

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen semu.

B. Lokasi dan Waktu

1. Lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia, dan Laboratorium Mikrobiologi di Program Studi D-III Farmasi, Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian :

Penelitian dilakukan pada bulan April 2026.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Tanaman daun pohon kayu jawa (*Lannea coromandalica* (Houtt Merr)) yang diambil di daerah Kecamatan Kambera, Sumba Timur.

2. Sampel

Daun pohon kayu jawa (*Lannea coromandalica* (Houtt Merr)) yang berwarna hijau tua dan masih segar, di mana daun ini diambil di Kecamatan Kambera Sumba Timur.

3. Teknik sampling

Tenik sampling yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mengambil daun yang tidak terlalu muda dan terlalu tua, kira-kira daun ke-5 sampai ke-8 dari ujung atau pucuk.

4. Kontrol positif

Kontrol positif dalam penelitian ini menggunakan kloramfenikol dengan konsentrasi 30 µg/ml.

5. Kontrol negatif

Kontrol negatif pada penelitian ini menggunakan akuades steril yang telah melalui proses distilasi atau penyulingan.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Ekstrak etanol daun pohon kayu jawa dengan konsentrasi 1,6%, 3,2%, 6,4%.

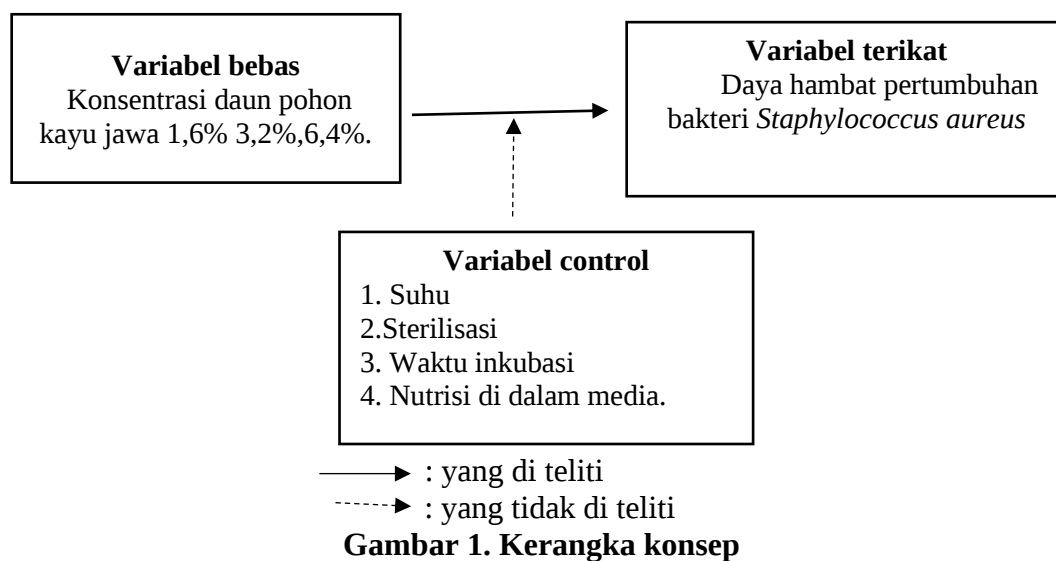
2. Variabel terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang di pengaruhi oleh variabel bebas daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus*.

3. Variabel control

Merupakan variabel yang turut mempengaruhi variabel terikat, selain variabel bebas sehingga perlu di kendalikan oleh peneliti. Dalam penelitian ini yang menjadi variabel kontrol yaitu suhu, sterilisasi, waktu inkubasi, dan nutrisi didalam media.

E. Kerangka Konsep



F. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi operasional	Cara pengukuran	Alat ukur	Skala
1	Ekstrak etanol daun pohon kayu jawa (<i>Lannea coromandalica</i>) dengan berbagai konsentrasi yang diperoleh dari proses maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%.	daun pohon kayu jawa (<i>Lannea coromandalica</i>) dengan berbagai konsentrasi yang diperoleh dari proses maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%.	Observasi	Gelas ukur	Ordinal
2	Pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i>	Bakteri uji yang digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri.			Nominal
3	Zona hambat	Diameter area tdk ditumbuhi <i>staphylococcus aureus</i> di sekitar cakram ditandai zona bening	Observasi	Jangka sorong	Rasio

G. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, rak dan tabung reaksi (pyrex), gelas ukur (Iwaki), pembakar bunsen, incubator, autoklaf, jarum ose, kaca objek, pipet tetes, pinset steril, kapas lidi steril, tabung erlenmeyer, neraca analitik, loyang aluminium, blender, toples kaca, aluminium foil, jangka sorong, sendok, saringan tepung, labu ekstraktor, mikro pipet volume, pipet volume.

2. Bahan.

Bahan yang digunakan pada penelitian adalah daun pohon kayu jawa (*Lannea coromandalica*), etanol 70%, bakteri *staphylococcus aureus*, kristal violet, media natrium agar, muellet hinton agar (MHA), NaCl 0,9%, hydrogen peroksida (H_2O_2), kalium dikromat ($K_2Cr_2O_2$), asam sulfat pekat (H_2SO_4), reagen $FeCl_3$, iodine, safranin, minyak atsiri, akuades, reagen meyer, mannitol salt agar, $BaCl_2 \cdot 2H_2O$.

3. Sterilisasi alat

Alat yang akan digunakan dalam proses penelitian harus disterilkan terlebih dahulu, peralatan kaca seperti gelas ukur, cawan petri, disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu $121^{\circ}C$ selama 15 menit, dengan cara yang sama media juga dapat di sterilkan. Sedangkan peralatan logam seperti ose akan dipijarkan diatas api bunsen. Peralatan plastik seperti pipet tetes di sterilkan dengan menggunakan etanol 70%.

4. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun pohon kayu jawa terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

a. Persiapan mikroba uji

Persiapan mikroba uji merupakan langkah penting dalam penelitian mikrobiologi. Tujuan Persiapan mikroba uji adalah untuk mendapatkan mikroba yang sehat, aktif, dan bebas kontaminan, sehingga dapat digunakan untuk penelitian yang akurat dan valid.

- 1) Siapkan kultur murni bakteri uji.
- 2) Siapkan serangkaian larutan standar.
- 3) Buat 2 tabung 10 ml suspensi bakteri uji menggunakan media BPW dan samakan kekeruhannya dengan larutan standar Mac Farland II (konsentrasi mikroba 6.10^8 CFU/ml).

b. Pembuatan media uji

Sebanyak 38 gram media dilarutkan dalam 1000 mL akuades, kemudian dipanaskan hingga mendidih selama ± 1 menit sampai tercampur homogen. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam tabung atau botol dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi, media dibiarkan hingga suhunya menurun sekitar $40\text{--}45^\circ\text{C}$, lalu dituangkan ke dalam cawan petri. Mikroorganisme kemudian diinokulasikan ke dalam cawan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

c. Pembuatan *McFarland* 0,5 standard

Pembuatan standar *McFarland* 0,5 dilakukan sesuai pedoman CLSI dengan volume akhir 10 mL. Tahap awal diawali dengan penyiapan reagen

berupa larutan $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan H_2SO_4 . Sebanyak 9,95 mL larutan H_2SO_4 1% dipipet terlebih dahulu ke dalam tabung reaksi kaca, kemudian ditambahkan 0,05 mL larutan $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ menggunakan mikropipet. Tabung reaksi selanjutnya ditutup dan dihomogenkan menggunakan vortex atau magnetic stirrer hingga tercampur sempurna. Setelah larutan homogen, akan terbentuk kekeruhan yang setara dengan standar *McFarland* 0,5, yaitu sebanding dengan konsentrasi bakteri sekitar $1,0 - 2,0 \times 10^8$ CFU/mL.

d. Pembuatan suspensi bakteri

Sampel bakteri terlebih dahulu ditumbuhkan pada media Nutrient Agar (NA) masing-masing, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16–18 jam. Koloni bakteri selanjutnya diambil sebanyak 1–2 ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9% di dalam tabung reaksi. Suspensi tersebut kemudian disesuaikan tingkat kekeruhannya dengan standar 0,5 *McFarland*, yang setara dengan jumlah bakteri sekitar 10^8 CFU/mL. Penyesuaian kekeruhan dilakukan dengan membandingkan suspensi terhadap standar *McFarland* 0,5 menggunakan latar belakang kartu Wickerham. Jumlah bakteri yang memenuhi persyaratan untuk uji kepekaan berada pada kisaran $10^5 - 10^8$ CFU/mL.

e. Pembuatan media peremajaan bakteri

Media untuk peremajaan bakteri disiapkan dengan menimbang 20 gram Nutrient Agar, kemudian dilarutkan dalam 1000 mL akuades steril. Larutan

dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih agar media larut sempurna. Selanjutnya, media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu didinginkan hingga mencapai suhu hangat sekitar 45–50°C. Setelah itu, media dihomogenkan, dituangkan sebanyak 25 mL ke dalam cawan petri, dan dibiarkan hingga memadat.

f. Uji aktivitas antibakteri

Pengaruh serbuk daun kayu jawa terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* diketahui melalui pengamatan zona hambat yang terbentuk. Pengamatan dilakukan dengan melihat serta mengukur daerah bening yang muncul sebagai zona hambat aktivitas daun kayu jawa terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (Pagarra *et al.*, 2022).

2. Skrinning fitokimia

a. Uji alkaloid

Pengujian alkaloid dilakukan menggunakan metode Wagner dengan menambahkan 4 mL sampel berupa air rebusan daun kayu jawa (*Lannea coromandelica*), kemudian ditetesi 4 tetes pereaksi Wagner. Terbentuknya endapan setelah penambahan pereaksi tersebut menunjukkan hasil positif, yang menandakan adanya senyawa alkaloid dalam sampel (Fadliah *et al.*, 2018.).

b. Uji saponin

Pengujian saponin dilakukan menggunakan metode Forth dengan cara memasukkan 4 mL sampel berupa air rebusan daun kayu jawa (*Lannea*

coromandelica) ke dalam tabung reaksi, kemudian dipanaskan selama 2–3 menit. Setelah didinginkan, sampel dikocok selama 30 detik dan perubahan yang terjadi diamati. Terbentuknya busa yang stabil dan tidak hilang selama 30 detik menunjukkan hasil positif, yang menandakan adanya senyawa saponin dalam sampel (Fadliah *et al.*, 2018.).

c. Uji flavonoid

Pengujian flavonoid dilakukan dengan memanaskan 5 mL air rebusan daun kayu jawa (*Lannea coromandelica*) selama 5 menit, kemudian ditambahkan 2–4 tetes HCl pekat dan 0,2 gram serbuk magnesium (Mg). Perubahan warna sampel menjadi merah tua menunjukkan hasil positif, yang menandakan adanya senyawa flavonoid (Fadliah *et al.*, 2018.).

d. Uji polifenol tanin

Uji polifenol dan tanin dilakukan dengan mengambil 2 ml air rebusan daun kayu jawa (*Lannea coromandelica* (Houtt Merr)), kemudian ditambahkan 2–3 tetes larutan FeCl_3 1%. Perubahan warna sampel menjadi hitam kebiruan atau hijau kehitaman menandakan adanya kandungan polifenol dan tanin (Fadliah *et al.*, 2018.).

H. Analisis Data

mengenai diameter zona hambat dianalisis secara eksperimen (hanya zona hambat bakteri yang dianalisis).