

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian yaitu *post test only control group design* dan melakukan Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol 96% Daun Sengkuang (*Dracontomelon dao*) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* dengan 6 variasi perlakuan yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, kontrol positif (+) menggunakan Azithromycin dan kontrol negatif (-) menggunakan DMSO 10% :

- a. Konsentrasi 1 (C1) = 5%
- b. Konsentrasi 2 (C2) = 10%
- c. Konsentrasi 3 (C3) = 15%
- d. Konsentrasi 4 (C4) = 20%
- e. Kontrol positif (+) = Azithromycin 15 μ g/disk
- f. Kontrol negatif (-) = DMSO 10%
- g. Perhitungan pengulangan menggunakan rumus berikut (Nabila *et al.* 2021)

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

n = jumlah minimal pengulangan

t = jumlah kelompok

perhitungan jumlah minimal pengulangan $:(n-1) (t-) \geq 15$

$$(n-1) (6-1) \geq 15$$

$$(n - 1) (5) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$n \geq 4 \text{ Replikasi}$$

3.2. Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini terdiri dari 2 macam, yaitu variabel bebas (*independent variable*) dan variabel terikat (*dependent variable*):

3.2.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah seperti variasi konsentrasi Ekstrak Etanol 96% Daun Sengkuang (*Dracontomelon dao*), Azithromycin sebagai kontrol positif (+) dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif.

3.2.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter hambat minimum pada bakteri *Shigella dysenteriae*.

3.3. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam. Laboratorium Mikrobiologi Universitas Borneo Lestari Banjarbaru, Kalimantan Selatan pada bulan Januari – Juni 2024.

3.4. Populasi dan sampel

3.4.1. Populasi

Semua tanaman Sengkuang (*Dracontomelon dao*) yang diperoleh dari daerah Desa Sungai Rangas, Kabupaten Hulu Sungai Tengah, Kalimantan Selatan.

3.4.2. Sampel

Sampel tanaman Sengkuang (*Dracontomelon dao*) yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari daerah Desa Sungai Rangas, Kabupaten Hulu Sungai Tengah, Kalimantan Selatan. Bagian tanaman sengkuang yang digunakan adalah daun segar yang berwarna hijau.

3.5. Alat dan Bahan

3.5.1. Alat

Alat alat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah : gunting, pisau, blender, Erlenmeyer, gelas beker, aluminium foil, gelas ukur, corong kaca, cawan petri, cawan porselin, inkubator, ayakan mesh40, jangka sorong, pelubang sumur, thermometer, ose bunsen, autoklaf, batang pengaduk, neraca analitik, tabung reaksi, pipet tetes, kapas, mikropipet, *water bath*, *magnetic stirrer*, *vortex*, penggaris, spatula, jarum ose, *cotton swab* steril, *hotplate* dan penjepit tabung.

3.5.2. Bahan

Bahan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah : Daun Sengkuang (*Dracontomelon dao*) yang telah diproses menjadi

ekstrak, etanol 96%, biakan *Shigella dysenteriae*, Azithromycin 15µg/disk, DMSO 10%, media MHA (*Mueller hinton* Agar), media NA (*nutrient* Agar), NaCl, aquades, HCL 2N, HCL, amyl alcohol, asam klorida, Mg (magnesium), kloroform, H₂SO₄ (asam sulfat), FeCl₃10%, MC Farland, 0,5, pereaksi *mayer*, pereaksi *wagner*, pereaksi Dragendorff dan pereaksi asam asetat anhidrida.

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pengambilan Sampel

Tumbuhan Sengkuang (*Dracontomelon dao*) diperoleh dari daerah desa sungai rangas, kabupaten Hulu Sungai Tengah, Kalimantan Selatan. Bagian yang akan digunakan adalah daun Sengkuang (*Dracontomelon dao*) sebanyak 2 kg yang diambil pada bulan Desember 2023.

3.6.2. Determinasi Tanaman Sengkuang (*Dracontomelon dao*)

Tanaman Sengkuang (*Dracontomelon dao*) yang sudah diperoleh yang terdiri dari akar, batang, daun, dan buah kemudian dilakukan determinasi di Laboratorium FMIPA Universitas Lambung Mangkurat untuk memastikan bahwa tanaman yang akan digunakan telah sesuai sehingga tidak terjadi kesalahan saat pengambilan sampel.

3.6.3. Pembuatan Simplisia Daun Sengkuang (*Dracontomelon dao*)

Pembuatan sampel daun Sengkuang (*Dracontomelon dao*) dilakukan dengan pemisahan antara daun dari bahan pengotor

sepertibatang, tangkai, dan akar. Kemudian dibersihkan dari sisa tanah atau kotoran lain yang mungkin menempel menggunakan air mengalir dan bersih. Daun Sengkuang (*Dracontomelon dao*) yang sudah di cuci bersih kemudian dipotong-potong dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C. Daun Sengkuang (*Dracontomelon dao*) yang sudah kering kemudian di blender hingga menjadi serbuk halus lalu diayak menggunakan mesh 40.

Perhitungan rendemen simplisia :

$$\% \text{ Rendemen Simplisia} = \frac{\text{Bobot Simplisia}}{\text{Bobot Bahan Awal}} \times 100\%$$

3.6.4. Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun Sengkuang (*Dracontomelon dao*)

Simplisia yang telah dihaluskan lalu dimaserasi, rendam serbuk menggunakan etanol 96% dan dimaserasi selama 3x24 jam sambil diaduk sesekali dan lakukan remaserasi. Pisahkan maserat dengan corong yang telah dilapisi kertas saring. Filtrat dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu maksimal 50°C dan dipekatkan menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Dwiyanti dan Nurlailah, 2022).

Perhitungan % rendemen simplisia (Pradana, 2023)

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental (g)}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstrak (g)}} \times 100\%$$

3.6.5. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Etanol 96% Daun Sengkuang (*Dracontomelon dao*)

Variasi konsentrasi ekstrak etanol 96% daun Sengkuang

(*Dracontomelon dao*) menggunakan variasi bertingkat yaitu 4 tingkatan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dibuat dengan cara menimbang ekstrak, masing masing konsentrasi dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dengan DMSO 10% hingga volumenya 10 ml (Dwiyanti dan Nurlailah, 2022).

a. Pembuatan variasi konsentrasi 20%

Pembuatan variasi konsentrasi 20% dilakukan dengan cara mengambil 2 gram ekstrak kental kemudian dilarutkan dengan DMSO 10% ad 10 ml.

b. Pembuatan variasi konsentrasi 15%

Pembuatan variasi konsentrasi 15% dilakukan dengan cara ambil 3,75 ml dari konsentrasi 20% menggunakan mikropipet kemudian dilarutkan dengan DMSO 10% ad 5 ml.

c. Pembuatan variasi konsentrasi 10%

Pembuatan variasi konsentrasi 10% dilakukan dengan cara mengambil 3,333 ml dari konsentrasi 15% menggunakan mikropipet kemudian dilarutkan dengan DMSO 10% ad 5 ml.

d. Pembuatan variasi konsentrasi 5%

Pembuatan variasi konsentrasi 5% dilakukan dengan cara mengambil 2,5 ml dari konsentrasi 10% menggunakan mikropipet kemudian dilarutkan dengan DMSO 10% ad 5 ml.

3.6.6. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat untuk alat yang berbahan dasar kaca seperti

cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, gelas beker, dan gelas ukur dilakukan menggunakan alat autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 1 atm. Untuk alat lainnya seperti jarum ose dan pinset dilakukan dengan menggunakan alkohol 70% dan dilakukan pemijaran dengan api Bunsen (Armaleni et al., 2019).

3.6.7. Persiapan Uji Aktivitas Antibakteri

a. Pembuatan *Nutrient Agar* (NA)

Larutkan *Nutrient Agar* 0,46 gr dalam 5 ml aquades menggunakan Erlenmeyer lalu tutup dengan aluminium foil dan aduk dengan *magnetic stirrer* lalu hingga homogen di atas penangas air. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, tuang media yang sudah steril masing-masing sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil diamkan pada suhu ruang selama 30 menit hingga media padat (Hairunnisa, 2022).

b. Pembuatan MHA

Timbang *Mueller Hinton Agar* sebanyak 7,60 gr dalam 200 ml aquades, kemudian dipanaskan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Kemudian larutan disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Indriani et al., 2019).

c. Pembuatan Larutan *Mc. Farland* 0,5

Penggunaan Larutan *Mc. Farland* adalah sebagai standar

kekeruhan suspensi bakteri yang akan diuji. Larutan *Mc. Farland* 0,5 dibuat dengan melarutkan larutan BaCl_2 1% sebanyak 0,05 ml dan larutan H_2SO_4 1% sebanyak 9,95 ml. kemudian larutan di vortex hingga tercampur sempurna (Rizki *et al.*, 2021).

d. Suspensi bakteri

Ambil 1 ose bakteri, masukkan dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl fisiologi 0,9% kocok hingga homogen, lalu samakan dengan standar *Mc. Farland* 0,5(Rizki *et al.*, 2021).

e. Peremajaan Bakteri Menggunakan *Nutrient Agar* (NA)

Peremajaan bakteri *Shigella dysenteriae* dilakukan di atas media miring *Nutrient Agar* (NA) dengan cara mengambil satu ose bakteri kemudian digoreskan di permukaan media, dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator (Lestari *et al.*, 2020).

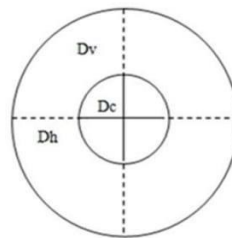
f. Penanaman dan pengujian antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)) dengan menggunakan metode sebar. Metode sebar adalah suatu metode dimana kultur bakteri dituangkan pada media agar padat, atau metode dimana kultur bakteri disebarkan dengan menggunakan *cotton swab*.

Pindahkan 0,1 ml suspensi bakteri ke permukaan media

MHA yang telah memadat menggunakan pipet, kemudian sebarkan bakteri secara merata dengan menggunakan *cotton swab*, membuat sumur pada media tersebut dengan melubangi media padat dengan diameter 6 mm yang dibuat dengan alat *cork borer*, sumur-sumur tersebut diisi dengan masing-masing larutan yang akan diuji sebanyak 20µg/L, kontrol positif Azithromycin dan kontrol negatif DMSO 10%.

3.6.8. Perhitungan Zona Hambat



$$\frac{(Dv - Dc) + (Dh - Dc)}{2}$$

Dv : Diameter vertikal zona bening

Dh : Diameter horizontal zona bening

Dc : Diameter sumuran

3.7. Analisis Data

Data yang digunakan adalah data kuantitatif yakni kecilnya zona hambat ekstrak etanol 96% daun Sengkuang (*Dracontomelon dao* (Blanco)) Analisis data yang pertama kali dilakukan adalah uji Normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dimana data akan dikatakan berdistribusi normal jika $\alpha > 0,05$ kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc LSD untuk mengetahui apakah suatu kelompok ada perbedaan yang signifikan dengan

kelompok lain.

Selanjutnya dilakukan uji Homogenitas menggunakan uji *Levene* dimana data akan dikatakan homogen apabila nilai $\alpha > 0,05$. jika didapatkan data berdistribusi normal dan homogen akan dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* dan jika yang didapatkan data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen akan dilanjutkan dengan uji statistika non parametric *Kruskal Wallis* digunakan untuk melihat apakah ada perbedaan yang signifikan antara kelompok variabel independen dan variabel dependen (Juan & Abdul. 2022). Selanjutnya dilakukan dengan uji *Mann-Whitney* yang digunakan untuk melihat apakah ada perbedaan median antara kelompok yang berbeda tetapi tidak berdistribusi normal