

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental di laboratorium dengan desain yang hanya melibatkan pengujian setelah perlakuan pada kelompok kontrol. Tujuan penelitian adalah mengetahui aktivitas antibakteri *Staphylococcus epidermidis* dari daun Balik Angin yang diekstraksi dengan metode sokhlet dengan menggunakan etanol 70% sebagai pelarut. Pengujian sebanyak tiga kali pengulangan, berlandaskan rumus Federer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$ dimana (t) yaitu kelompok dan (n) ialah dengan jumlah minimum pengulang (Aryani, 2022 dalam Subareng 2023).

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

Penelitian ini berlangsung dari Januari 2024 hingga Juni 2024, dan penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Palangka Raya.

3.3. Variabel Penelitian

Variabel-variabel pada penelitian ini adalah :

- a. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar ekstrak etanol 70% yang diambil dari daun balik angin, dengan antibiotik klindamisin digunakan sebagai kontrol positif dan Na-CMC 0,5% sebagai kontrol negatif.
- b. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu nilai zona hambat ekstraksi etanol daun balik angin

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, foil, alat gelas, blender, inkubator, jarum ose bulat, jangka sorong, mikropipet, *yellow-tip oven*, pengayak mesh 40, timbangan digital, rotary evaporator, lemari pendingin, dan *water bath*, cawan petri, bunsen.

3.4.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari daun Balik Angin, etanol 70%, air distilasi, media Mueller Hinton Agar (MHA), media Nutrient Agar (NA), aluminium, serbuk Na-CMC 0,5%, NaCl 0,9%, biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan cakram uji antibiotik klindamisin.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengambilan Sampel

Tanaman Balik Angin didapatkan dari daerah Gunung Tahura yang terletak di Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Contoh diambil dari daun hijau segar yang masih menempel pada pohon.

3.5.2 Pembuatan Simplisia daun Balik Angin

Sampel tanaman yang diperoleh dengan cara disortasi basah, artinya daun Balik Angin dicuci dengan air bersih mengalir. Selanjutnya daun Balik Angin dipotong kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan. Daun dikeringkan dalam ruangan tanpa paparan sinar matahari langsung (Fuentes *et al.*, 2020). Simplicia yang telah dikeringkan diseleksi untuk menyingkirkan sisa-sisa kotoran atau bagian daun yang tidak diinginkan, lalu daun yang sudah disortasi kering dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk dan kemudian diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh hingga diperoleh bubuk simplisia (Subareng 2023).

$$\% \text{ Rendemen simplisia} = \frac{\text{Bobot Simplicia}}{\text{Bobot Daun Balik Angin}} \times 100\% \text{ (Aprillinia, 2022)}$$

3.5.3 Pembuatan Ekstrak daun Balik Angin

Timbang serbuk simplisia daun Balik Angin (*A. incana*) sebanyak 35 g kemudian bungkus menggunakan kertas saring dan kedua ujungnya diikat, lalu dimasukkan ke dalam bindal sokhlet dan diekstraksi menggunakan 250 mL pelarut etanol 70% dengan suhu 50°C (Rosyada, 2022 dalam Subareng 2023). Ekstrak cair selanjutnya, pelarut yang diperoleh dihilangkan dengan cara diuapkan menggunakan rotary evaporator serta waterbath pada temperatur 50°C hingga menghasilkan ekstrak yang kental. Simpan ekstrak

kental itu pada temperatur ruangan atau di dalam inkubator. (Ahmed *et al.*, 2019)

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

3.5.4 Uji Skrining

a. Uji Fenol

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

b. Uji Flavonoid

Sampel dilarutkan sebanyak 0,1 g pada pelarutnya 2 mL, dan ditambahkan 2 mg bubuk Mg dan 1 ml HCl konsentrat, lalu tambahkan amil alkohol. Apabila larutan menunjukkan warna merah, kuning, atau jingga, ini menandakan bahwa terdapat senyawa flavonoid di dalamnya (Ramadhan *et al.*, 2020).

c. Uji Alkaloid

Sebanyak 5 ml HCl, ditambahkan 0,1 g ditambahkan, dan dibagi dalam tiga tabung, pereaksi Mayer ditambahkan ke tabung 1, pada tabung 2 ditambah reagen Dragendroff, kemudian tabung 3 ditambahkan reagen Wagner. Hasil positif yang menunjukkan dengan terbentuknya endapan hasil reaksi pada tabung 1 menunjukkan adanya endapan berwarna kuning keemasan, sedangkan tabung 2 menghasilkan endapan berwarna putih, dan tabung 3 menunjukkan endapan berwarna merah kecoklatan. Pengendapan itu mengindikasikan adanya senyawa alkaloid. (Ramadhan *et al.*, 2020).

d. Uji Tanin

Sebanyak 0,1 gram sampel dilarutkan dalam 2 mL, lalu ditambahkan larutan gelatin 1% hingga terbentuk endapan berwarna putih. Ini mengindikasikan

bahwa larutan tersebut mengandung senyawa tanin (Ramadhan *et al.*, 2020).

e. Uji Saponin

Ambil sampel seberat 0,1 g, kemudian tambahkan 5 mL air panas dan kocok dengan kuat selama sekitar 10 detik. Jika busa yang stabil terbentuk selama sekitar 10 menit dan tetap ada meskipun ditambahkan satu tetes HCl 2N, maka busa tersebut dapat dianggap tidak menghilang (Ramadhan *et al.*, 2020).

f. Uji Steroid-Triterpenoid

Beratkan sampel seberat 0,1 g, kemudian masukkan 2-3 ml kloroform, 10 tetes asetat anhidrat, dan 2-3 tetes H₂SO₄ (Reagen Lieberman-Burchard) dengan cara menjatuhkannya melalui sisi tabung. Apabila larutan menunjukkan perubahan warna dari biru ke hijau, maka dapat dipastikan bahwa di dalamnya terdapat kandungan steroid. Sebaliknya, jika larutan berubah menjadi merah atau ungu, ini menandakan bahwa terdapat kandungan triterpenoid (Ramadhan *et al.*, 2020).

3.6 Pengujian Antibakteri *Staphylococcus epidermidis*

3.6.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian harus terlebih dahulu disterilkan sesuai dengan prosedur yang berlaku, yang berarti bahwa media perlu disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C yang dipertahankan selama waktu 10-15 menit. Kondisi ini sangat efektif untuk membunuh spora dan bakteri jamur. Selanjutnya disterilkan untuk tempatkan peralatan gelas di dalam oven pada suhu 170°C dan biarkan selama satu jam. Perlu diketahui bahwa instrumen yang akan disterilkan dibungkus dengan *aluminium foil* dan tidak disarankan menggunakan kertas. Selanjutnya,

jarum ose disterilkan menggunakan proses pemanasan dengan api Bunsen (Wulandari *et al.*, 2021).

3.6.2 Pembuatan Larutan Na-CMC 0,5%

Serbuk Na-CMC seberat 0,5 (nol koma lima) g ditimbang dan ditambahkan ke dalam 70 (tujuh puluh) mL Aquadest yang sedang dipanaskan. Selanjutnya, ditambahkan Aquadest dingin sampai mencapai volume total 100 (seratus) mL pada tanda batas. Laksanakan proses sterilisasi pada suhu 121°C (seratus dua puluh satu derajat Celsius) selama 15 (lima belas) menit (Arsyad, 2019 dalam Subareng 2023).

3.6.3 Pembuatan Larutan Standar 0,5% *Mc-Farland*

Mencampurkan sebanyak 9,95 (sembilan koma sembilan lima) ml H₂SO₄ 1% dan 0,05 (nol koma nol lima) ml larutan BaCl₂ lalu kocok hingga terbentuk larutan yang keruh (Sandra *et al.*, 2022 dalam Subareng 2023).

3.6.4 Pembuatan Variasi Kosentrasi Ekstrak Etanol 70% dari daun Balik Angin

Larutan uji yang digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri adalah *S. aureus* yang dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak etanol 70% daun Balik Angin (*A. incana*) dalam beberapa kelompok kosentrasi bertingkat. kosentrasi yang digunakan adalah 25,6% (dua puluh lima koma enam persen), 12,8% (dua belas koma delapan persen), 6,4% (enam koma empat persen), 3,2% (tiga koma dua persen), 1,6% (satu koma enam persen), 0,8% (nol koma delapan persen), 0,4% (nol koma empat persen)

dan 0,2% (nol koma dua persen). Pada pembuatan larutan dengan konsentrasi 25,6% (dua puluh lima koma enam persen) kemudian timbang 1,28 g ekstrak lalu tambahkan 5 mL larutan Na-CMC 0,5% (nol koma lima persen) dan haluskan menggunakan mortar. Dari konsentrasi 25,6% (dua puluh lima koma enam persen) diambil 2,5 mL ditambahkan larutan ke dalam vial yang berisi 2,5 mL larutan Na-CMC sehingga memperoleh konsentrasi 12,8% (dua belas koma delapan persen). Kemudian dari konsentrasi 12,8% (dua belas koma delapan persen) diambil sebanyak 2,5 mL larutan dimasukkan ke dalam vial yang berisi larutan Na-CMC 0,5% (nol koma lima persen) sebanyak 2,5 mL memperoleh konsentrasi 6,4% (enam koma empat persen). Lalu dari konsentrasi 6,4% (enam koma empat persen) diambil sebanyak 2,5 mL larutan dan dimasukkan ke dalam vial yang berisi larutan Na-CMC 0,5% (nol koma lima persen) sebanyak 2,5 mL ke dalam vial yang berisi larutan Na-CMC 0,5% (nol koma lima persen) sebanyak 2,5 mL untuk memperoleh konsentrasi 1,6% (satu koma enam persen). Dari konsentrasi 1,6% (satu koma enam persen) diambil sebanyak 2,5 mL larutan dan dimasukkan ke vial yang berisi larutan Na-CMC 0,5% (nol koma lima persen) sebanyak 2,5 mL untuk memperoleh konsentrasi 0,8% (nol koma delapan persen). Dari konsentrasi 0,8% (nol koma delapan persen) diambil sebanyak 2,5 mL larutan dimasukkan ke dalam vial yang berisi larutan Na-CMC 0,5% (nol koma lima persen) sebanyak 2,5 mL untuk mendapatkan konsentrasi 0,4% (nol koma empat persen). Diambil sebanyak 2,5 mL dari konsentrasi 0,4% (nol koma empat persen) dimasukkan ke dalam vial yang berisi larutan Na-CMC sebanyak 2,5 mL sehingga diperoleh konsentrasi paling kecil yaitu

0,2% (nol koma dua persen) (Lihimi, 2022; Soleha, 2022 dalam Subareng, 2023).

3.6.5 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Media *Nutrient Agar* (NA) dibuat dengan dengan cara menimbang media sebanyak 0,46 g dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer, melarutkan 20 mL dengan *aquadest* steril dan dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga mendidih. Masukkan 5 ml media kedalam tiga tabung reaksi berbeda, tutup menggunakan kapas yang dilapisi lembaran perkamen selanjutnya disusun menjadi jalinan. Tempatkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu biarkan pada suhu ruangan selama kurang lebih 30 menit agar media mengeras dengan kemiringan 30° dan dapat untuk peremajaan bakteri (Fitriyanti *et al.*, 2019 dalam Subareng 2023).

3.6.6 Peremajaan *Staphylococcus epidermidis*

Proses peremajaan bakteri dilakukan dengan menggunakan media agar NA yang dimiringkan, di mana satu ose bakteri S diambil untuk keperluan tersebut. Epidermidis diperoleh dengan menggunakan jarum ose yang steril dan telah dipanaskan dengan cara dibakar, kemudian jarum tersebut ditusukkan dan digoreskan ke permukaan media. Proses ini dilakukan dalam kondisi inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Fitriyanti *et al.*, 2019).

3.6.7 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Pembiakan pada bakteri *S. epidermidis* yang telah diinkubasi kemudian diambil dengan menggunakan jarum ose dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah berisi 1 ml larutan (NaCl) fisiologis 0,9% yang steril

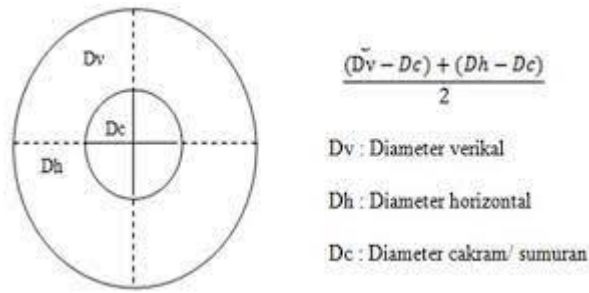
lalu membandingkan kekeruhan dengan larutan standart Mc Farland 0,5 (Fitriyanti *et al.*, 2019 dalam Subareng 2023).

3.6.8 Pembuatan Media Muller Hinton Agar (MHA)

Sebanyak 11,4 gram Media Muller Hinton Agar (MHA) ditimbang lalu dilarutkan ke dalam 300 ml air suling dan dipanaskan menggunakan hotplate. Lalu media diautoklaf dan dipertahankan pada suhu 121 °C selama 15 menit. Kemudian dinginkan media pada suhu ± 50 °C, dan dibagi media kedalam 15 cawan petri steril untuk diuji aktivitas antibakterinya. Setelah dingin, media padat disimpan kedalam lemari es (Fitriyanti *et al.*, 2019 dalam Subareng, 2023).

3.6.9 Uji Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Sumuran

Aktivitas ekstrak daun Balik Angin yang memiliki sifat antibakteri telah diuji dengan menggunakan media MHA yang telah disterilkan, dan diinokulasi bakteri *S. epidermidis* dengan *cotton swab steril*. Lalu dimasukan sebanyak 20 μ L ekstrak etanol 70% daun Balik Angin dengan berbagai macam variasi kosentrasi pada setiap lubang sumuran media MHA. Dalam pengujian ini, klindamisin digunakan sebagai kontrol positif, sementara Na-CMC 0,5% berfungsi sebagai kontrol negatif. Dilanjutkan dengan menginkubasi kultur selama 24 jam pada suhu 37° C. Lalu diukur diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dan klasifikasi berdasarkan kategorinya (Fitriyanti *et al.*, 2019; Ramadhan *et al.*, 2020).



Gambar 3. Rumus Perhitungan Daya Zona Hambat

Tabel 1. Katagori Daya Hambat Bakteri

Diamater Zona Hambat	Kategori
≥ 20 (dua puluh) mm	Sangat Kuat
10 (sepuluh) - 20 (dua puluh) mm	Kuat
5 (lima) - 10 (sepuluh) mm	Sedang
≤ 5 (lima) mm	Lemah

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

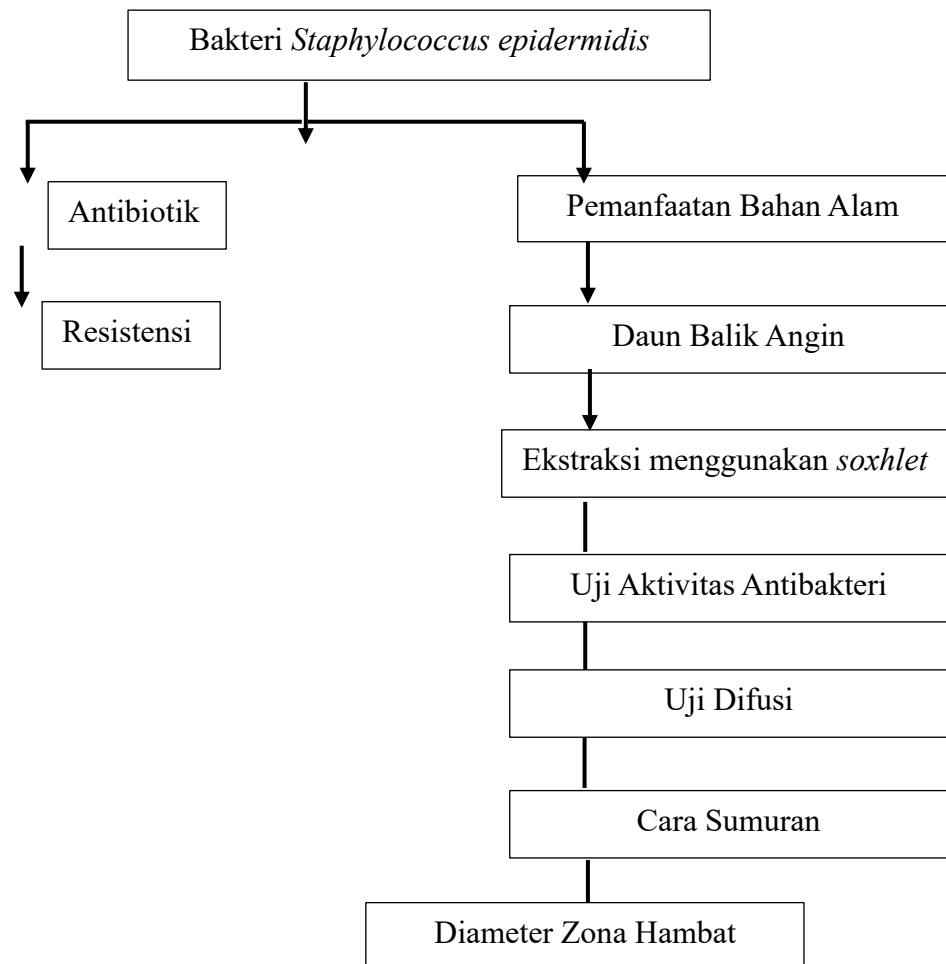
3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh mencakup diameter zona inhibisi, yang kemudian dianalisis menggunakan SPSS. Kontrol antibakterinya meliputi klindamisin sebagai kontrol positif dan Na-CMC 0,5% sebagai kontrol negatif, dengan menggunakan konsentrasi ekstrak etanol 70% dari daun Balik Angin untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Uji analisis menggunakan uji normalitas serta penerapan uji Shapiro-Wilk dalam analisis homogenitas dengan menggunakan uji Levene. Jika data yang diperoleh

memiliki distribusi normal dan bersifat homogen, langkah selanjutnya adalah melakukan uji One Way Anova dengan tingkat kepercayaan 95%. Setelah itu, akan dilakukan uji Post hoc Tukey HSD untuk mengetahui keefektivitasan antibakteri daun Balik Angin dengan taraf kepercayaan 95%. Jika data tidak terdistribusi normal dan tidak memenuhi kriteria homogenitas, maka uji nonparametrik, yaitu uji Kruskal-Wallis, digunakan untuk mengevaluasi apakah terdapat perbedaan signifikan secara statistik dalam efektivitas antibakteri antara dua atau lebih kelompok variabel, maka analisis menggunakan uji *Mann-Whitney test* dengan tingkat kepercayaan 95%.

3.8 Kerangka Konsep



Gambar 4. Skema kerangka konsep