

BAB III METODELOGI PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian yang bersifat eksperimental di laboratorium dengan lima kelompok perlakuan, yaitu: tiga variasi konsentrasi ekstrak etanol 96% dengan konsentrasi 50%, 75%, 100% dan dua kelompok kontrol, yaitu: kontrol positif (Kloramfenikol 30 µg) dan kontrol negatif (aquadest). Variabel bebas adalah konsentrasi ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) dan variabel terikatnya yaitu zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus*. Pengulangan pada penelitian ini adalah (Hanafiah, 1997:6) :

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 15+4$$

$$r \geq 4,75$$

$$r = 5$$

Keterangan :

r = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

15 = tetapan yang telah ditentukan

B. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) yang disari menggunakan etanol 96% dengan konsentrasi 50%, 75%, dan 100%.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Mikrobiologi, Kimia, dan Steril Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan

Tanjungkang. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Maret sampai dengan bulan Juni tahun 2022.

D. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, gelas ukur 100 ml, beaker glass 500 ml, beaker glass 100 ml, labu ukur 10 ml, tabung reaksi, Erlenmeyer 100 ml dan 250 ml, kaca arloji, *cover glass*, batang pengaduk, oven, autoklaf, inkubator, cawan petridish, cawan porselen, *hot plate*, lampu spiritus, blender, ose, pinset, corong gelas, spatula, jangka sorong, *rotary evaporator*, spidol, pipet tetes, pipet volume 1 ml dan 2 ml.

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.), 5000 ml etanol 96%, aquadest, 1 gram *Nutrient Agar* (NA), 0,16 gram *Nutrient Broth* (NB), 10,2 gram *Muller Hinton Agar* (MHA), 10 ml H₂SO₄ 1%, 1 ml BaCl₂ 1%, 50 ml NaCl 0,9% steril, 2 ml HCl 2N, 1 ml Pereaksi Meyer, 1 ml Pereaksi Bouchardat, 1 ml Pereaksi Dragendrof, 100 mg Serbuk Mg, 1 ml HCl (P), 2 ml amil alkohol, 20 ml n-Heksan, 1 ml asam asetat anhidrat, a ml H₂SO₄ (P), dan 1 ml FeCl₃, *aluminium foil*, kapas steril, 5 disk kloramfenikol 30µg, 20 disk kosong, kertas tempel, kertas saring, dan kertas buram.

2. Prosedur Kerja Penelitian

a. Determinasi Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.)

Determinasi daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik dengan cara mengamati sampel daun bandotan yang diambil di Kecamatan Sungkai Utara dan membandingkannya dengan literatur *Materia Medika Indonesia* jilid 5.

b. Pembuatan Simplisia Daun Bandotan

1) Diambil daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) segar yang sudah diidentifikasi morfologinya berdasarkan literatur (*Materia Medika Indonesia*

jilid 5). Daun bandotan didapatkan di daerah Kecamatan Sungkai Utara, Lampung Utara. Daun yang diambil adalah daun yang masih berwarna hijau dan dipastikan bahwa yang dipetik adalah daunnya tanpa tangkai daun.

- 2) Dilakukan sortasi basah dengan memisahkan daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) dari kotoran dan bahan asing lain seperti batang dan tangkai.
- 3) Dicuci bersih daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) menggunakan air mengalir.
- 4) Dilakukan perajangan daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) untuk memperkecil ukurannya.
- 5) Diletakkan daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) di atas nampan *stainless* atau nampan dari anyaman bambu, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan (tidak terkena sinar matahari langsung).
- 6) Dilakukan sortasi kering dengan cara memisahkan daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) dari bahan yang rusak atau terkena kotoran.
- 7) Diperhalus daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) dengan menggunakan blender menjadi serbuk kering.

c. Pembuatan Ekstrak daun bandotan dengan Penyari Etanol 96%

- 1) Disiapkan wadah yaitu bejana berbahan kaca yang digunakan untuk maserasi.
- 2) Ditimbang serbuk kering daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) sebanyak 500 gram pada neraca analitik, dimasukkan ke dalam wadah.
- 3) Ditambahkan 3500 ml etanol 96% sehingga semua daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) terendam pelarut tersebut dan didiamkan selama 72 jam dan diaduk setiap 24 jam.
- 4) Disaring menggunakan kertas saring dan dipisahkan antara hasil ekstrak yang telah disaring dan ampasnya.
- 5) Direndam kembali ampas tersebut dengan 1500 ml etanol 96% selama 48 jam dan diaduk setiap 24 jam. Remaserasi tersebut dilakukan sebanyak satu kali.
- 6) Disaring kembali dan dicampurkan semua maserat yang diperoleh.

7) Dikumpulkan dan diuapkan semua maserat dengan *rotary evaporator* Dlab XZ217AR0000006 lalu dilanjutkan penguapan dengan cawan porselen di atas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental.

d. Skrining Fitokimia

1) Uji Alkaloid

Ditimbang serbuk simplisia sebanyak 0,5 gram, ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling, lalu dipanaskan di atas 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 paling sedikit 2 atau 3 dari pengujian di atas, maka simplisia dinyatakan mengandung alkaloid.

2) Uji Flavonoida

Ditimbang serbuk simplisia sebanyak 10 g, ditambahkan dengan 100 ml air panas. Kemudian dididihkan campuran selama kurang lebih 5 menit, lalu 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, atau jingga pada lapisan amil alkohol.

3) Uji Saponin

Ditimbang serbuk simplisia sebanyak 0,5 g, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air suling panas, didinginkan kemudian dikocok dengan kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa yang selama tidak kurang dari 10 menit dan setinggi 1-10 cm. Lalu ditambahkan 1 tetes HCl 2N. Apabila pada penambahan 1 tetes larutan HCl 2N buih tidak hilang, menunjukkan adanya saponin.

4) Uji Steroid/Terpenoida

Ditimbang serbuk simplisia sebanyak 1 g, dimaserasi dengan 20 ml n-heksan selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap. Pada sisa filtrat ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Adanya senyawa steroid ditunjukkan dengan warna ungu atau merah, dan adanya senyawa terpenoid ditunjukkan dengan warna hijau biru.

5) Uji Tanin

Diambil serbuk simplisia sebanyak 0,5 gram lalu diekstrak dengan 10 ml aquadest. Hasil ekstraksi disaring kemudian filtrat yang diperoleh diencerkan dengan aquadest sampai tidak berwarna. Hasil pengenceran ini diambil sebanyak 2 ml, kemudian ditambahkan dengan 1-2 tetes besi (III) klorida. Terjadi warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

e. 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 sebanyak 2-3 mata ose, lalu diratakan di bagian depan kaca objek yang telah diberi tanda. Ose yang telah digunakan dipijarkan lagi.
- 5) Difiksasi kaca objek pada hawa panas lampu spiritus 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 kemudian dibilas dengan air mengalir pada kaca objek, lalu dikeringkan kaca objek.

- 10) Diamati sampel di bawah mikroskop dengan lensa objektif mulai dari yang berkekuatan rendah dengan ditetesi minyak anisol.

f. Sterilisasi Alat

Semua alat yang terbuat dari kaca dicuci bersih dan dikeringkan. Setelah itu, dibungkus dengan kertas buram. Sterilisasi alat non volumetrik yang terbuat dari kaca dilakukan dengan oven pada suhu 160°C selama 1 jam. Sedangkan, untuk jarum ose dan pinset yang berbahan logam disterilkan dengan cara pemijaran. Untuk aquadest dan media yang telah dilarutkan, dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditutup dengan kapas dan alumunium foil, kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dan disterilkan pada suhu 121°C (tekanan 1 atm) selama 15 menit.

g. Pembuatan Larutan Uji

- 1) Ekstrak yang didapat dari daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) yang sudah diuapkan berupa ekstrak kental dianggap sebagai ekstrak dengan konsentrasi 100% sebagai larutan induk dan juga larutan uji.
- 2) Dari larutan induk tersebut diencerkan menjadi konsentrasi 50%, 75%, dengan aquadest sebagai pelarutnya.
- 3) Pengenceran konsentrasi 50% dan 75% digunakan metode pengenceran dengan menggunakan rumus:

$$n = \% \times V$$

Keterangan :

n : Banyaknya ekstrak kental yang diambil (gram)

% : Konsentrasi yang akan dibuat (% b/v)

V : Jumlah volume yang akan dibuat (ml)

h. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Ditimbang *Mueller Hinton Agar* sebanyak 10,2 gram. Lalu, dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambahkan 300 ml aquadest, dan dipanaskan pada *hot plate* hingga larut. Kemudian, ditutup dengan kapas yang dibungkus alumunium foil dan disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit

pada tekanan 1 atm. Dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 45°C-50°C kemudian dituangkan ke dalam cawan petri.

i. Pembuatan *Nutrient Agar Slant* (NAS)

Ditimbang *Nutrient Agar* sebanyak 1 gram, dimasukkan ke dalam *beaker glass*, dan ditambahkan 50 ml aquadest. Kemudian, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut dan 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. Dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 40°C-45°C kemudian dimiringkan.

j. Pembuatan *Nutrient Broth* (NB)

Ditimbang *Nutrient Broth* sebanyak 0,16 gram. Dimasukkan *Nutrient Broth* ke dalam *beaker glass*, ditambahkan 20 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.

k. Pembuatan Standar Mac Farland 0,5

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

l. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil dua mata ose biakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah diremajakan pada media *Nutrient Agar Slant* (NAS) lalu 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. Disiapkan larutan NaCl 0,9% steril lalu ditambahkan biakan bakteri yang diremajakan pada media *Nutrient Broth* (NB). Suspensi bakteri tersebut kekeruhannya dibandingkan dengan larutan standar Mc Farland 0,5. Apabila suspensi bakteri terlalu keruh maka ditambahkan NaCl 0,9% steril, jika kurang keruh maka ditambahkan biakan bakteri dari media *Nutrient Broth* (NB) hingga kekeruhannya sama dengan standar Mc Farland 0,5 lalu diinkubasi selama 4 jam dengan suhu 37°C.

m. 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 Mac 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) Direndam disk kosong dengan larutan uji selama 15 menit pada masing-masing konsentrasi seri pengenceran 50%, 75%, dan 100%, juga pada aquadest steril sebagai kontrol negatif.
- 7) Dilakukan penempelan disk kontrol positif (Kloramfenikol 30 µg), disk kontrol negatif (aquadest), dan disk ekstrak etanol 96% daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) dengan konsentrasi 50%, 75%, 100% 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.
- 8) Dilakukan pengamatan zona hambat pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) dari setiap disk yang ditandai dengan adanya daerah bening, lalu diukur menggunakan alat ukur jangka sorong dengan satuan milimeter (mm).

E. Pengolahan dan Analisis Data

Data-data hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel hasil penelitian berupa diameter zona hambat dalam satuan milimeter (mm) pada masing-masing variasi konsentrasi sampel, kontrol negatif, dan juga kontrol positif. Setelah didapatkan data, maka dilakukan analisis aktivitas dan efektivitas antibakteri dari masing-masing subjek penelitian. Analisis ada atau tidaknya aktivitas antibakteri dari sampel dilakukan dengan mengamati ada atau tidaknya zona hambat atau zona bening di sekitar disk. Jika terdapat zona

hambat atau zona bening, maka dapat dikatakan bahwa sampel memiliki aktivitas antibakteri. Analisis efektivitas antibakteri sampel dilakukan dengan membandingkan hasil rata-rata zona hambat sampel dengan rata-rata zona hambat kontrol positif (kloramfenikol 30 µg). Jika hasil dari rata-rata zona hambat sampel lebih dari atau sama dengan rata-rata zona hambat kontrol positif, maka dapat dikatakan bahwa sampel efektif sebagai antibakteri.

Untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara variasi konsentrasi dari ekstrak etanol 96% daun bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* 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 mana yang berbeda dengan yang lain.