2020).

### **3.6. Pengujian Antibakteri *Staphylococcus aureus***

#### **3.6.1. Sterilisasi Alat dan Bahan**

Dalam penelitian ini alat-alat yang akan digunakan sebaiknya dicuci terlebih dahulu agar tidak terjadi kontaminasi dari mikroorganisme lain. Alat-alat berbahan kaca disterilkan dengan menggunakan oven selama 1 jam pada suhu 170°C, untuk media disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C, dan jarum ose disterilkan dengan cara pemijaran api bunsen. Untuk pengerjaan uji mikrobiologi dilakukan secara aseptis dan meja harus dibersihkan dengan menggunakan alkohol (Laila *et al.*, 2023; Arsyad *et al.*, 2020).

#### **3.6.2. Pembuatan Larutan Na-CMC 0,5%**

Cara pembuatan larutan Na-CMC 0,5% dengan cara sebanyak 0,5 g serbuk Na-CMC dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam aquadest 70 mL *aquadest* panas, kemudian aduk hingga larutan berwarna bening. Tambahkan *aquadest* dingin hingga batas 100 mL. setelah itu, sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Mpila *et al.*, 2018).

#### **3.6.3. Pembuatan Larutan Standar 0,5 Mc-Farland**

Larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sebanyak 9,95 mL dicampurkan dengan larutan BaCl<sub>2</sub> 1% sebanyak 0,05 mL di dalam erlenmeyer, kemudian kocok hingga terbentuk larutan keruh (Ramadheni *et al.*, 2018).

#### **3.6.4. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Etanol 96% dari Daun Langsat (*Lansium domesticum* Corr.)**

Dalam pengujian aktivitas antibakteri larutan uji yang digunakan dengan cara mengencerkan ekstrak etanol 96% daun Langsat menjadi beberapa kelompok konsentrasi bertingkat. Beberapa konsentrasi yang digunakan diantaranya 0,2%, 0,4%, 0,8%, 1,6%, 3,2% dan 6,4%. Pembuatan larutan konsentrasi 6,4% dengan cara 0,32 g ekstrak ditimbang kemudian tambahkan Na-CMS 0,5% sebanyak 5 mL, lalu gerus ad homogen menggunakan mortar. Untuk memperoleh konsentrasi 3,2% ambil 2,5 mL larutan dari konsentrasi 6,4% kemudian masukkan ke dalam vial yang berisi larutan Na-CMC 0,5% sebanyak 2,5 mL. Untuk memperoleh konsentrasi 1,6% ambil 2,5 mL larutan dari konsentrasi 3,2% kemudian masukkan ke dalam vial yang berisi larutan Na-CMC 0,5% sebanyak 2,5 mL. Untuk memperoleh konsentrasi 0,8% ambil 2,5 mL larutan dari konsentrasi 1,6% kemudian masukkan ke dalam vial yang berisi larutan Na-CMC 0,5% sebanyak 2,5 mL. Untuk memperoleh konsentrasi 0,4% ambil 2,5 mL larutan dari konsentrasi 0,8% kemudian masukkan ke dalam vial yang berisi larutan Na-CMC 0,5% sebanyak 2,5 mL. Untuk memperoleh konsentrasi 0,2% ambil 2,5 mL larutan dari konsentrasi 0,4% kemudian masukkan ke dalam vial yang berisi larutan Na-CMC 0,5% sebanyak 2,5 mL.

### 3.6.5. Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Membuat media Nutrient Agar dengan cara sebanyak 0,42g media NA dilarutkan ke dalam aquadest 15 mL (23 g/1000 mL) menggunakan erlenmeyer. Panaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Masukkan media sebanyak 5 mL ke dalam 3 tabung reaksi steril yang berbeda dan tutup dengan aluminium foil. Sterilkan media menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C, kemudian keluarkan media dan biarkan selama  $\pm$  30 menit pada suhu ruangan hingga media memadat pada kemiringan 30° agar dapat digunakan dalam peremajaan bakteri (Fitriyanti *et al.*, 2019).

### 3.6.6. Pewarnaan Gram Bakteri *Staphylococcus aureus*

Pewarnaan gram bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan mengambil 1 ose lalu goreskan pada kaca objek steril dan difiksasi. Teteskan 1 tetes kristal violet pada permukaan preparat, tunggu hingga 1 menit kemudian bilas menggunakan aquadest sampai luntur lalu keringkan. Selanjutnya teteskan 1 tetes lugol pada permukaan preaparat, tunggu 1 menit kemudian bilas menggunakan aquadest sampai luntur dan keringkan. Bilas preparat dengan alkohol 96% sampai zat warna luntur kemudian cuci menggunakan aquadest lalu keringkan. teteskan 1 tetes safranin pada preparat, tunggu 45 detik kemudian bilas menggunakan aquadest lalu keringkan (Muhammad *et al.*, 2017). Tetesi preparat

dengan minyak imersi, kemudian amati menggunakan mikroskop perbesaran  $10 \times 100$  (Mahmudah *et al.*, 2016).

### **3.6.7. Peremajaan *Staphylococcus aureus***

Peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan cara mengambil satu ose bakteri menggunakan ose steril yang sudah dilakukan pemijaran di atas api bunsen dari kultur murninya, kemudian goreskan pada permukaan media agar miring dengan cara zig-zag dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  (Primadiamanti *et al.*, 2022).

### **3.6.8. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus***

Hasil dari peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus* kemudian diambil menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1 mL larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%) lalu inkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , setelah itu bandingkan kekeruhannya dengan larutan standar *Mc-Farland* 0,5 (Primadiamanti *et al.*, 2022).

### **3.6.9. Pembuatan Media Muller Hinton Agar (MHA)**

Dalam pembuatan media MHA, sebanyak 6,08 g media MHA (38 g/1000 mL) dilarutkan ke dalam 160 mL aquadest sambil dipanaskan menggunakan *hotplate* hingga larut sempurna. Setelahnya media akan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Media didinginkan hingga suhu  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ , bagi media ke dalam 8 cawan petri steril. Media padat yang

sudah dingin kemudian disimpan dalam kulkas (Fitriyanti *et al.*, 2019).

### **3.6.10. Uji Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Sumuran**

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun Langsung dilakukan dengan cara media MHA yang sudah steril digoreskan bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan *cotton swap* steril. Buat beberapa lubang sumuran sesuai yang diperlukan menggunakan *cork borer*. Pada masing-masing lubang sumuran media MHA dimasukkan sebanyak 20  $\mu$ L ekstrak etanol 96% daun Langsung dari berbagai variasi konsentrasi menggunakan mikropipet. Untuk kontrol positif disk antibiotik klindamisin dan untuk kontrol negatif Na-CMC 0,5%. Media yang sudah dilakukan pengujian kemudian dibungkus menggunakan aluminium foil. Setelah itu, cawan petri diletakkan ke dalam kulkas selama 24 jam pada suhu 4°C agar senyawa dapat berdifusi pada media. Selanjutnya dilanjutkan dengan menginkubasi kultur selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian ukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan jangka sorong dan klasifikasikan berdasarkan kategorinya (Basir *et al.*, 2017; Fitriyanti *et al.*, 2019). Berdasarkan rumus Federer yaitu  $(n-1)(t-1) \geq 15$  dimana (t) adalah kelompok dan (n) adalah jumlah minimal pengulangan, pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Aryani, 2022).

Perhitungan jumlah minimal pengulangan:

$$\begin{aligned}
 (n-1)(t-1) &\geq 15 &= (n-1)(8-1) &\geq 15 \\
 & &= (n-1)7 &\geq 15 \\
 & &= 7n - 7 &\geq 15 \\
 & &= 7n &\geq 15 + 7 \\
 & &= 7n &\geq 22 \\
 & &= n &\geq \frac{22}{7} \\
 & &= n &\geq 3,142 \geq 3
 \end{aligned}$$

Kategori kekuatan zat antimikroba berdasarkan diameter zona hambat (Nugraheni *et al.*, 2021).

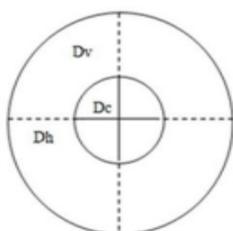
**Tabel 1.** Klasifikasi Zona Hambat

<b>Diameter Zona Hambat</b>	<b>Kategori</b>
$\geq 20$ mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
$\leq 5$ mm	Kurang/lemah

Dalam mengamati zona hambat bakteri perlu diinkubasi  $1 \times 24$  jam. Daerah zona bening yang terbentuk menunjukkan adanya kepekaan bakteri terhadap antibiotik. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm). pengukuran zona hambat diukur vertikal dan horizontal dengan rumus: (Saputera *et al.*, 2019).

Menurut Harti (2015), rumus perhitungan diameter zona hambat yaitu:

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



Dv = Diameter vertical

Dh = Diameter horizontal

Dc = Diameter sumur

### 3.7. Analisis Data

Data hasil berupa diameter zona hambat yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan SPSS untuk melihat perbedaan dari masing-masing kelompok uji yang mengandung kontrol positif klindamisin dan kontrol negatif Na-CMC 0,5% dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol 96% daun Langsat (*Lansium domesticum* Corr.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Uji analisis yang digunakan pada penelitian ini adalah uji normalitas dan uji homogenitas. Jika data yang didapat terdistribusi secara normal dan homogen maka selanjutnya akan dilakukan uji *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%, selanjutnya dilakukan uji *Post hoc Tukey HSD* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok dengan taraf kepercayaan 95%. Jika data yang didapat tidak terdistribusi normal dan tidak homogen maka dilanjutkan uji nonparametrik yaitu uji *Kruskall-Wallis*. Sementara itu, untuk menentukan apakah ada perbedaan yang signifikan secara statistik antara dua atau lebih kelompok variabel,

maka dilakukan analisis uji *Mann-Whitney Test* dengan taraf kepercayaan 95%.

### 3.8. Kerangka Operasional

