

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini ialah penelitian kuantitatif dengan metode eksperimental, dimana pendekatan eksperimental adalah pendekatan yang digunakan untuk menyelidiki hubungan sebab akibat dengan mengubah satu atau lebih variabel dalam satu (atau lebih) kelompok eksperimen dan membandingkan temuan dengan kelompok kontrol yang tidak secara sistematis mempengaruhi karakteristik (nilai) dari variabel independen (nilai) (Payadnya & Jayantika, 2018).

#### B. Subjek dan Objek Penelitian

##### 1. Subjek penelitian

Subjek penelitian adalah ekstrak etanol dan fraksi n-heksan daun kokang (*Lepisanthes amoena* Hassk. Leenh).

##### 2. Objek penelitian

Objek penelitian adalah bakteri *staphylococcus aureus* yang dikembangbiakan di laboratorium mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur dan daun kokang (*Lepisanthes amoena* Hassk. Leenh) yang didapat dari Tenggarong, kabupaten Kutai Kartanegara.

#### C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan antara Agustus 2022 hingga Januari 2023 di laboratorium mikrobiologi dan kimia bahan alam Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

## D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 1. Variabel penelitian:

- a. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu kosentrasi ekstrak etanol daun kokang dan kosentrasi fraksi n-heksan daun kokang.
- b. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu konsentrasi hambat minimum (KHM) dari bakteri *Staphylococcus aureus*.
- c. Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu suhu inkubasi, komposisi media agar dan waktu inkubasi

### 2. Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi operasional

NO	VARIABEL	DEFINISI OPERASIONAL	CARA UKUR	HASIL UKUR	SKALA
1	Kosentrasi ekstrak etanol daun kokang	Kosentrasi ekstrak etanol dari daun kokang dengan kosentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%	-	-	Numerik
2	Kontrol Positif	Diameter zona hambat dari agen yang memiliki aktivitas antibakteri yang digunakan untuk pembanding. Kontrol positif yang digunakan adalah klindamisin.	Diukur dengan jangka sorong	Diameter zona hambat	Numerik
3	Kontrol negatif	Diameter zona hambat dari agen yang memiliki aktivitas antibakteri yang digunakan untuk pembanding. Kontrol negatif yang digunakan	Diukur dengan jangka sorong	Diameter zona hambat	Numerik

		adalah etanol 96%.			
4	Fraksi aktif	Hasil fraksinasi dari ekstrak daun kokang yang mempunyai zona hambat bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .	Fraksinasi	Fraksi n-heksan	Numerik
5	Diameter zona hambat bakteri	Diameter zona jernih yang terlihat di sekitar media pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .	Diukur dengan jangka sorong	Diameter zona jernih pada sekitar media aktivitas bakteri	Numerik

## E. Instrumen Penelitian

### 1. Bahan Penelitian

Sampel daun kokang (*Lepisanthes amoena* Hassk. Leenh), fraksi n-heksan, etanol 96%, aquadest, klindamisin, medium NA, dan bakteri *Staphylococcus aureus*.

### 2. Alat Penelitian

seperangkat alat maserator, *shaker*, termometer, timbangan analitik, corong pisah, autoklaf, oven, *rotary evaporator*, inkubator, jangka sorong, laminar air flow, erlenmeyer, batang pengaduk, labu ukur, cawan petri, pipet tetes, pipet volume, pipet ukur, karet penghisap, cawan porselin, pengaduk kaca, corong gelas, gelas beker, gelas ukur, mortir dan stamper, lampu spiritus atau bunsen, ose, blender, kertas saring.

## F. Metode Pengumpulan Data

Informasi yang diambil dalam ulasan adalah data primer. Analisis jangka sorong dan anova atau Kruskal-Wallis digunakan untuk mengukur diameter zona penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* untuk tujuan pengumpulan data.

## G. Teknik Analisis Data

Informasi tersebut dibedah menggunakan SPSS 24 dan dicoba dengan mengestimasi lebar zona penghambatan dan uji anova dalam memperkirakan kadar hambat minimum (KHM).

## H. Alur Jalannya Penelitian

### 1. Pengambilan sampel

Daun kokang (*Lepisanthes amoena* Hassk. (Leenh)) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sampel yang dikumpulkan di daerah Bendang Raya Kecamatan Tenggarong, Kabupaten Kutai Kartanegara.

### 2. Pembuatan simplisia

*Lepisanthes amoena* Hassk (Leenh) atau daun kokang dibersihkan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan tanah yang menempel kemudian, kemudian, dikeringkan selama beberapa minggu. Bubuk dibuat dengan menumbuk daun kering bersama-sama.

### 3. Metode ekstraksi simplisia

96 persen etanol digunakan sebagai pelarut untuk maserasi daun kepompong bubuk. Daun basah kuyup selesai selama 24 jam sementara kebetulan menyatu. Sejak saat itu, simplisia dipisahkan untuk memperoleh maserat. Tiga kali, pulp yang disaring dimaserasi sekali lagi dalam pelarut yang mengandung etanol 96%. Menggunakan rotary evaporator, semua maserat digabungkan dan diuapkan sampai ekstrak kental diproduksi. Kemudian disimpan dalam desiccator (Warnida, 2016).

### 4. Fraksinasi

Prosedur fraksinasi melibatkan pelarutan hingga satu gram ekstrak daun terlebih dahulu, kemudian menambahkan pelarut n-heksana ke ekstrak terlarut dalam corong pemisah sampai rasio fraksi n-heksana setidaknya 1:1 ke kadar air. Setelah memberikan larutan beberapa kali getar untuk menghilangkan gas yang

tersangkut di corong split, diamkan hingga larutan terpisah atau terbelah menjadi dua fase. Setelah itu, pisahkan tahap air dan bagian n-heksana.

## 5. Uji antibakteri

### a. Sterilisasi alat dan bahan

Tahap pertama dalam mensterilkan bahan dan instrumen yang akan digunakan adalah menggunakan autoklaf dengan tekanan 1,5 atm dan suhu 121°C selama 15 menit. Pinset dan jarum ose disterilkan pada bunsen dengan pijar, sedangkan sterilisasi oven membutuhkan waktu 1 jam pada suhu 170°C.

### b. Pembuatan media agar NA

Media agar dibuat dengan melarutkan hingga 20 gram agar-agar dalam 1 liter aquadest, memanaskan campuran sampai media larut, dan kemudian menuangkan campuran ke dalam cawan petri dan membiarkannya mengeras. Setelah itu, autoclave digunakan untuk mensterilkan media agar NA (Prihandani, 2015).

### c. Pemiakan bakteri *Staphylococcus aureus*

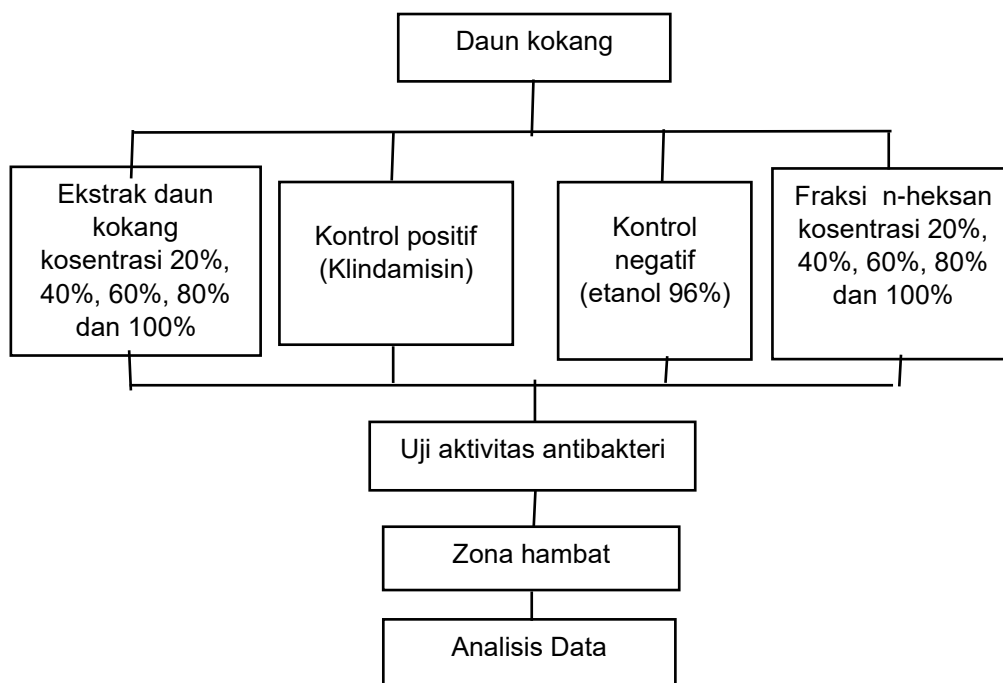
Organisme mikroskopis yang akan dimanfaatkan adalah mikroorganisme *Staphylococcus aureus* dari stok kultur di fasilitas Penelitian Ilmu Mikrobiologi di Perguruan Tinggi Muhammadiyah Kalimantan Timur yang diindukkan ke dalam medium NA miring dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, air steril digunakan untuk mendistribusikan bahan uji sehingga dapat digunakan sebagai mikroba.

### d. Pembuatan kontrol positif

Clindamycin merupakan antibiotik yang digunakan pada peneliti sebagai kontrol positif. Setelah itu, 10 ml aquadest digunakan untuk melarutkan 0,05 gram klindamisin, yang kemudian ditambahkan ke botol yang tertutup rapat.

e. Uji aktivitas bakteri

Larutan ekstrak dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dibuat menggunakan pelarut etanol 96%. Untuk pengujian, metode difusi disk digunakan. Setelah direndam dalam larutan yang mengandung ekstrak etanol daun 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, kertas cakram direndam dalam kontrol positif dan negatif klindamisin, fraksi etanol 96% dan n-heksana masing-masing pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Setelah itu, kertas cakram diletakkan di atas media agar dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona penghambatan terbentuk kemudian dilihat dan diukur menggunakan jangka sorong milimeter.



Gambar 3. 1 Skema alur jalannya penelitian

