

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

1. Metode penelitian

Pada penelitian ini bersifat kuantitatif eksperimental, adapun metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi langsung menggunakan pelarut etanol 70%. Pengujian untuk perbandingan aktivitas antibakteri dari ekstrak daun sungkai dan ekstrak kulit batang sungkai (*Peronema canescens* Jack) terhadap bakteri *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus epidermidis* digunakan metode difusi disk. Sebagai kontrol positif digunakan *Clindamycin* dan sebagai kontrol negatif digunakan aquadest. Setelah pengukuran, data dianalisis dengan *One Way Anova*. *One Way Anova* bermaksud untuk mengetahui membandingkan dua atau lebih kelompok perlakuan yang berbeda.

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah daun sungkai dan kulit batang sungkai yang telah di ekstrak menggunakan pelarut etanol, yang kemudian ekstrak tersebut telah menjadi ekstrak kental yang bebas pelarut.

2. Objek Penelitian

Objek pada penelitian ini adalah bakteri gram positif yaitu bakteri *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus epidermidis*.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dari bulan Desember 2021 sampai bulan Juni 2022.

2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Kimia Bahan Alam Universitas Muhammadiyah

Kalimantan Timur, Jl. I. Ir. H. Juanda No.15, Sidodadi, Kec. Samarinda Ulu, Kota Samarinda, Kalimantan Timur.

D. Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Variabel Bebas yaitu ekstrak kulit batang dan daun sungkai (*Peronema canescens* Jack).
- b. Variabel Terikat yaitu besaran zona hambat ekstrak daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) terhadap bakteri *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus epidermidis*.

2. Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol daun sungkai adalah hasil ekstraksi dengan metode maserasi dari serbuk simplisia kulit batang dan daun sungkai dengan menggunakan pelarut etanol 70%.
- b. Konsentrasi yang digunakan pada ekstrak daun sungkai dan kulit batang sungkai yaitu 50%, 60%, 70%.
- c. Ekstrak adalah sediaan yang diperoleh dari hasil penarikan senyawa aktif dari simplisia nabati maupun hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai.
- d. Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan dari bakteri dengan cara mengganggu kerja metabolisme bakteri untuk tumbuh.
- e. Metode uji antibakteri yang digunakan yaitu metode difusi paper disk. Parameter yang diamati adalah diameter zona hambat pada kertas cakram yang berisi media kultur dengan satuan milimeter (mm).

E. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat-alat yang dipakai dalam penelitian ini adalah jangka sorong, masker, *beaker glass*, pipet tetes, cawan petri, corong pisah, sarung tangan, *erlenmeyer*, batang pengaduk, *rotary evaporator*, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *aluminium*

foil, jarum ose, pinset, *incubator incucell*, *autoclave*, *Laminar Air Flow*, lampu pijar, *water bath* dan botol spray, dan kertas saring.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu kulit batang sungkai, daun sungkai, bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* dan *Propionibacterium acnes*, aquades, etanol 70%, *Clindamycin*, *nutrient agar*, kertas label, *tissue*, H₂SO₄, HCl, Pereaksi *Dragendorff*, Pereaksi *Mayer*, FeCl₃, BaCl, *Cotton Bud*.

F. Metode Pengumpulan Data

1. Studi pendahuluan

Studi pendahuluan berguna untuk melihat kandungan zat aktif apa saja yang ada terkandung dalam kulit batang sungkai dan daun sungkai, lalu mencari lokasi tempat untuk pengambilan bahan daun sungkai dan lokasi penelitian.

2. Tahap Observasi

Tahap observasi berguna untuk penggalian informasi melalui jurnal terdahulu yang telah dipublikasi melalui media seperti google scholar dan pubmed.

3. Tahap Penelitian

Dilakukan penelitian perbandingan uji aktivitas antibakteri terhadap daun sungkai dan kulit batang sungkai yang telah diekstrak menggunakan metode *difusi disk*.

G. Prosedur Kerja

1. Pengumpulan Bahan Daun Sungkai dan Kulit Batang Sungkai

Daun sungkai dan kulit batang sungkai diambil dari daerah Muara Kaman, Kutai Kartanegara di Kalimantan Timur. Sampel daun sungkai dan kulit batang yang digunakan adalah kulit batang dan daun yang dalam keadaan segar.

2. Persiapan Peralatan dan Bahan

Alat yang akan dipakai dicuci terlebih dahulu lalu dikeringkan. selanjutnya diulas menggunakan kertas sterilisasi. Kemudian

semua alat disterilkan di dalam autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1 ATM selama 20 menit.

3. Pembuatan Serbuk Daun Sungkai dan Kulit Batang Sungkai

Dilakukan sortasi basah pada kulit batang sungkai dan daun sungkai dicuci sampai bersih untuk menghilangkan kotorannya menggunakan air mengalir. Selanjutnya kulit batang sungkai dan daun sungkai dirajang untuk mempermudah proses pengeringan, setelah dirajang daun dan kulit batang sungkai dikeringkan di bawah sinar matahari. kemudian diserbuk menggunakan blender agar halus. Setelah itu disimpan di dalam wadah yang kering dan tertutup rapat.

4. Ekstraksi Etanol Daun Sungkai dan Kulit Batang Sungkai

Ekstraksi daun dan kulit batang sungkai dilakukan menggunakan metode maserasi dan direndam dengan pelarut etanol 70% selama 5 hari. Lalu dilakukan penyaringan, Kemudian ekstrak di *Rotary* agar menjadi pekat lalu diuapkan di *waterbath* untuk memperoleh ekstrak kental.

5. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Sungkai dan Kulit Batang Sungkai

Beberapa uji senyawa metabolit sekunder yang dilakukan pada penelitian ini, adalah:

a. Uji senyawa alkaloid

Ekstrak kasar daun sungkai dan kulit batang (*Peronema canescens* Jack) dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi selanjutnya ditetesi dengan H₂SO₄ 1 M 2-3 tetesan lalu dihomogenkan kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi Dragendorff jika mengandung positif alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna jingga sampai merah coklat (Ikalinus *et al*, 2015).

b. Uji senyawa flavonoid

Ekstrak kasar daun sungkai dan kulit batang sungkai (*Peronema canescens* Jack.) masing-masing sampel diletakkan

ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan serbuk Mg dan larutan HCl(p) kemudian dididihkan sampel. Hasil positif flavonoid ditandai jika terjadi perubahan warna seperti warna merah, kuning atau jingga (Fernalisa *et al*, 2018).

c. Uji senyawa saponin

Ekstrak kasar daun sungkai dan kulit batang sungkai diletakkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan aquades dan dikocok selama 15 menit. Adanya buih atau busa konstan yang tahan lama di permukaan setelah proses pengocokkan menandakan sampel positif mengandung saponin (Katja, 2020).

d. Uji senyawa fenolik

Ekstrak kasar daun sungkai dan kulit batang sungkai masing-masing diletakkan ke dalam tabung reaksi selanjutnya ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl 5% ke dalam sampel. Hasil positif fenol ditandai munculnya warna hijau hingga hitam (Novilia *et al*, 2014).

e. Uji Senyawa Tannin

Ekstrak kasar daun sungkai dan kulit batang sungkai masing-masing diletakkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan tiga tetes FeCl₃. Apabila sampel mengalami perubahan warna menjadi biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan positif tanin (Katja, 2020).

6. Uji Aktivitas Antibakteri dan Antijamur

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang dipakai dalam uji aktivitas daya hambat antibakteri terlebih dahulu harus disterilkan. Alat-alat seperti gelas, *stainless*, dan media *nutrient* agar disterilkan di dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit, sedangkan pensterilan jarum ose dan pinset dilakukan dengan dibakar pada nyala api bunsen.

b. Pembuatan Larutan McFarland

Pembuatan standar kekeruhan 0.5 unit *Mc Farland* dilakukan dengan mencampurkan larutan H_2SO_4 1% sebanyak 9.95 ml dan larutan BaCl 1% sebanyak 0.05 ml (Berliana *et al*, 2020).

c. Pembuatan Medium

Medium nutrient agar sebanyak 4,8 gram dilarutkan dalam 240 ml aquadest. Kemudian medium dipanaskan sampai terlarut sempurna, selanjutnya disterilkan di dalam autoklaf dengan suhu $121^\circ C$ selama 15 menit.

1) Peremajaan Bakteri dengan Metode *Streak Plate*

- a) Strain sampel bakteri *Staphylococcus epidermidis* diremajakan dengan mengambil 1 ose biakan murni selanjutnya digores secara zig-zag pada media agar lalu di Inkubasi menggunakan inkubator pada suhu kamar $36^\circ C - 37^\circ C$ selama 24 jam.
- b) Strain sampel bakteri *Propionibacterium acne* diremajakan dengan mengambil 1 ose biakan murni selanjutnya digoreskan secara zig-zag pada media agar lalu di Inkubasi menggunakan inkubator pada suhu $36^\circ C - 37^\circ C$ selama 24 jam.

2) Pembuatan Suspensi Bakteri

Masing-masing kultur *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus epidermidis* yang sudah diremajakan diambil dengan jarum ose sebanyak 3-4 goresan, kemudian diletakkan ke dalam masing-masing tabung reaksi dengan perbandingan larutan *McFarland*.

H. Teknik Analisis Data

1. Analisis Univariat

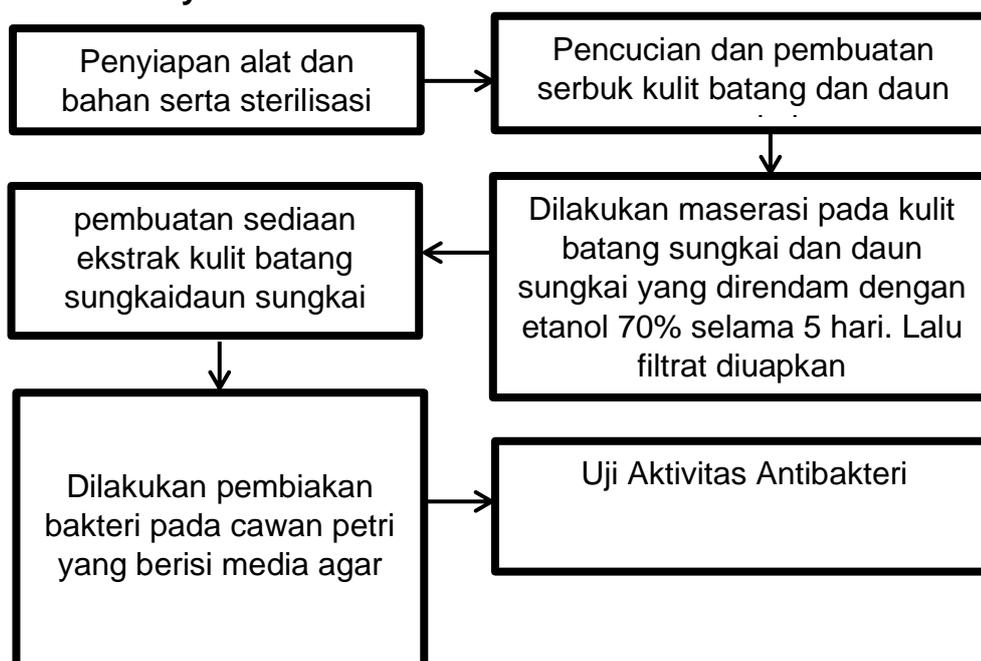
Analisis univariat adalah analisis yang digunakan guna mendapatkan atau mendeskripsikan karakteristik variabel yang diteliti, variabel bebas pada penelitian ini adalah (konsentrasi ekstrak etanol daun dan kulit batang sungkai) dan variabel terikat

pada penelitian ini adalah (daya hambat pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dan *Propionibacterium acne*) sehingga bisa diketahui karakteristik variabel yang diamati.

2. Analisis Bivariat

Setelah didapatkan data pada variabel terikat, maka dilakukan uji metode statistik, yaitu standar deviasi dan *One Way Anova*. Uji ini digunakan untuk distribusi atau persebaran data populasi sampel yang akan diuji normal dengan nilai signifikansi tidak lebih besar dari 0,05.

I. Alur Jalannya Penelitian



Gambar 3.1 Alur Jalannya Penelitian

