

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan *post-test only control group design*. Kelompok desain akan terbagi menjadi 2, yaitu kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan dan kelompok eksperimen yang diberi perlakuan dengan tujuan melihat pengaruh perlakuan yang telah diberikan. Jenis penelitian adalah eksperimental menggunakan 2 variabel, yaitu variabel bebas dan variabel terikat yang akan mengetahui pengaruh antara variabel satu dan variabel lainnya. Dalam penelitian ini melakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanko) Merr. & Rolfe) terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Metode pengujian bakteri menggunakan metode sumuran dengan modifikasi konsentrasi ekstrak 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, dan 50%. Untuk kontrol positif menggunakan ciprofloxacin 5 µg/ disk dan kontrol negatif menggunakan DMSO 10%.

Konsep perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Konsentrasi 1 (C1) = 25%
- Konsentrasi 2 (C2) = 30%
- Konsentrasi 3 (C3) = 35%
- Konsentrasi 4 (C4) = 40%

- Konsentrasi 5 (C5) = 45%
- Konsentrasi 6 (C6) = 50%
- Kontrol positif (K+) = Ciprofloxacin 5 µg/disk
- Kontrol negatif (K-) = DMSO 10%
- Untuk pengulangan dihitung menggunakan ketentuan rumus Federer maka dilakukan tiga kali pengulangan (Pao *et al.*, 2022).

Rumus Federer : $(n-1)(t-1) \geq 15$

n = jumlah minimal pengulangan

t = jumlah kelompok

perhitungan jumlah pengulangan:

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

$$(n-1)(8-1) \geq 15$$

$$(n-1)(7) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 15 + 7$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq \frac{22}{7} = 3,14 \approx 4 \text{ kali replikasi}$$

3.2. Waktu dan tempat penelitian

3.2.1. Waktu penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan januari 2024 sampai bulan mei 2024.

3.2.2. Tempat penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Baham Alam dan Laboratorium Mikrobiologi-parasitologi Universitas Borneo Lestari.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Semua tumbuhan sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) diperoleh dari Desa Sungai Rangas, Kecamatan Barabai, Kabupaten Hulu Sungai Tengah, Provinsi Kalimantan Selatan.

3.3.2. Sampel

Sampel tumbuhan sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) yang akan digunakan diperoleh dari Desa Sungai Rangas, Kecamatan Barabai, Kabupaten Hulu Sungai Tengah, Provinsi Kalimantan Selatan. Bagian yang digunakan dari tumbuhan ini adalah bagian daun yang segar dan bebas dari hama.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah modifikasi konsentrasi 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, dan 50% ekstrak etanol 96% daun sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe).

3.4.2. Variabel Terikat

Pada penelitian ini yang menjadi variabel terikat adalah diameter zona hambat ekstrak etanol 96% daun sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) terhadap bakteri *Salmonella typhi* pada masing-masing perlakuan.

3.5. Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat

Pada penelitian ini digunakan alat yaitu autoklaf (All american®), batang pengaduk, *aluminium foil*, gelas beker (Pyrex®), blender, bunsen, cawan petri, cawan penguap, enlenmeyer (Pyrex®), corong kaca inkubator, jangka sorong, kaca arloji, kapas, kertas cakram, labu ukur, ose, oven, (Thermo Scientific®), penggaris, penjepit tabung, rak tabung reaksi, *rotary evaporator* (IKRF 10®), tabung reaksi (Iwaki®), timbangan analitik (Ohaus®), pengayak, dan *water bath* (Memmart®).

3.5.2. Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan antara lain, amil alkohol, asam asetat anhidrat, asam sulfat (H_2SO_4), aquades, amoxicillin, bakteri *Salmonella typhi*, daun sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe), etanol 96%, $FeCl_3$, HCL pekat, HCL 2N, larutan standar Mc Farland 0,5, media *Nutrient Agar* (NA), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), NaCl, Na-CMC 0,5%, pereaksi

dragendroff, pereaksi mayer, pereaksi, wagner, serbuk magnesium (Mg).

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Determinasi Tumbuhan Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe)

Tumbuhan sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) yang terdiri dari batang dan daun dideterminasi di Laboratorium FMIPA Universitas Lambung Mangkurat. Determinasi dilakukan agar menghindari terjadinya kekeliruan saat pengambilan sampel dan mengetahui validitas tanaman yang digunakan sudah sesuai.

3.6.2. Pengambilan Sampel

Tumbuhan sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) diperoleh dari Desa Sungai Rangas, Kabupaten Hulu Sungai Tengah, Kalimantan Selatan. Bagian tanaman yang digunakan adalah daun sebanyak 2,5 kg yang sudah melewati proses sortasi basah.

3.6.3. Pembuatan Simplisia Daun Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe)

Pembuatan simplisia daun sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) diawali dengan pengumpulan sampel, kemudian dilanjutkan dengan sortasi basah yang bertujuan untuk memisahkan bahan asing yang tidak diperlukan. Setelah sortasi basah dilakukan, diperoleh 2,5 kg daun sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe). Selanjutnya dilakukan pencucian dengan

menggunakan air mengalir hingga bersih dari kotoran dan bahan asing yang melekat. Setelah itu, dilakukan proses perajangan yang bertujuan memperkecil ukuran sampel. Kemudian dilakukan pengeringan daun sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) dibawah sinar matahari pada jam 8-10 ditutup dengan kain hitam dan diangin-anginkan. Setelah melalui proses pengeringan, dilakukan sortasi kering agar memastikan simplisia sudah bebas dari benda asing. Selanjutnya daun sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) yang telah kering dihaluskan menggunakan blender sehingga mendapat serbuk halus (Pao *et al.*, 2022). Simplisia yang sudah menjadi serbuk, diayak dengan ayakan no. 40 (Jayani & Handojo, 2021).

Setelah melewati beberapa proses, simplisia daun sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) ditimbang dan dihitung rendemen yang diperoleh. Rumus randemen simplisia adalah sebagai berikut (Suryani *et al.*, 2023):

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

3.6.4. Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun Sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe)

Pada pembuatan ekstrak etanol 96% daun sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) dengan metode maserasi. Ekstraksi diawali dengan menimbang serbuk sebanyak yang didapat dan direndam dengan etanol 96% dengan perbandingan 1:3

selama 3× 24 jam sambil diaduk 1-2 kali setiap hari. Kemudian dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali. Setelah proses ekstraksi berakhir, maserat dipisah dari pelarut dengan penyaringan. Kemudian maserat yang sudah dikumpulkan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan *waterbath* sampai mendapatkan ekstrak kental (Pao *et al.*, 2022).

Ekstrak kental daun sengkang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) yang sudah diperoleh selanjutnya akan ditimbang dan dihitung rendemen ekstraknya rumus yang digunakan untuk menghitung rendemen ekstrak adalah sebagai berikut (Apriliana *et al.*, 2019):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak (g)}}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\%$$

3.6.5. Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Pada pengujian alkaloid ditimbang 0,5 gram ekstrak, kemudian ditambahkan 1 mL HCL 2 N dan dilarutkan dengan 9 mL aquadest. selanjutnya panaskan filtrat yang sudah diperoleh di atas penangas air selama 2 menit, dinginkan lalu saring. Filtrat yang digunakan untuk uji alkaloid dimasukan ke dalam 3 tabung reaksi dengan jumlah masing-masing 0,5 mL filtrat. Tabung pertama tambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, tabung kedua tambahkan 2 tetes pereaksi Dragendroff, dan tabung ketiga

tambahkan 2 tetes pereaksi wagner. Dinyatakan positif alkaloid jika terbentuk endapan kuning pada tabung pertama, endapan jingga pada tabung kedua, dan endapan putih kekuningan pada tabung ketiga (Hasibuan & Edrianto, 2021).

b. Uji flavonoid

Pada pengujian flavonoid ditimbang 0,1 gram ekstrak, kemudian dilarutkan ke dalam 2 mL pelarut, dan tambahkan 10 tetes HCL pekat, 0,2 gram serbuk magnesium. Hasil uji dinyatakan positif mengandung flavonoid jika larutan berubah warna menjadi kemerahan, kuning atau jingga (Andasari *et al.*, 2020)

c. Uji Tanin

Pada pengujian tanin ditimbang 0,1 gram ekstrak, kemudian dilarutkan dalam 2 mL pelarut, dan tambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 , jika terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan ekstrak positif mengandung tanin (Kumalasari *et al.*, 2020).

d. Uji Triterpenoid/steroid

Pada pengujian triterpenoid ditimbang 0,1 gram ekstrak, kemudian dilarutkan dalam 1 mL kloroform, dan tambahkan 1 mL asam asetat anhidrida. Selanjutnya tetesi dengan 5 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika terbentuk warna kecoklatan menunjukkan ekstrak positif mengandung triterpenoid

sedangkan ekstrak terbentuk warna hijau menunjukkan positif steroid (Rubianti *et al.*, 2022).

e. Uji Saponin

Pada pengujian saponin ditimbang 0,1 gram ekstrak kemudian dilarutkan dalam aquadest, dan ditambahkan 10 mL air panas. Selanjutnya dinginkan dan kocok kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang tidak menghilang selama kurang lebih 10 menit dengan tinggih buih 1-10 cm maka ekstrak positif mengandung saponin (Kumalasari *et al.*, 2020).

3.6.6. Pengujian Antibakteri *Salmonella typhi*

a. Sterilisasi Media dan Alat

Alat yang digunakan untuk mensterilisasi alat dan media adalah sebagai berikut:

1. Alat yang digunakan untuk sterilisasi media yaitu *autoklaf*. *Autoklaf* merupakan jenis sterilisasi basah yang cara kerjanya dibawah tekanan uap air. Selain digunakan untuk sterilisasi media, alat lain yang disterilkan menggunakan autoklaf seperti peralatan dari plastik berkualitas baik dan peralatan dari kaca. Media disterilkan dengan cara memasukan kedalam *autoklaf* pada suhu 121°C dan membutuhkan waktu 15-20 menit (Wulandari *et al.*, 2022).
2. Alat yang digunakan untuk mensterilkan alat yaitu oven. Oven digunakan untuk sterilisasi alat yang tidak dapat basah

dan peralatan yang tidak mudah meleleh atau berubah bentuk jika terkena suhu tinggi. Waktu yang dibutuhkan dalam proses sterilisasi menggunakan oven adalah 1-2 jam dengan temperatur 170°C (Wulandari *et al.*, 2022).

b. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Nutrien Agar (NA) ditimbang sebanyak 20 gram, kemudian dilarutkan ke dalam 750 mL aquadest di dalam labu enlenmeyer sambil diaduk menggunakan *stirrer*. Setelah itu panaskan sampai mendidih dan berubah warna menjadi kekuningan \pm 20 menit. Kemudian masukkan ke dalam *autoklaf*, sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Tuang sebanyak 10-20 mL ke dalam cawan petri dan biarkan hingga memadat (Pao *et al.*, 2022).

c. Peremajaan Bakteri Menggunakan Media *Nutrient Agar* (NA)

Peremajaan bakteri *Salmonella typhi* dilakukan pada media *Nutrient Agar* (NA). Bakteri *Salmonella typhi* diinokulasi sebanyak 1 ose ke dalam media *Nutrient Agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Proses peremajaan dilakukan secara steril di dalam *Laminar Air Flow* (Pao *et al.*, 2022).

d. Pewarnaan Gram Bakteri *Salmonella typhi*

Pewarnaan gram bakteri dilakukan dengan cara ambil 1 ose bakteri lalu goreskan pada kaca objek yang sudah disterilisasi dan difiksasi dengan dilewatkan di atas api hingga mengering. Tetesi preparat dengan 1 tetes kristal violet selama 2 menit dan

bilas dengan aquadest. Kemudian tetesi iodine dan diamkan selama 30 detik dan bilas dengan aquadest. Olesan digenangi decolourizer sampai tidak ada lagi warna, lalu bilas dengan aquadest. Selanjutnya pewarnaan menggunakan safranin 0,5% selama 1 menit dan bilas dengan aquadest lalu keringkan. Tahap berikutnya yaitu melihat preparat pada perbesaran 10× atau 100×. Sel bakteri berwarna merah menunjukkan bakteri termasuk dalam golongan negatif (Shantia *et al.*, 2021).

e. Pembuatan Larutan Standar Mc Farland 0,5

Larutan standar Mc Farland 0,5 digunakan sebagai pembanding kekeruhan jumlah koloni bakteri pada medium cair yang digunakan dalam pengujian daya antibakteri. Proses pembuatan larutan standar farland melarutkan 0,05 ml Barium Clorida (BaCl_2) 1% dan 9,95 mL Asam Sulfat (H_2SO_4) 1 % . kemudian disimpan ditempat yang terhindar dari cahaya matahari langsung (Aviany & Pujiyanto, 2020).

f. Pembuatan Suspensi Bakteri

Proses pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan mengambil stok kultur *Salmonella typhi* menggunakan jarum ose steril dan disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCl 0,9%. Larutkan sampai didapatkan kekeruhan yang sama dengan larutan standar Mc Farland 0,5 (Pao *et al.*, 2022).

g. Pembuatan Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)

Pembuatan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) diawali dengan menimbang sebanyak 10,2 gram dan dilarutkan dengan 300 mL aquadest (34 gram/ 1000 mL). Setelah itu larutan dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen. Kemudian media disterilkan dengan *autoklaf* pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu tuang ke dalam cawan petri masing-masing \pm 20 mL, media dibiarkan hingga memadat (Pratiwi, 2015).

h. Pembuatan kontrol negatif DMSO 10%

Pembuatan kontrol negatif yaitu dengan DMSO sebanyak 10 mL dan dilarutkan dengan aquadest steril sebanyak 10 mL, kemudian larutkan sampai homogen (Yusuf *et al.*, 2020).

i. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Etanol 96% daun sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe)

Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol 96% daun sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) yang akan digunakan adalah 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, dan 25%.

Berikut adalah proses pembuatan variasi ekstrak:

a. Pembuatan larutan stok/konsentrasi 100%

Proses pembuatan larutan stok yaitu dengan menimbang 5 gram ekstrak etanol 96% daun sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) dan dilarutkan kedalam 5 mL DMSO 10%.

b. Pembuatan Konsentrasi 50%

Proses pembuatan konsentrasi 80% yaitu dengan mengambil 2,5 mL larutan konsentrasi 100% ekstrak etanol 96% daun sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) dan dilarutkan kedalam 2,5 mL DMSO 10%.

c. Pembuatan Konsentrasi 45%

Proses pembuatan konsentrasi 45% yaitu dengan mengambil 2,25 mL larutan konsentrasi 100% ekstrak etanol 96% daun sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) dan dilarutkan kedalam 2,75 mL DMSO 10%.

d. Pembuatan Konsentrasi 40%

Proses pembuatan konsentrasi 40% yaitu dengan mengambil 2 mL larutan konsentrasi 100% ekstrak etanol 96% daun sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) dan dilarutkan kedalam 3 mL DMSO 10%.

e. Pembuatan Konsentrasi 35%

Proses pembuatan konsentrasi 35% yaitu dengan mengambil 1,75 mL larutan konsentrasi 100% ekstrak etanol 96% daun sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) dan dilarutkan kedalam 3,25 mL DMSO 10%.

f. Pembuatan Konsentrasi 30%

Proses pembuatan konsentrasi 30% yaitu dengan mengambil 1,5 mL larutan konsentrasi 100% ekstrak etanol 96% daun sengkang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) dan dilarutkan kedalam 3,5 mL DMSO 10%.

g. Pembuatan Konsentrasi 25%

Proses pembuatan konsentrasi 25% yaitu dengan mengambil 1,25 mL larutan konsentrasi 100% ekstrak etanol 96% daun sengkang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) dan dilarutkan kedalam 3,75 mL DMSO 10%.

j. Pengujian Antibakteri Dengan Metode Sumuran

Pengujian antibakteri menggunakan sumuran yaitu dengan mengukur diameter zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Proses pengujian diawali dengan menginokulasi suspensi bakteri *Salmonella typhi* pada media MHA sebanyak 0,1 mL, kemudian diratakan dengan *cotton swab* dan didiamkan hingga kering. Cawan petri yang digunakan sebanyak 12, dengan masing-masing dibagi menjadi 4 bagian. 4 cawan petri pertama untuk konsentrasi 50%, 45%, dan 40%. Untuk 4 cawan petri kedua diisi konsentrasi 35%, 30%, dan 25%. Untuk 4 cawan petri berikutnya diisi dengan kontrol positif *Ciprofloxacin* 5 µg/disk dan kontrol negatif DMSO 10%. Setelah itu, buat lubang tegak lurus pada media MHA yang telah diinokulasi bakteri. Kemudian isi dengan larutan ekstrak etanol

96% daun sengkuang sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) sesuai dengan konsentrasi yang sudah ditentukan. Selanjutnya inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan amati zona bening sekitar sumuran, lalu ukur zona hambat dari masing-masing sampel menggunakan jangka sorong (Nurhayati *et al.*, 2020).

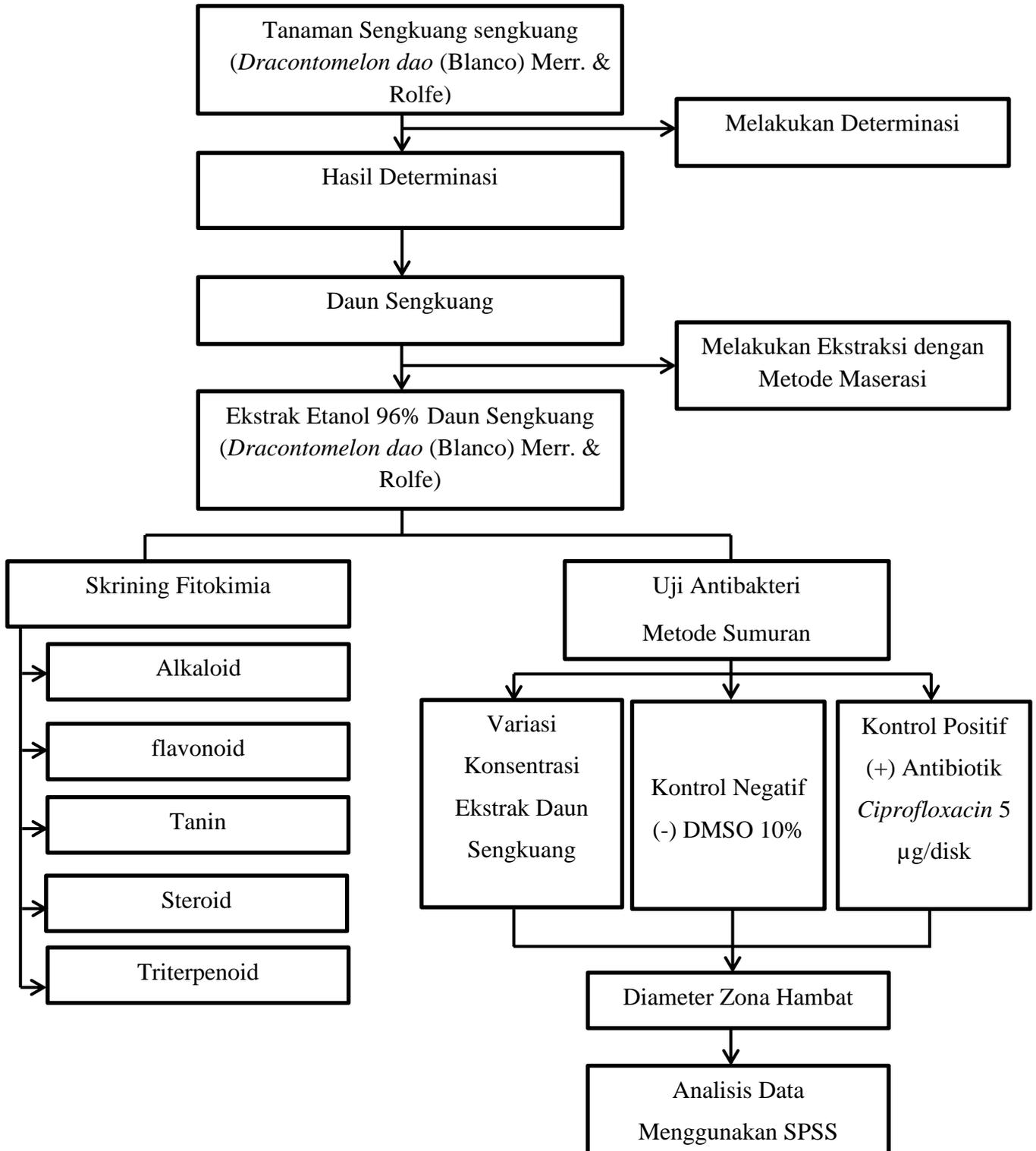
3.7. Analisis Data

Pada penelitian ini data yang diambil berupa data kuantitatif yaitu besarnya zona hambat ekstrak etanol 96% daun sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe). Kemudian data yang telah didapat akan dianalisis menggunakan SPSS versi 25. Pengujian dilakukan bertujuan untuk melihat perbedaan yang signifikan dari masing-masing kelompok uji yang mengandung modifikasi konsentrasi dari ekstrak etanol 96% daun sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr. & Rolfe) serta kontrol positif *Ciprofloxacin* 5 µg/disk dan kontrol negatif DMSO 10%.

Data hasil penelitian berupa hasil zona hambat dari variasi konsentrasi dianalisis menggunakan uji pendahuluan yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Jika data terdistribusi dengan normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji parametik. Sedangkan jika data terdistribusi tidak normal atau tidak homogen maka dilakukan dengan uji non parametik. (Pao *et al.*, 2022).

3.8. Kerangka Operasional

Kerangka konsep penelitian yaitu sebagai berikut:



Gambar 4. Kerangka Operasional