

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu jenis penelitian eksperimental dengan menggunakan 2 variabel, yaitu variable bebas dan variable terikat. Penelitian ini melakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* menggunakan metode difusi sumuran dengan variable konsentrasi ekstrak 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, kontrol positif menggunakan *azithromycin* 15µg, dan kontrol negatif menggunakan DMSO 10%

Rancangan perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Konsentrasi 1 (C1) = Konsentrasi 25%
- b. Konsentrasi 2 (C2) = Konsentrasi 30%
- c. Konsentrasi 3 (C3) = Konsentrasi 35%
- d. Konsentrasi 4 (C4) = Konsentrasi 40%
- e. Konsentrasi 5 (C5) = Konsentrasi 45%
- f. Konsentrasi 6 (C6) = Konsentrasi 50%
- g. Kontrol positif (K+) = Azitromycin 15µg/disk
- h. Kontrol negatif (K-) = DMSO 10%

Perhitungan untuk pengulangan, sesuai dengan ketentuan rumus Federer maka dilakukan empat kali pengulangan (Susiloningrum & Mawarni, 2022).

$$\text{Rumus: } (n-1)(t-1) \geq 15$$

n = jumlah minimal pengulangan

t = jumlah kelompok

perhitungan jumlah pengulangan:

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

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 15 + 7$$

$$7n \geq 22$$

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

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2024 sampai dengan bulan Juni 2024 di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Mikrobiologi-Parasitologi, dan Laboratorium Steril Universitas Borneo Lestari Banjarbaru.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi adalah semua tumbuhan Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)) yang diperoleh di Desa Sungai Rangas, Kabupaten Hulu Sungai Tengah, Kalimantan Selatan.

3.3.2. Sampel

Sampel tumbuhan Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)) yang digunakan dalam penelitian di peroleh dari Desa Sungai Rangas, Kabupaten Hulu Sungai Tengah, Kalimantan Selatan. Bagian Sengkuang yang digunakan dalam penelitian ini yaitu beberapa bagian daun yang bersih, tidak rusak atau sobek, tidak muda tidak terlalu tua, bertekstur keras, berwarna hijau tua.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% ekstrak etanol 96% daun Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)), kontrol positif berupa antibiotik *Azitromycin* 15µg/disk, dan kontrol negatif DMSO 10%.

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona hambat ekstrak etanol 96% daun Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* pada masing-masing perlakuan.

3.5. Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu autoklaf (All amerikan[®]), alumunium foil, batang pengaduk, batang L (Pyrex[®]), bejana Meserasi, blender (Cosmos[®]), busen, cawan petri (Thermo Scientific[®]), corong, erlemeyer (Pyrex[®]), gelas beker (Pyrex[®]), hotplate (Thermo Scientific[®]), incubator (Memmert), jangka sorong (Nankai[®]), jarum ose, labu ukur (Pyrex), kertas saring, Laminaf Air Flow (LAF), lemari pendingin, magnetic stirrer, mikropipet (Dragon lab[®]), oven (Thermo Scientific[®]), penjepit kayu, pengayakan mesh 40, pinset, pipet tetes, rak tabung reaksi, rotary evaporator (Shimano[®]), spatula, spuit (OneMed), stopwatch, tabung reaksi (iwaki[®]), timbangan analitik (Ohaus[®]), dan vial.

3.5.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu daun Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)), amil alcohol, antibiotik *Azitromycin* 15µg/disk sebagai kontrol positif, asam asetat anhidrat, asam klorida (HCl), asam sulfat (H₂SO₄), aquadest, bakteri *S. dysenteriae*, DMSO 10% sebagai kontrol negatif, etanol 96%, FeCl₃, kloroform, media *Mueller-Hinton Agar* (MHA), larutan Mc Farland 0,5, NaCl 0,9%, *Nutrien Agar*

(NA), pereaksi *Dragendorff*, reagen *Mayer*, reagen *Wagner*, serbuk Mg (Magnesium).

3.6. Prosedur Kerja

3.6.1. Pengambilan Sampel

Tumbuhan sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)) diperoleh dari tumbuhan dari Desa Sungai Rangas, kabupaten Hulu Sungai Tengah, Kalimantan Selatan. Sebanyak 3 kg Daun Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)) diambil pada bulan Desember 2023. Tumbuhan sengkuang yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri yaitu bagian daun segar yang berwarna hijau tua. Determinasi tumbuhan Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)) di lakukan di Laboratorium Dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

3.6.2. Pembuatan Simplisia Daun Sengkuang

Pembuatan simplisia daun Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)) dilakukan dengan pengumpulan sampel daun sengkuang, kemudian dilakukan sortasi basah dengan memisahkan daun dari batang dan akarnya serta dari kotoran-kotoran dan zat asing yang masih menempel. Setelah sortasi basah dilakukan, diperoleh 3 kg daun sengkuang. Kemudian dilakukan proses pencucian hingga bersih dengan air mengalir, selanjutnya daun di rajang menjadi

bagian yang lebih kecil untuk memudahkan proses pengeringan dan penyerbukan.

Daun dikeringkan dengan sinar matahari, yang ditutupi dengan menggunakan kain berwarna hitam. Selanjutnya setelah kering daun sengkung dilakukan sortasi kering untuk menghasilkan sisa-sisa pengotor dan bagian daun yang tidak ingin digunakan. Simplisia daun sengkung kemudian dihaluskan menggunakan ayakan no. 40 agar memudahkan pada saat digunakan untuk penelitian (Inderiyani & Sulastri 2021).

Selanjutnya penimbangan dan perhitungan rendemen simplisia daun Sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanco)). Menurut Safrina & Priyambodo (2018) rumus rendemen simplisia sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen Simplisia} = \frac{\text{Berat simplisia (g)}}{\text{Berat bahan segar (g)}} \times 100\%$$

3.6.3. Pembuatan Ekstrak Daun Sengkung

Serbuk daun Sengkung (*Dracontomelon dao* (Blanco)) ditimbang sebanyak yang di dapat kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:3 selama 1 x 24 jam. Penyarian dilakukan selama 3 hari sambil diaduk 1-2 kali setiap hari. Setelah 3 hari atau proses ekstraksi berakhir, maserat dipisahkan dengan cara disaring. Maserat yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C untuk memisahkan pelarut dan ekstrak.

dipekatkan di atas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Dwiyanti & Nurlailah 2022).

Selanjutnya penimbangan dan perhitungan rendemen ekstrak daun Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)). Menurut (Soemarie *et al.*, 2019)rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak (g)}}{\text{Berat serbuk (g)}} \times 100\%$$

3.6.4. Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Ekstrak etanol 96% daun sengkuang ditimbang 5 g, ditambahkan 5 mL HCl 2N, disaring, lalu dibagi ke 3 tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 mL. Kemudian masing-masing tabung ditambahkan dengan pereaksi. Positif alkaloid pada pereaksi Dragendorff, apabila terbentuk endapan jingga. Positif alkaloid pada pereaksi Mayer, apabila terbentuk endapan putih atau kuning. Positif alkaloid pada pereaksi Wagner, apabila terbentuk endapan coklat (Fadhly *et al.*, 2015).

b. Uji Flavanoid

Ekstrak etanol 96% daun sengkuang sebanyak 0,5 g dimasukkan tabung dan dilarutkan dalam 10 tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan serbuk Mg sebanyak 0,2 g, hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah,kuning atau jingga (Andasari *et al.*, 2020).

c. Uji Saponin

Ekstrak etanol 96% daun sengkuang sebanyak 2 g, lalu ditambahkan 10 mL aquadest hangat. Kemudian tunggu hingga dingin dan dilakukan pengocokan selama 10 detik. Ekstrak positif mengandung saponin jika terbentuk buih atau busa dan apabila dilakukan penambahan asam klorida 2N sebanyak 2 tetes maka buih atau busa tidak hilang (Monhestiswari *et al.*, 2021).

d. Uji Steroid/Triterpenoid

Ekstrak etanol 96% daun sengkuang 0,1 g dilarutkan dalam kloroform 0,5 mL, selanjutnya ditambahkan dengan asam asetat anhidrat sebanyak 10 tetes, lalu di tetesi dengan H₂SO₄ pekat 2-3 tetes melalui dinding tabung reaksi. Positif triterpenoid apabila terdapan cincin kecoklatan atau violet pada batas antara dua pelarut dan positif steroid apabila larutan berwarna hijau (Nugrahani *et al.*, 2016).

e. Uji Tanin

Ekstrak etanol 96% daun sengkuang 0,1 g ditambahkan 10 mL FeCl₃. ekstrak positif jika terbentuk larutan berwarna biru kehitaman (Putri *et al.*, 2022)

3.6.5. Pengujian Antibakteri *Shiglla Dysenteriae*

a. Sterilisasi Alat dan Media

Alat yang akan disterilkan dalam penelitian ini seperti erlemeyer, tabung reaksi, cawan petri, dan gelas ukur dengan menggunakan oven pada suhu 180°C Selama satu jam. Untuk sterilisasi media seperti *Nutrien Agar* (NA) dan *media Mueller-Hinton Agar* (MHA) menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan sterilisasi ose dilakukan dengan cara memanaskan di atas bunsen (Handayani & Rusmita 2017).

b. Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Media NA sebanyak 0,42 g dilarutkan dalam 15 mL aquadest menggunakan Erlenmeyer, dihomogenkan dengan hotplate dan diaduk menggunakan magnetic stirrer, lalu ditutup dengan aluminium foil. media disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit (Wahyuni *et al.*, 2018). Kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama kurang lebih 30 menit sampai media memadat. Media agar miring digunakan untuk inokulum bakteri (Rahayu *et al.*, 2021).

c. Peremajaan Bakteri Menggunakan Media Nutrient Agar (NA)

Bakteri uji di ambil dengan menggunakan ose steril sebanyak satu ose dari biakan murni bakteri. Kemudian di inokulasikan dalam media agar miring dengan cara digoreskan

secara zig-zag, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Yanti & Mitika 2017).

d. Pewarnaan Gram Bakteri *S.dysenteriae*

Pewarnaan gram bakteri *S.dysenteriae* dilakukan dengan cara diambil 1 ose lalu digoreskan pada kaca objek steril dan difiksasi. Tetesi dengan keistal violet sebanyak 1 tetes pada permukaan preparate, tunggu 1 menit lalu bilas dengan aquadest sampai luntur dan keringkan. kemudian, tetesi dengan lugol 1 tetes pada permukaan preparate, tunggu 1 menit lalu bilas dengan aquadest sampai luntur dan keringkan. Preparate dibilas dengan alcohol 96% hingga zat warna luntur lalu cuci dengan aquadest dan keringkan. Selanjutnya, ditetsi dengan safranin sebanyak 1 tetes di atas permukaan preparate, tunggu hingga 45 detik lalu bilas dengan aquadest dan keringkan. Kemudian preparate di tetesi minyak imersi lalu amati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10 x 100 (Mahmudah *et al.*, 2016).

e. Pembuatan Standar Mc Farland 0,5

Larutan standar Mc Farland 0,5 dibuat dengan cara melarutkan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 ml masukkan kedalam tabung reaksi tambahkan dengan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 ml. larutan standar Mc Farland 0,5 digunakan untuk pembanding

jumlah koloni bakteri pada medium cair yang digunakan untuk pengujian daya anti bakteri (Rosmania & Yanti 2020).

f. Pembuatan Suspensi Bakteri

Dimasukkan 10 mL larutan NaCl 0,9% ke dalam tabung reaksi. Kemudian ambil bakteri *S.dysenteriae* hasil peremajaan menggunakan jarum ose steril dan disuspensikan kedalam larutan NaCl 0,9% steril, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. selanjutnya dibuat suspense bakteri hingga diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5 yaitu ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Apabila suspensi bakteri lebih keruh dari pada larutan standar Mc Farland maka perlu ditambahkan NaCl 0,9% sedikit demi sedikit hingga tercapai kekeruhan sesuai dengan keinginan (Kherid *et al.*, 2020)

g. Pembuatan Larutan DMSO 10%

Larutkan DMSO 10% dibuat dengan cara melarutkan DMSO sebanyak 10 g lalu masukkan ke dalam gelas ukur, lalu tambahkan aquadest sampai volumenya 90ml (Sutrisno *et al.*, 2014)

h. Pembuatan Media Mueller-Hinton Agar (MHA)

Media MHA dibuat dengan cara menimbang sebanyak 11,4 g serbuk, kemudian dilarutkan dalam 300 mL aquadest, lalu dipanaskan hingga larut dalam enlemeyer dan disterilkan

dengan autoklaf pada suhu 121° selama 15 menit (Zahro & Agustini 2013).

i. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Etanol 96% Daun Sengkuang

Variasi konsentrasi ekstrak etanol daun Sengkuang yang digunakan adalah 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%.

1. Pembuatan larutan stok/ konsentrasi 100%

Pembuatan larutan stok dilakukan dengan cara menimbang 5g ekstrak etanol 96% daun sengkuang kemudian dilarutkan dalam 5 ml DMSO 10%.

2. Pembuatan konsentrasi 50%

Pembuatan konsentrasi 50% dilakukan dengan cara mengambil 1 ml larutan konsentrasi 100% kemudian dilarutkan dengan 1 ml larutan DMSO 10%.

3. Pembuatan Konsentrasi 45%

Pembuatan konsentrasi 45% dilakukan dengan cara mengambil 0,9 ml larutan konsentrasi 100% kemudian dilarutkan dengan 1,1 ml DMSO 10%.

4. Pembuatan Konsentrasi 40%

Pembuatan konsentrasi 40% dilakukan dengan cara mengambil 0,8 ml larutan konsentrasi 100% kemudian dilarutkan dengan 1,2 ml DMSO 10%.

5. Pembuatan Konsentrasi 35%

Pembuatan konsentrasi 35% dilakukan dengan cara mengambil 0,7 ml larutan konsentrasi 100% kemudian dilarutkan dengan 1,3 ml DMSO 10%.

6. Pembuatan Konsentrasi 30%

Pembuatan konsentrasi 30% dilakukan dengan cara mengambil 0,6 ml larutan konsentrasi 100% kemudian dilarutkan dengan 1,4 ml DMSO 10%.

7. Pembuatan Konsentrasi 25%

Pembuatan konsentrasi 25% dilakukan dengan cara mengambil 0,5 ml larutan konsentrasi 100% kemudian dilarutkan dengan 1,5 ml DMSO 10%.

j. Pengujian Antibakteri dengan Metode Sumuran

Pengujian antibakteri dilakukan dengan difusi agar dengan metode sumuran. Selanjutnya inokulasikan suspensi bakteri *S.dysenteriae* pada delapan cawan petri yang berisi media Mueller-Hinton Agar (MHA) menggunakan pipet yang sudah disterilkan dengan cara diambil bakteri *S.dysenteriae* sebanyak 100 μ L lalu diratakan pada media menggunakan batang L.

Delapan cawan petri yang berisi media MHA yang telah diinokulasi bakteri *S.dysenteriae* dibuat dengan tiga lubang dengan mikropipet untuk berbagai seri konsentrasi sebanyak 20 μ L, dan empat cawan petri lainnya dibuat dua lubang untuk kontrol positif diisi dengan antibiotik Azitromycin 15 μ g/disk

dan lubang untuk kontrol negatif diisi dengan DMSO 10%. Cawan petri dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C selama 24jam.

Selanjutnya didiamkan sampai meresap pada media, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dari masing-masing sampel (Nazarudin *et al.*, 2019).

3.7. Analisis Data

Data yang diambil berupa data kuantitatif yaitu besarnya zona hambat ekstrak daun Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)). Data yang didapat dianalisis menggunakan SPSS, tujuannya untuk melihat apakah ada perbedaan yang signifikan dari masing-masing kelompok uji yang mengandung konsentrasi dari ekstrak 96% daun sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)) serta kontrol positif antibiotik *Azitromycin* 15µg/disk dan kontrol negatif DMSO 10% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. dysenteriae*.

Data yang telah didapat kemudian di analisis menggunakan SPSS dengan uji pendahuluan yaitu uji homogenitas dan normalitas. Jika data yang didapat normal dan homogen kemudian dilanjutkan dengan uji parametrik yaitu uji One Way ANOVA. Jika data tidak dapat terdistribusi secara normal atau tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu uji Kruskal-Wallis untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas antibakteri. Sedangkan untuk menentukan apakah ada perbedaan

signifikan secara statistic antara dua atau lebih kelompok variable, maka analisis menggunakan uji Mann-Whitney.