

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan rancangan studi eksperimental *in vitro* menggunakan pengamatan hasil uji skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder pada ekstrak daun lakum serta untuk mengetahui efektivitas antibiofilm daun lakum (*Causonis trifolia* L.) pada *Staphylococcus aureus* melalui pembacaan *microplate reader* yang mengukur nilai absorbansi dari bakteri tanaman berdasarkan nilai densitas optiknya untuk mengukur besar persen penghambatan biofilm pada daun lakum (Soesatyo & Pinandito, 2007).

B. Subjek dan Objek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah ekstrak daun lakum (*Causonis trifolia*) yang berasal dari Kalimantan Timur tepatnya di Kota Tenggarong, Kabupaten Kutai Kartanegara, di provinsi Kalimantan Timur, Indonesia. Sedangkan objek penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan biofilm akibat bakteri tersebut.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2021 hingga April 2022 yang dilakukan di Laboratorium Farmasi Bahan Alam, Kimia Bahan Alam, dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur serta di Laboratorium Kehutanan Universitas Mulawarman Samarinda, Kalimantan Timur.

D. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun lakum (*Causonis trifolia*) merupakan bahan utama penelitian yang berupa ekstrak kental daun lakum.
2. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang berbentuk bulat (*coccus*) memiliki sifat pewarnaan Gram positif yang menggerombol seperti anggur dan pembentuk biofilm kuat.
3. Skrining fitokimia merupakan salah satu uji yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat dalam suatu ekstrak

tanaman dengan menggunakan reagen-reagen tertentu untuk mengidentifikasi senyawa tersebut.

4. *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) merupakan konsentrasi terendah dari antibiotika/antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba tertentu.
5. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC); MBIC₅₀ merupakan konsentrasi minimal suatu senyawa yang dapat menghambat 50% pembentukan biofilm yang nilai rerata optikal densitasnya berada dibawah nilai *cut off point* MBIC₅₀ (Pierce *et al.*, 2010).

E. Alat dan Bahan Penelitian

Pada penelitian ini, peralatan-peralatan penelitian yang digunakan yaitu oven, toples kaca, pengaduk kayu, gelas ukur, kertas saring, erlenmeyer, corong, cawan porselen, *rotary evaporator*, *waterbath*, aluminium foil, *plastic wrap*, baskom stainless, batang pengaduk, *microtube*, kertas coklat, autoklaf, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, mikropipet, tip mikropipet, cawan petri, *plate reader 96 wells*, neraca analitik, alat-alat gelas, inkubator, jarum ose, bunsen, *mikro reader*, *microscope*, *Laminar Air Flow* (LAF), dan lain sebagainya.

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak daun lakum (*Causonis trifolia*), kultur bakteri *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), media *natrium borth* (NB), media *natrium agar* (NA), air suling (*aquadest*) steril, kristal violet (1% dalam aquades), etanol 96%, *Clindamycin*, reagen mayer, reagen bouchardat, reagen dragondorf, magnesium (Mg), asam klorida pekat (HCl pekat), amil alkohol, reagen Liebermann-Burchard dan lain-lain.

F. Metode Pengumpulan Data

Pada penelitian ini, pengumpulan data dilakukan dengan melakukan observasi. Observasi ini sendiri merupakan suatu teknik pengumpulan data dengan mengamati secara langsung objek yang diteliti, yaitu hasil uji fitokimia dan persen (%) penghambatan biofilm ekstrak daun lakum (*Causonis trifolia*) terhadap pertumbuhan dan

pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* yang terdapat pada media *Nutrient Broth* (NB) yang telah tercampur dengan ekstrak daun lakum (*Causonis trifolia*) dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 0,125%, 0,25%, 0,5%, dan 1%, dengan kontrol negatif bakteri 100% serta kontrol positif *Clindamycin* 1%.

Penggunaan antibiotik *Clindamycin* adalah karena menurut Bonner & James (2012) dan Murlistyarini *et al* (2018), *Clindamycin* merupakan antibiotik semisintetik linkosamid dengan mekanisme kerja obat yang mengikat ribosom 50S dan penekanan sintesis protein bakteri salah satunya adalah bakteri *Staphylococcus aureus*.

Menurut Sugiyono (2014), observasi merupakan suatu proses yang kompleks dalam suatu proses yang tersusun dari berbagai proses biologis dan psikologis. Dalam hal ini, dua hal yang sangat penting adalah proses-proses pengamatan dan ingatan.

G. Teknik Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan pengamatan hasil skrining fitokimia menggunakan beberapa reagen tertentu serta pengamatan hasil uji biofilm dengan mengukur absorbansi dan rata-rata pada pengolahan menggunakan MBIC₅₀.

H. Alur Jalannya Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Sampel daun lakum (*Causonis trifolia*) yang diperoleh dari Kota Tenggarong, Kabupaten Kutai Kartanegara, Provinsi Kalimantan Timur, Indonesia.

2. Determinasi Tanaman

Tanaman lakum, tepatnya daun lakum yang akan digunakan dalam penelitian ini dideterminasi berdasarkan ciri morfologi tanaman. Proses determinasi tanaman akan dilakukan di Laboratorium Kehutanan Universitas Mulawarman Samarinda.

3. Pembuatan Serbuk

Simplisia daun lakum yang telah diambil akan dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran atau bahan asing serta bagian

tanaman lain yang tidak diinginkan dari bahan simplisia. Setelah dilakukan sortasi basah, dilanjutkan dengan melakukan pencucian, perajangan, dan pengeringan simplisia. Proses pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan matahari hingga simplisia benar-benar kering (diperoleh kadar air $\leq 10\%$) (Wahyuni *et al.*, 2014).

Kemudian setelah proses pengeringan simplisia selesai, dilanjutkan dengan melakukan sortasi kering untuk memisahkan bahan-bahan asing dan simplisia yang belum kering benar agar simplisia telah terjamin benar-benar bebas dari bahan asing. Setelah itu dilakukan proses penyerbukan simplisia menggunakan blender (Wahyuni *et al.*, 2014).

4. Pembuatan Ekstrak Daun Lakum (*Causonis trifolia*)

Daun lakum diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dimana daun lakum yang telah diserbukkan ditimbang sebanyak 200 g dan diberikan pelarut etanol 96% sebanyak 2250 mL. Ekstraksi dilakukan selama 3×24 jam atau selama 3 hari. Setelah dilakukan ekstraksi, disaring hasil maserasi untuk memisahkan antara hasil ekstrak larut dan filtrat. Kemudian ekstrak larut di *rotary evaporator* hingga ekstrak agak mengental atau pelarut dengan ekstrak telah terpisah secukupnya. Setelah itu, hasil ekstrak *rotary evaporator* tadi di *waterbath* hingga ekstrak mengental.

5. Pengujian Analisis Fitokimia

a. Senyawa Alkaloid

1) Filtrat Uji

Diambil ekstrak secukupnya dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* atau Erlenmeyer kemudian ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL aquadest. Setelah itu, homogenkan larutan 22andem dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit lalu didinginkan dan disaring.

2) Uji Mayer

Dimasukkan ± 2 mL filtrat uji ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 – 2 tetes reagen Mayer ke dalam

tabung. Jika terbentuk endapan putih atau kuning keruh pada larutan, maka ekstrak positif mengandung alkaloid.

3) Uji Bouchardat

Dimasukkan \pm 2 mL filtrat uji ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan beberapa tetes reagen bouchardat ke dalam tabung. Jika larutan menghasilkan warna coklat kehitaman, maka ekstrak positif mengandung alkaloid.

4) Uji Dragendorff

Dimasukkan \pm 2 mL filtrat uji ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan beberapa tetes reagen dragendorff. Jika terbentuk endapan jingga atau merah bata pada larutan, maka ekstrak positif mengandung alkaloid.

5) Uji Wagner

Dimasukkan \pm 2 mL filtrat uji ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan beberapa tetes reagen Wagner yang ditambahkan melalui dinding tabung reaksi. Jika larutan menghasilkan warna coklat kemerahan maka ekstrak positif mengandung alkaloid.

b. Senyawa Flavonoid

1) Uji dengan Amil Alkohol

Diambil ekstrak kental secukupnya dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* atau *23andemic23r*. Kemudian ditambahkan 10 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit. Kemudian setelah 5 menit langsung disaring.

Setelah itu, sebanyak 5 mL filtrat uji tadi dan ditambahkan 50 mg Mg, 1 mL HCl pekat, serta 2 mL amil alkohol ke dalam tabung reaksi. Setelah itu dikocok dan dibiarkan memisah. Jika larutan menghasilkan warna merah atau jingga di bagian lapisan amil alkohol, maka ekstrak positif mengandung flavonoid.

2) Uji dengan NaOH 10%

Tambahkan pereaksi NaOH 10% ke dalam isolat yang telah dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Jika larutan mengalami perubahan warna yang spesifik, maka ekstrak positif mengandung flavonoid.

c. Senyawa Fenolik

1) Uji Ferri Klorida

Sebanyak 50 mg ekstrak daun lakum dilarutkan dalam 5 mL aquadest. Kemudian ditambahkan beberapa tetes ferri klorida 5% netral. Jika larutan menghasilkan warna hijau pekat, maka ekstrak positif mengandung fenolik.

d. Senyawa Polifenol

1) Uji Golongan Polifenol

Tambahkan larutan FeCl₃ 10% dalam aquadest. Kemudian masukkan ke dalam isolat yang telah dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Jika larutan menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat, maka ekstrak positif mengandung polifenol.

e. Senyawa Terpenoid/Sterol/Steroid

Uapkan ekstrak sebanyak 2 mL kemudian residu yang diperoleh dari proses penguapan dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya, larutan tadi ditetesi dengan asam sulfat pekat sebanyak 2 mL melalui dinding tabung reaksi tersebut. Jika larutan menghasilkan warna hijau kebiruan, maka ekstrak positif mengandung terpenoid, sterol maupun steroid.

Adapun metode lain untuk mengidentifikasi ketiga senyawa ini adalah dengan cara larutan ekstrak sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchard. Jika larutan menghasilkan warna hijau atau biru, maka ekstrak positif mengandung steroid. Jika

larutan menghasilkan warna ungu atau merah, maka ekstrak positif mengandung terpenoid.

f. Senyawa Tanin

Diambil secukupnya ekstrak kental dan ditambahkan 10 mL aquadest. Kemudian dipanaskan larutan selama 3 menit dan didinginkan. Setelah dingin, disaring filtrat dan diencerkan 25x. Setelah disaring, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan beberapa 1-2 tetes pereaksi FeCl_3 . Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman, maka ekstrak positif mengandung tanin.

Adapun metode lain untuk mengidentifikasi senyawa tanin ini adalah dengan cara dimasukkan ± 2 mL filtrat ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%. Jika larutan menghasilkan warna hijau atau hitam kebiruan, maka ekstrak positif mengandung tanin.

g. Senyawa Saponin

Diambil secukupnya ekstrak kental dan ditambahkan 10 mL aquadest panas (air panas). Kemudian filtrat didinginkan dan dikocok kuat-kuat. Jika larutan menghasilkan busa setelah dikocok dan tidak hilang selama ≥ 5 menit, maka ekstrak positif mengandung saponin.

6. Determinasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Determinasi Bakteri dilakukan sebelum melakukan uji biofilm adalah untuk memastikan bahwa bakteri yang akan digunakan benar bakteri *Staphylococcus aureus*. Determinasi dilakukan dengan melihat bakteri melalui mikroskop dan diverifikasi ciri-ciri bakteri *Staphylococcus aureus*.

Cara melakukan uji determinasi bakteri *Staphylococcus aureus* ini adalah dengan cara pertama dinyalakan Bunsen yang telah berisi spiritus dan disterilkan *glass slide* diatas Bunsen. Diambil koloni bakteri secukupnya dengan menggunakan ose bulat dan diletakkan pada *glass slide* dengan sedikit disebarakan secara melingkar pada

bagian dalam *glass slide*. Kemudian diberikan beberapa tetes *crystal violet* pada *glass slide* yang terdapat bakteri dan diamkan selama 1 menit kemudian dibilas dengan menggunakan aquadest.

Setelah itu diberikan beberapa tetes lugol, diamkan selama 1 menit dan bilas lagi dengan menggunakan *aquadest*. Kemudian diberikan alirkan alkohol 98% selama 5 detik pada *glass slide* dan dibilas kembali dengan menggunakan aquadest. Setelah itu diberikan beberapa tetes safranin pada *glass slide* yang terdapat bakteri dan diamkan selama 1 menit kemudian dibilas dengan menggunakan aquadest. Setelah itu, diberikan minyak imersi pada *glass slide* yang terdapat bakteri dan tutup *glass slide* dengan penutupnya. Kemudian letakkan *glass slide* pada mikroskop dan amati deskripsi bakteri yang terlihat apakah sama dengan deskripsi bakteri *Staphylococcus aureus* atau tidak.

7. Penyiapan Bakteri Uji

Bakteri *Staphylococcus aureus* dibiakkan dalam media *Natrium Broth* (NB) dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Densitas optic 600 dari kultur bakteri disesuaikan dengan standar McFarland 0,1 yaitu $0,5 - 1,5 \times 10^8$ CFU/mL dengan melihat tingkat kepadatan bakteri menggunakan bantuan alat Spektrofotometri. Jika kepadatan sel bakteri *Staphylococcus aureus* belum sesuai dengan standar *McFarland*, maka media bakteri perlu diencerkan dengan menggunakan media pertumbuhan baru hingga tingkat kepadatan bakteri telah sesuai dengan standar *McFarland* yaitu menjadi OD₆₀₀ 0,01. Jika kepadatan sel telah sesuai dengan standar *McFarland*, maka bakteri uji biofilm telah dapat digunakan untuk pengujian.

8. Pengujian Penghambatan Pembentukan Mono-Spesies Biofilm

Sebanyak 5 µL 26andemic mikroba (10^7 CFU/mL) dan 75 µL media yang mengandung ekstrak uji dengan seri konsentrasi (0,125%, 0,25%, 0,5%, dan 1% b/v) dimasukkan pada tiap *wells microtiter plate*. Selain itu, diberikan kontrol aquadest sebanyak 20 µL, kontrol media sebanyak 75 µL, kontrol etanol, dan kontrol obat pada

wells lainnya sebagai perbandingan hasil uji. Setelah siap, *plate* diinkubasi selama 24 dan 48 jam.

Setelah selesai diinkubasi dengan waktu yang telah ditentukan, *plate* dicuci menggunakan aquadest steril sebanyak tiga kali untuk menghilangkan sel-sel yang tidak melekat. Kemudian berikan *crystal violet* 1% sebanyak 100 μL pada setiap *wells* yang terisi oleh sampel uji dan didiamkan selama 15 menit. Setelah itu dibuang larutan *crystal violet* pada *plate* kemudian dicuci lagi dengan menggunakan aquadest steril sebanyak tiga kali. Setelah dicuci, diberikan etanol 96% sebanyak 100 μL pada setiap *wells* yang terisi oleh sampel uji dan kemudian ujikan sampel dalam alat *mikro reader*.

Sebagai kontrol media digunakan media tanpa pertumbuhan mikroba, dan suspensi mikroba digunakan sebagai kontrol pertumbuhan. Sebagai kontrol obat digunakan suspensi mikroba yang diberi *Clindamycin* kadar 1% b/v. *Plate* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 dan 48 jam. Selanjutnya *plate* dicuci menggunakan air suling sebanyak tiga kali, dan dikeringkan pada suhu kamar selama 5 menit untuk menghilangkan sisa air.

Sebanyak 125 μL larutan kristal violet 1% ditambahkan ke dalam tiap *wells* untuk mewarnai biofilm yang telah terbentuk, baik sel mati maupun sel hidup yang juga merupakan komponen penyusun dari biofilm. *Plate* selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Setelah inkubasi pada suhu kamar, *microplate* dicuci dengan air mengalir sebanyak tiga kali untuk membersihkan sisa kristal violet dan ditambahkan 200 μL etanol 96% ke dalam tiap sumuran untuk melarutkan biofilm yang terbentuk.

Pembacaan *Optical Density* (OD) dilakukan dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 620 nm. Pengujian dilakukan dengan tiga kali replikasi. Data yang diperoleh dari analisis penghambatan biofilm berupa nilai OD dari masing-masing konsentrasi senyawa uji maupun kontrol tanpa senyawa uji (kontrol pertumbuhan) yang diperoleh dari pembacaan dengan *microplate reader*.

Untuk menentukan persen penghambatan bakteri, perhitungan digunakan nilai OD hasil analisis penelitian dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{\text{OD rerata kontrol negatif} - \text{OD rerata sampel uji}}{\text{OD rerata kontrol negatif}} \times 100\%$$

Kadar sampel yang dapat menghambat paling sedikit 50% pembentukan biofilm dianggap sebagai MBIC₅₀ (*Minimal Biofilm Inhibition Concentration*).

