

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian yang bersifat eksperimental di laboratorium, dengan delapan kelompok perlakuan yaitu ekstrak etanol 70% dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15%, ekstrak etanol 96% dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15% dan dua kelompok kontrol yaitu kontrol positif (Kloramfenikol 30 μ g) dan kontrol negatif (Dimetil Sulfoksida). Variabel bebas adalah konsentrasi ekstrak daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) dan variabel terikatnya yaitu zona hambat bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Pengulangan pada penelitian ini adalah 5 kali, dengan perhitungan pengulangan berikut (Hanafiah, 2010:6) :

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

$$(8-1)(r-1) \geq 15$$

$$7r-7 \geq 15$$

$$7r \geq 15+7$$

$$r \geq 3,33$$

$$r = 5$$

Keterangan :

r = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

15 = tetapan yang telah ditentukan

B. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah ekstrak daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) yang disari menggunakan etanol 70% dengan konsentrasi 5%, 10%, 15% dan ekstrak daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) yang disari menggunakan etanol 96% dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang untuk melakukan proses ekstraksi, uji skrining fitokimia, dan pengujian aktivitas antibakteri. Serta di Laboratorium Kimia Organik Universitas Lampung untuk melakukan pemekatan ekstrak dengan menggunakan *rotary evaporator*. Waktu penelitian ini dilaksanakan mulai Maret-Mei tahun 2021.

D. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, gelas ukur 100 mL, beaker glass 1000 mL, beaker glass 100 mL, pipa kapiler, labu ukur, tabung reaksi, erlenmeyer 100 mL, kaca arloji, batang pengaduk, oven, autoklaf, inkubator, cawan petridish, cawan penguap, hot plate, lampu spiritus, blender, ose, pinset, corong gelas, spatula, jangka sorong, *rotary evaporator* IKA RV 8, dan spidol.

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.), dimetil sulfoksida (DMSO), etanol 70%, etanol 96%, *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), *Mueller Hinton Agar* (MHA), H₂SO₄ 1%, BaCl₂ 1%, NaCl 0,9%, HCl 2N, pereaksi meyer, pereaksi bouchardat, pereaksi dragendrof, serbuk Mg, HCl (P), n-Heksan, H₂C₂O₄, H₂SO₄ (P), FeCl₃ 3%, NaCl 10%, gelatin 1%, *aluminium foil*, kapas steril, disk kosong, disk kloramfenikol 30µg, kertas tempel, kertas saring, dan kertas buram.

2. Prosedur Kerja Penelitian

a. Dibuat Simplisia Daun Semak Merdeka

- 1) Diambil daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) segar yang sudah diidentifikasi morfologinya berdasarkan literatur. Daun didapatkan di daerah Kecamatan Rajabasa, Bandar Lampung.
- 2) Dilakukan sortasi basah dengan memisahkan daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) dari kotoran dan bahan asing lain seperti batang dan tangkai.
- 3) Dicuci bersih daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) menggunakan air mengalir.
- 4) Dilakukan perajangan daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) untuk memperkecil ukurannya.
- 5) Diletakkan daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) di atas nampan *stainless* kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40⁰C.
- 6) Dilakukan sortasi kering dengan cara pemilihan daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) dari bahan yang rusak atau terkena kotoran.
- 7) Diperhalus daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) dengan menggunakan blender menjadi serbuk kering.
- 8) Diayak daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) yang sudah halus menggunakan ayakan No. 44.

b. Diekstraksi Daun Semak Merdeka dengan Penyari Etanol 70% dan Etanol 96%

- 1) Disiapkan wadah yaitu bejana yang digunakan untuk maserasi.
- 2) Ditimbang serbuk kering daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) sebanyak 300 gram pada neraca analitik, dimasukkan ke dalam wadah.

- 3) Ditambahkan 2100 mL etanol 70% atau etanol 96% sehingga semua daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) terendam larutan tersebut dan diamkan selama 72 jam dan diaduk setiap 24 jam.
- 4) Disaring menggunakan kertas saring dan dipisahkan antara hasil saringan dan endapan.
- 5) Direndam kembali endapan tersebut dengan 1050 mL etanol 70% atau etanol 96% selama 48 jam dan diaduk setiap 24 jam lalu dilakukan kembali pengulangan.
- 6) Disaring kembali, dan dicampurkan semua maserat yang diperoleh.
- 7) Dikumpulkan dan diuapkan semua maserat dengan *rotary evaporator* IKA RV 8, hingga diperoleh ekstrak kental.

c. Dilakukan Skrining Fitokimia

1) Uji alkaloid

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,5 g, ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air suling, lalu dipanaskan diatas tangas air selama 2 menit, dinginkan lalu saring. Filtrat digunakan untuk percobaan berikut :

- a) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer akan menghasilkan endapan putih/kuning.
- b) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat akan menghasilkan endapan coklat hitam.
- c) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendrof akan menghasilkan endapan merah bata. Apabila terdapat endapan putih paling sedikit 2 atau 3 dari pengujian di atas, maka simplisia dinyatakan mengandung alkaloid.

2) Uji flavonoida

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,5 g, ditambahkan dengan 10 mL air panas. Kemudian didihkan campuran kurang lebih 5 menit, kemudian disaring ketika panas. Sebanyak 5 mL filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk Mg, 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol, dikocok, dan

biarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol.

3) Uji saponin

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,5 g, dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air suling panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, terbentuk buih yang selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Kemudian ditambahkan 1 tetes HCl 2N. Apabila pada penambahan 1 tetes larutan HCl 2N buih tidak hilang, menunjukkan adanya saponin.

4) Uji steroid / terpenoida

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,5 g, dimaserasi dengan 20 mL n-heksan selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap. Pada sisa ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Senyawa steroid ditunjukkan dengan warna ungu atau merah, dan senyawa terpenoid ditunjukkan dengan warna hijau biru

5) Uji fenolik dan tanin

Diambil ekstrak sebanyak 1 gram ditambah 10 mL air panas, kocok, ditambahkan 5 tetes NaCl 10%, lalu disaring. Filtrat dibagi menjadi 2 pada tabung reaksi. Tabung reaksi pertama ditambahkan larutan FeCl_3 , diamati. Jika warna larutan berubah menjadi warna hijau kebiruan atau biru gelap, menunjukkan adanya senyawa fenolik. Tabung reaksi kedua ditambahkan gelatin 1%, diamati. Senyawa tanin ditunjukkan dengan terbentuknya endapan.

d. Dilakukan Pewarnaan Gram

- 1) Dibersihkan kaca objek dengan cara dilap searah dengan kapas alkohol 70%.
- 2) Diberi tanda pada kaca objek bagian belakang menggunakan spidol.
- 3) Ditetaskan NaCl 0,9% pada kaca objek.
- 4) Dipijarkan ose menggunakan lampu spiritus, kemudian diambil bakteri dari tabung 1 mata ose, lalu diratakan bagian depan kaca objek yang telah diberi tanda. Ose yang telah digunakan dipijarkan lagi.

- 5) Difiksasi kaca objek pada hawa panas lampu spirtus hingga sampel kering kemudian dibiarkan hingga dingin.
- 6) Ditetaskan gram A (violet) pada sampel ditunggu hingga 2 menit lalu dibilas dengan air mengalir pada kaca objek
- 7) Ditetaskan gram B (lugol) pada sampel, ditunggu hingga 1 menit lalu dibilas dengan air mengalir pada kaca objek.
- 8) Ditetaskan gram C (alkohol 96%) pada sampel ditunggu hingga 30 detik lalu bilas dengan air pada kaca objek.
- 9) Ditetaskan gram D (safranin) pada sampel, ditunggu hingga 30 detik lalu bilas dengan air mengalir pada kaca objek, lalu dikeringkan kaca objek.
- 10) Diamati sampel menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali dengan ditetesi minyak anisol.

e. Disterilisasi Alat

Semua alat yang terbuat dari kaca dicuci bersih dan dikeringkan, setelah itu dibungkus dengan kertas buram. Sterilisasi dilakukan dengan oven pada suhu 160°C selama 1 jam, sedangkan jarum ose dan pinset yang berbahan logam disterilkan dengan cara pemijaran. Untuk bahan seperti media dan aquadest setelah dilarutkan, lalu dimasukkan ke dalam erlemeyer, ditutup dengan kapas dan alumunium foil, lalu dimasukkan ke dalam autoklaf dan disterilkan pada suhu 121°C (tekanan 1 atm) selama 15 menit.

f. Dibuat Larutan Uji

- 1) Ekstrak yang didapat dari daun semak merdeka (*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) yang sudah diuapkan berupa ekstrak kental dianggap sebagai ekstrak dengan konsentrasi 100% sebagai larutan induk.
- 2) Dari larutan induk tersebut diencerkan menjadi konsentrasi 5%, 10%, dan 15% dengan Dimetil Sulfoksida (DMSO) sebagai pelarutnya.
- 3) Pengenceran konsentrasi 5%, 10%, dan 15% digunakan metode pengenceran bertingkat menggunakan rumus:

$$V_1 \cdot \%_1 = V_2 \cdot \%_2$$

Keterangan :

V_1 : Jumlah volume yang digunakan (mL)

V_2 : Jumlah volume yang diinginkan (mL)

$\%_1$: Konsentrasi yang tersedia (%)

$\%_2$: Konsentrasi yang akan dibuat (%)

g. Dibuat Media Mueller Hinton Agar (MHA)

Ditimbang *Mueller Hinton Agar* sebanyak 10,2 gram dalam 300 mL aquadest kemudian dipanaskan pada hot plate hingga larut kemudian ditutup dengan kapas yang dibungkus *aluminium foil*, lalu disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, dan dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 45°C-50°C kemudian dituangkan kedalam cawan petri.

h. Dibuat Nutrient Agar Slant (NAS)

Ditimbang *Nutrient Agar* sebanyak 1 gram dalam 50 mL aquadest kemudian, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas yang dibungkus *aluminium foil*, lalu disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, dan dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 40°C-45°C kemudian dimiringkan.

i. Dibuat Nutrient Broth (NB)

Ditimbang *Nutrient Broth* sebanyak 0,32 gram, dimasukkan *Nutrient Broth* ke dalam *beaker glass*, ditambahkan 40 mL aquadest lalu dipanaskan pada *hot plate* hingga larut, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas yang dibungkus *aluminium foil*, lalu disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, dan dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 40°C-45°C.

j. Dibuat NaCl 0,9%

Ditimbang sebanyak 0,45 gram NaCl kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL, ditambahkan dengan aquadest hingga 50 mL

lalu dihomogenkan. Larutan NaCl dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL, lalu ditutup dengan menggunakan kapas dan *aluminium foil* kemudian disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm.

k. Dibuat Standar Mac Farland 0,5

H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 mL dicampurkan dengan larutan BaCl 1% sebanyak 0,05 mL, lalu dihomogen. Sebelum digunakan kocok terlebih dahulu agar larutan homogen.

l. Dibuat Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil dua mata ose biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang telah diremajakan pada media *Nutrient Agar Slant* (NAS) diremajakan kembali ke dalam tabung berisi 5 mL media *Nutrient Broth* (NB) kemudian kocok hingga homogen dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri tersebut kekeruhannya dibandingkan dengan larutan standar Mc Farland 0,5 apabila suspensi bakteri keruh maka ditambahkan NaCl 0,9% steril, jika kurang keruh ditambahkan bakteri hingga kekeruhannya sama dengan standar Mc Farland 0,5.

m. Dilakukan Pengujian Aktivitas dan Efektivitas Antibakteri

- 1) Disiapkan Alat dan bahan yang akan digunakan.
- 2) Dimasukkan lidi kapas steril ke suspensi bakteri yang sudah disamakan kekeruhannya dengan standar Mc Farland 0,5 selama 10-15 detik.
- 3) Diangkat dan diperas lidi kapas dengan cara ditekan pada dinding bagian dalam tabung sambil diputar-putar.
- 4) Dipulaskan lidi kapas pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) sampai merata.
- 5) Dibiarkan media yang telah dipulaskan selama 15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam media.
- 6) Dilakukan penempelan disk kontrol positif dan disk kontrol negatif, disk ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% dengan konsentrasi

5%, 10%, 15% di atas pulasan bakteri pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) menggunakan pinset steril dengan cara ditekan satu persatu supaya disk cakram menempel dengan baik pada media, lalu diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37° C selama 24 jam.

7) Dilakukan pengamatan zona hambat pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) pada setiap disk yang ditandai dengan adanya daerah bening, lalu diukur menggunakan alat ukur jangka sorong digital dengan satuan millimeter (mm).

E. Pengolahan dan Analisis Data

Data-data hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel hasil penelitian berupa diameter zona hambat dalam satuan millimeter (mm) pada masing-masing konsentrasi. Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antara ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dilakukan uji statistik One Way ANOVA (*Analysis of Varians*). Apabila terdapat perbedaan nyata, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada tingkat kesalahan 5% untuk menentukan perlakuan-perlakuan yang mana berbeda dengan yang lain.

Setelah dilakukan uji statistik, maka dilakukan analisis aktivitas dan efektivitas antibakteri dari masing-masing subjek penelitian. Analisis dilakukan dengan melihat hasil uji statistik. Hasil dapat disimpulkan memiliki aktivitas antibakteri bila rata-rata zona hambat lebih besar dari kontrol negatif dan terdapat perbedaan makna. Dikatakan efektif bila rata-rata zona hambat sama atau lebih besar dari kontrol positif dan terdapat perbedaan makna.