

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimen laboratorium yang mana rancangan penelitian ini berusaha meneliti aktivitas dari ekstrak etanol 96% daun langsung (*Lansium domesticum*) terhadap diameter zona hambat *Escherichia coli* secara in vitro. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode difusi sumuran, yaitu dengan cara membuat lubang pada media agar. Setelah itu lubang sumuran di isi dengan variasi konsentrasi ekstrak etanol 96% daun langsung.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini akan dilakukan pada bulan Februari – Mei 2024.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi – Parasitologi dan Laboratorium Bahan Alam Universitas Borneo Lestari.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi adalah wilayah yang terdiri atas berbagai objek atau subjek yang memiliki jumlah dan juga karakter tertentu yang sudah ditentukan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik

kesimpulanya (R. A. E. Agustin, 2023). Populasi dalam penelitian menggunakan daun langsung yang diperoleh dari desa Surian, Kecamatan Mataraman.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daun langsung (*L.domesticum*) dan bakteri uji *Escherichia coli*. Jumlah replikasi masing-masing perlakuan dihitung menggunakan rumus *Federrer* sebagai berikut:

Rumus *Federrer*

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

Keterangan:

t = banyak perlakuan yang dilakukan

n = banyak pengulangan

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

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq \frac{20}{5}$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan rumus *Federrer* tersebut, maka diketahui jumlah perlakuan adalah minimal 4 kali pengulangan.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang memberikan pengaruh atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen (terikat) (Ridha, 2020). Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu variasi konsentrasi ekstrak etanol 96% daun langsung (konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%).

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang mendapat pengaruh atau yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas (Ridha, 2020). Variabel terikat yang digunakan adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Benang Kasur, Blender, Gunting, Heating Mantle, Kertas Saring, Kondensor, Klem, Labu Alas Bulat, Neraca Analitik, Tabung Soklet, Waterbath, Autoclaf, Batang Pengaduk (*Pyrex*), Cawan Petri, Erlenmeyer (*Pyrex*), Gelas Beaker (*Approx*), Gelas Ukur (*Pyrex*), Inkubator, Kawat Ose, Lampu Bunsen, Labu Ukur (*Pyrex*), Mikro Pipet (*Pyrex*),

Oven, Pipet Ukur (*Pyrex*), Pipet Tetes (*Pyrex*), Rotary Evaporator, Tabung Reaksi (*Pyrex*).

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Daun Langsat (*L.domesticum*), Etanol 96 %, Bakteri *E.coli*, aquadest, DMSO, *Ampicillin*, Media MHA (*Mueller Hinton Agar*), Media NA (*Nutrient Agar*), $FeCl_3$ (Merck), Kloroform (Merck), Amoniak (Merck), Asetat anhidrat (Merck), Asam sulfat (Merck), Asam klorida (Merck), Serbuk Magnesium (Merck), Pereaksi Mayer (Merck), Pereaksi Dragendorff (Merck), dan Pereaksi Wagner (Merck).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman Langsat

Determinasi tanaman langsat (*L.domesticum*) dilakukan di Laboratorium Dasar Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

3.6.2 Pengambilan dan Pengolahan Sampel

Daun langsat segar diperoleh dari desa Surian, kecamatan Mataraman, Kalimantan Selatan. Setelah daun langsat dikumpulkan, maka dilakukan sortasi basah yang bertujuan untuk memisahkan daun dengan kotoran atau bagian tumbuhan yang tidak digunakan. Setelah sortasi basah, maka dilanjutkan dengan pencucian yang bertujuan untuk membersihkan daun dari kotoran yang menempel dengan air yang mengalir sampai benar-benar bersih. Kemudian dilakukan

perajangan lalu daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terpapar langsung oleh sinar matahari. Setelah daun langsung kering dilakukan sortasi kering. Selanjutnya daun langsung dihaluskan menjadi serbuk dengan menggunakan blender, kemudian di ayak menggunakan mesh 40 agar sampel dapat dipastikan sudah benar-benar halus. Setelah itu serbuk disimpan dalam bejana dengan silika gel untuk mencegah tumbuhnya jamur atau kerusakan bahan (Putri, 2021).

3.6.3 Ekstraksi Daun Langsung

Ditimbang serbuk daun langsung sebanyak 50 gram, kemudian dibungkus dengan kertas saring dan diikat dengan benang katun lalu dimasukkan kedalam timbal yang memiliki fungsi sebagai wadah untuk sampel yang akan diambil zatnya. Pelarut dimasukkan kedalam labu alas bulat sebanyak 500 ml, kemudian alat soklet dipasang. Sokletasi dilakukan pada suhu 70°C hingga tetesan dari cairan penyari memiliki warna bening. Ekstrak cair yang telah didapatkan lalu diuapkan diatas waterbath sampai pelarut menguap sempurna, selanjutnya ditimbang ekstrak kentalnya hingga diperoleh bobot ekstrak yang tetap (Nahor *et al.*, 2020). Bobot ekstrak kental yang telah didapat kemudian dihitung rendemen ekstraknya dengan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\%$$

3.6.4 Uji Skrining Fitokimia

1. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak etanol daun Langsung dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan kloroform sebanyak 2 mL dan amoniak sebanyak 10 mL dan ditambahkan 10 tetes H₂SO₄. Campuran dikocok dan dibiarkan hingga terbentuknya 2 lapisan (Yunus *et al.*, 2018). Lapisan H₂SO₄ dibagi kedalam 3 tabung reaksi dengan volume masing-masing 2,5 mL. Larutan untuk pengujian alkaloid dibagi menjadi 3 reagen yaitu tabung 1 dengan penambahan 2-3 tetes larutan pereaksi *Mayer* akan terbentuknya endapan warna putih bila terdapat alkaloid. Tabung 2 dengan penambahan 2-3 tetes larutan pereaksi *dragendroff* akan terbentuknya endapan merah jingga bila terdapat alkaloid. Tabung 3 dengan penambahan 2-3 tetes pereaksi *wagner* akan terbentuknya endapan coklat bila terdapat alkaloid (Ainia, 2017).

2. Uji Flavonoid

Pengujian flavonoid dengan cara dimasukkan ekstrak etanol 96% daun langsung sebanyak 0,5 gram dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 5 tetes HCl pekat dan 0,1 gram serbuk Magnesium. Apabila terjadi perubahan warna menjadi kuning maka ekstrak positif mengandung flavonoid (Supriyanto *et al.*, 2021).

3. Uji Fenol

Sampel sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan 20 ml etanol 96%. Larutan yang dihasilkan diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 1%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau atau hijau biru (Yunus *et al.*, 2018).

4. Uji Saponin

Sampel sebanyak 0,5 gram dicampurkan dengan 10 ml air panas kemudian didinginkan serta dikocok kuat selama 10 detik hingga munculnya buih. Setelah itu ditambahkan 1 tetes HCl 2 N, untuk pengamatan ketahanan buih. Buih yang diamati tetap ada dengan mantap menunjukkan saponin (Sulistyarini *et al.*, 2019).

5. Uji Steroid/Triterpenoid

Timbang 0,5 gram ekstrak ditambahkan 1 ml kloroform kemudian dicampurkan keduanya. Selanjutnya ditambahkan masing-masing asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (H_2SO_4 pekat) sebanyak 2 tetes. Steroid memberikan warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu (Yunus *et al.*, 2018).

6. Uji Tanin

Sampel sebanyak 0,5 gram ditimbang kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl_3 1%. Jika terbentuk warna biru tua atau

hijau kehitaman maka positif mengandung tanin (Riris *et al.*, 2020).

3.6.5 Pengenceran Ekstrak Etanol 96% Daun Langsung

Larutan stok dengan konsentrasi ekstrak 100% b/v dibuat dengan cara ditimbangnya 1 g ekstrak etanol 96% daun langsung lalu dilarutkan dalam larutan DMSO 10% sebanyak 1 mL. Kemudian dibuat variasi larutan uji dengan cara sebagai berikut:

- 1) Konsentrasi 25% v/v dibuat dengan cara diambil sebanyak 0,125 mL larutan stok kemudian ditambahkan larutan DMSO hingga volume 0,5 mL.
- 2) Konsentrasi 50% v/v dibuat dengan cara diambil 0,25 mL larutan stok kemudian ditambahkan larutan DMSO hingga volume 0,5 ml.
- 3) Konsentrasi 75% v/v dibuat dengan cara diambil 0,375 mL larutan stok kemudian ditambahkan larutan DMSO hingga volume 0,5 ml.

3.6.6 Pembuatan Media Untuk Pertumbuhan Bakteri

1) Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum melakukan pembuatan media dan pengujian antibakteri, diperlukannya sterilisasi alat-alat yang akan digunakan terlebih dahulu. Media disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dalam temperatur 121°C. Sedangkan peralatan gelas disterilisasi dalam oven dengan temperatur 160-170°C selama 1 jam. Lalu untuk kawat ose dan pinset disterilisasi menggunakan api Bunsen (Nurhamidin *et al.*, 2021).

2) Pembuatan Media

a. Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Pembuatan medium agar Mueller Hinton dilakukan dengan dimasukkannya 6,08 gram serbuk MHA kedalam Erlenmeyer dan diisi dengan 160 ml aquadest serta diaduk sampai terlarut campurannya. Pembuatan lalu dilanjut dengan memanaskan media diatas hotplate agar larutan homogen, lalu disterilisasi dalam autoklaf dalam waktu 15 menit dengan tekanan udara 1 atm suhu 121°C.

b. Media Agar Miring

Sebanyak 0,42 gram Nutrisi Agar (NA) dilarutkan dalam 15 mL aquadest dalam labu erlenmeyer. Kemudian homogenkan diatas hotplat hingga mendidih dengan pengaduk. Selanjutnya tuang kedalam tabung reaksi yang sudah disterilkan dan ditutup dengan alumunium foil. Setelah itu disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dalam waktu 15 menit dan dibiarkan pada suhu ruang dengan waktu sekitar 30 menit hingga media mengeras pada kemiringan 30°. Media ini digunakan untuk membiakkan bakteri.

3) Pemiakan Bakteri *Escherichia coli*

Diambil bakteri menggunakan kawat ose yang sudah disterilkan, lalu ditanamkan pada media agar miring dengan cara menggoresnya secara perlahan. Selanjutnya diinkubasi dalam

inkubator dalam suhu 37 °C dengan waktu 24 jam (Nurhamidin *et al.*, 2021).

4) Pembuatan Larutan Standar *Mc. Farland*

Standar kekeruhan *Mc. Farland* dibuat dari campuran H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 mL dan larutan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL. Kemudian dicampurkan keduanya sampai terbentuknya larutan yang keruh (Nurhamidin *et al.*, 2021).

5) Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Mengambil Bakteri uji yang telah diinokulasi dengan kawat steril lalu dimasukkan kedalam tabung yang berisi 2 mL larutan NaCl 0,9% sampai diperolehnya kekeruhan suspensi yang memiliki kesamaan dengan standar kekeruhan larutan *Mc. Farland* (Nurhamidin *et al.*, 2021).

6) Pembuatan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Kontrol positif yang digunakan yaitu Ampicillin. Untuk pembuatannya yaitu dengan menimbang ampicillin sebanyak 0,15 gram, kemudian dilarutkan ampicillin dengan aquadest sedikit demi sedikit lalu dimasukkan ke dalam labu ukur dan dicukupkan volumenya hingga 10 mL kocok sampai homogen (Sernita, 2022).

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah DMSO 10%, dipilihnya pelarut tersebut karena tidak mempunyai aktivitas antibakteri agar fungsi itu hanya dimiliki oleh larutan

pengujian dan bukan dari pelarut yang digunakan. Untuk membuat DMSO, larutkan dalam aquadest dengan cara memasukkan 10 ml DMSO kedalam gelas ukur dan menambahkan aquadest hingga volumenya mencapai 100 ml. Kocok hingga larutan menjadi homogen (Permatasari, 2022).

7) Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Sumuran

- a. Media MHA dituangkan kedalam masing-masing cawan sebanyak 20 mL, kemudian dibiarkan memadat.
- b. Setelah media memadat, kemudian diberikan suspensi bakteri dengan cara menginokulasikannya kemedial menggunakan cotton swab.
- c. Setelah media didiamkan selama kurang lebih 5–10 menit, dibuat lubang sumuran menggunakan cork borer pada masing – masing cawan petri.
- d. Lubang sumuran yang terbentuk diisi dengan larutan kontrol positif *ampicillin*, kontrol negatif larutan DMSO serta larutan uji masing-masing sebanyak 20 µl.
- e. Seluruh media kemudian diinkubasi dalam inkubator bersuhu 37 °C dengan menggunakan suhu optimal karena organisme sel bakteri mampu tumbuh secara baik dalam suhu tersebut dengan waktu selama 24 jam (Nurhamidin *et al.*, 2021).
- f. Setelah semua media di inkubasi, maka terbentuklah zona bening di sekitaran sumuran dan akan dihitung menggunakan

jangka sorong dengan rumus sebagai berikut (Toy *et al.*, 2015).

$$\text{Zona hambat} = \frac{(D1 - D3) + (D2 - D3)}{2}$$

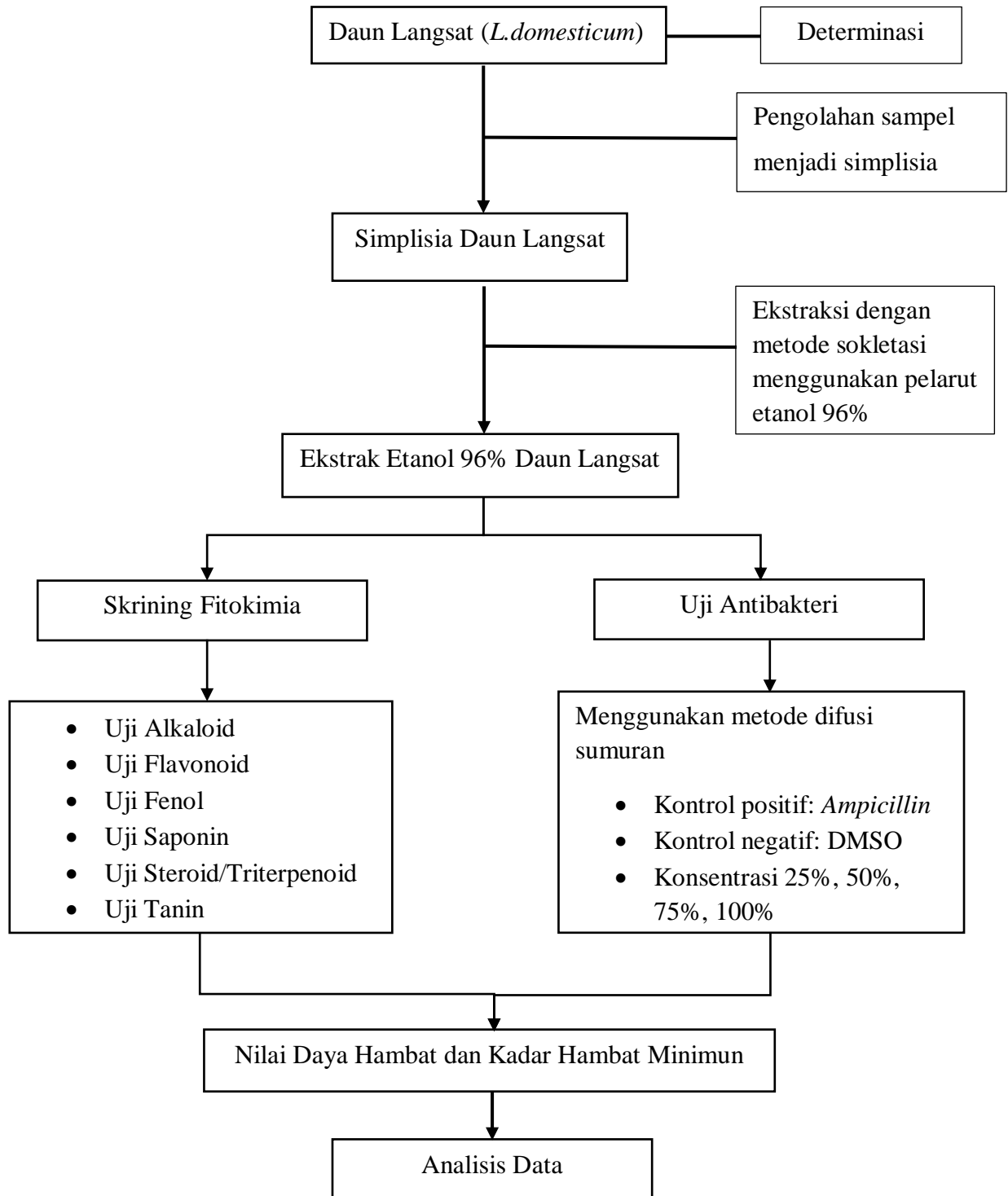
Keterangan :

D1 = Diameter vertical

D2 = Diameter horizontal

D3 = Diameter sumur

3.6.7 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.7 Pengolahan Data

Data yang diperoleh kemudian dilakukan pengolahan data dengan cara pemeriksaan data seperti perhitungan diameter zona hambat pada media lalu dilakukan *coding* atau pemberian kode pada variabel penelitian setelah itu dilakukan *tabulating* atau pengelompokkan data menggunakan tabel pada program komputer seperti *excel*.

3.8 Analisis Data

Data hasil yang didapat dari pengujian uji daya hambat ekstrak etanol 96% daun Langsat (*L.domesticum*) terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli* dengan metode difusi sumuran berupa diameter zona hambat dianalisis menggunakan *Statistical Program For Social Science (SPSS)*.

1. Uji Normalitas Data

Uji normalitas bertujuan untuk memperlihatkan bahwa data yang diinput memiliki distribusi normal atau tidak. Data dikategorikan normal apabila uji signifikan dengan taraf signifikansi ($\alpha = 0,05$) terpenuhi. Apabila nilai signifikan yang dihasilkan lebih besar dari α , maka data tersebut terdistribusi normal. Sebaliknya, apabila nilai didapatkan nilai signifikansi lebih kecil dari α , maka data tersebut tidak terdistribusi normal menggunakan Uji *one-sample kolmogrov-Smirnov test*.

2. Uji Homogenitas Data

Uji Homogenitas bertujuan agar diketahuinya variasi dari beberapa populasi yang menunjukkan kesamaan atau tidak. Jika

didapatkan nilai signifikan pada uji homogenitasnya lebih kecil dari nilai α , maka variasi dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah tidak memiliki kesamaan. Sebaliknya, apabila nilai signifikan lebih besar dari nilai α , maka variasi dari dua atau lebih kelompok populasi data memiliki kesamaan menggunakan Uji *Levene's test*.

3. Uji ANOVA

Uji beda *Analysis of Variance* (ANOVA) dilakukan untuk mengetahui perbedaan rata-rata antara 3 kelompok atau lebih. Uji beda ANOVA memiliki syarat data berupa kategori statistik parametrik (yaitu data yang normal dan bervariasi homogen). Analisis lanjutan setelah ANOVA sering disebut dengan LSD (*least significance Difference*), digunakan untuk melakukan uji beda diantara seluruh pasangan kelompok mean.