

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 1.1. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental, yaitu menguji antibakteri dari ekstrak metanol daun ramania (*B. macrophylla* Griffith) terhadap bakteri *E.coli* dengan metode difusi sumuran.

Pada penelitian ini meliputi pengumpulan bahan tanaman, determinasi bahan tanaman, pembuatan simplisia, pembuatan ekstrak metanol dari simplisia secara maserasi, skrining fitokimia, pembuatan konsentrasi hingga selanjutnya pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi sumuran menggunakan media agar.

- a. Konsentrasi 1 ( $C_1$ ) = 1,024 mg/ml
- b. Konsentrasi 2 ( $C_2$ ) = 2,048 mg/ml
- c. Konsentrasi 3 ( $C_3$ ) = 4,096 mg/ml
- d. Konsentrasi 4 ( $C_4$ ) = 8,192 mg/ml
- e. Konsentrasi 5 ( $C_5$ ) = 16,384 mg/ml
- f. Konsentrasi 6 ( $C_6$ ) = 32,760 mg/ml
- g. Kontrol positif = *Ciprofloxacin* 5 $\mu$ g/disk
- h. Kontrol negatif (K-) = Na-CMC 0,5%
- i. Perhitungan untuk pengulangan digunakan rumus sebagai berikut (Nabila et al., 2021).

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

Dimana n = Jumlah minimal pengulangan

t = Jumlah kelompok

Perhitungan jumlah minimal pengulangan :

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

$$(n-1) (7-1) \geq 15$$

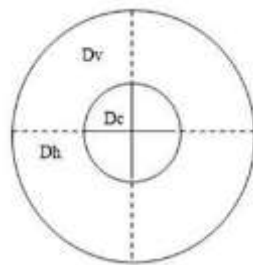
$$(n-1) 6 \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$n \geq 3,5$$

$$n = 4$$

j. Perhitungan Zona Hambat



$$\text{zona hambat} = \frac{(Dv - Dc) + (Dh - Dc)}{2}$$

Dimana :

Dv : Diameter ventrikel zona bening

Dh : Diameter horizontal zona bening

Dc : Diameter sumuran

## 1.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi STIKES Borneo Lestari Banjarbaru, Kalimantan Selatan pada bulan Desember 2021.

### **1.3. Variabel Penelitian**

Variabel penelitian terdiri dari atas dua macam, yaitu variabel terikat (*dependent variable*) dan variabel bebas (*independent variable*).

#### **1.3.1. Variabel Bebas (Independent variable)**

Variabel bebas (*independent variable*) sebagai variable eksperimen yang karakteristiknya diyakini dapat menghasilkan perbedaan (Sevilla, 2008). Yaitu seperti variasi konsentrasi ekstrak metanol daun ramania (*B. macrophylla* Griffith), Ciprofloxacin  $5\mu\text{g}/\text{disk}$  dengan kontrol positifnya dan kontrol negatifnya Na-CMC 0,5 %.

#### **1.3.2. Variabel Terikat (dependent variable)**

Variabel terikat (*dependent variable*) sebagai variable standar (*Criterion variable*) yang merupakan hasil dari penelitian (Sevilla, 2008) variabel terikat pada penelitian ini adalah zona hambat terhadap bakteri *E. coli*.

### **1.4. Alat Dan Bahan**

#### **1.4.1. Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini, antara lain yaitu Alat pemotong (pisau, gunting, cutter), Blender, Erlenmeyer, corong

kaca, gelas Beker, gelas ukur, Aluminium foil, *rotary evaporator*, *waterbath*, batang pengaduk, neraca analitik, tabung reaksi, pipet tetes, Mikropipet, Cawan porselin, Kapas, autoklaf, Bunsen, penjepit tabung, Ose, Inkubator, tisu, Cawan Petri, pengayak Mesh 40, jangka sorong, penggaris, spatula, Termometer, *vortex, magnetic stirrer*, micropipet dan pelubang sumuran.

#### **1.4.2. Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain yaitu Daun ramania (*B. macrophylla* Griffith) yang sudah diproses menjadi ekstrak, pelarut metanol, biakan *E. coli*, Ciprofloxacin 5µg/disk, Na-CMC 0,5%, media MHA (Mueller Hinton Agar), media NA (Nutrient Agar), NaCl, aquadest, HCL 2N, HCL (p), Amil alkohol, asam klorida (HCL), magnesium (Mg), asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), FeCl<sub>3</sub> 10%, MC Farland 0,5, pereaksi mayer, pereaksi wagner, pereaksi Dragendroff dan asam asetat anhidrat.

### **1.5. Metode Penelitian**

#### **1.5.1. Pengambilan Sampel**

Tumbuhan ramania (*B. macrophylla* Griffith) diperoleh dari daerah Astambul, Kabupaten Banjar, Kalimantan selatan. Bagian tumbuhan diambil adanya daunnya, sebanyak 2 kg daun ramania (*B. macrophylla* Griffith) diambil pada bulan Maret 2022.

### 1.5.2. Determinasi Tumbuhan *Ramania (B. macrophylla Griffith)*

Tumbuhan *Ramania* yang terdiri dari batang, daun dan buah kemudian di determinasi di Laboratorium FMIPA Universitas Lambung Mangkurat guna memastikan bahwa tanaman yang digunakan sesuai dan agar tidak terjadi kesalahan saat pengambilan sampel penelitian.

### 1.5.3. Pembuatan Sampel Tumbuhan *Ramania (B. macrophylla Griffith)*

Pengolahan bahan dilakukan dengan memisahkan daun dari tangkai, batang, dan akar, lalu dibersihkan dari sisa-sisa tanah dan kotoran kemudian dicuci dengan air yang bersih dan mengalir. Daun *ramania* yang diperoleh dari desa astambul kalimantan selatan sebanyak 2 kg lalu digunting atau dicacah kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C. Daun *ramania* yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan blender sehingga didapatkan serbuk halus dari daun *ramania* setelah itu diayak menggunakan ayakan 40 mesh (Roni, 2019).

Perhitungan % randemen simplisia :

$$\% \text{ Randemen Simplisia} = \frac{\text{Bobot simplisia}}{\text{Bobot Bahan awal}} \times 100\%$$

### 1.5.4. Pembuatan Ekstrak Metanol Tumbuhan *Ramania (B. macrophylla Griffith)*

Serbuk daun *ramania* ditimbang sebanyak 210 g, kemudian dimaserasi dengan rasio (1:5). Serbuk daun *ramania* direndam dengan

metanol 3 L. Serbuk daun ramania dimaserasi selama 3x24 jam sambil diaduk sesekali (Djumaati dkk, 2018). Lakukan maserasi selama 3x24 jam dan dipisahkan maserat dengan menggunakan corong *Bouchner* yang telah dilapisi kertas saring. Filtrat kemudian di evaporasi menggunakan rotary evaporator dengan suhu maksimal 50°C kemudian dipekatkan dengan waterbath sampai diperoleh ekstrak kental (Dewiyeti, 2015).

Perhitungan % rendemen

$$\% \text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{jumlah berat ekstrak berupa pasta}}{\text{jumlah berat simplisia}} \times 100\%$$

#### **1.5.5. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Metanol Tumbuhan Ramania (*B. macrophylla* Griffith)**

Variasi konsentrasi ekstrak metanol daun ramania yang digunakan variasi bertingkat dengan 6 tingkat konsentrasi 1,024 mg/ml, 2,048 mg/ml, 4,096 mg/ml, 8,192 mg/ml 16,384 mg/ml, dan 32,760 mg/ml. Dengan menimbang ekstrak satu-satu lalu dimasukkan ke dalam vial 10 ml kemudian diencerkan dengan menggunakan larutan CMC 0,5% ad 10 ml hingga diperoleh volume larutan pada konsentrasi 1,024 mg/ml, 2,048 mg/ml, 4,096 mg/ml, 8,192 mg/ml 16,384 mg/ml, dan 32,760 mg/ml dengan cara yang sama (Indriani dkk, 2019).

Berikut cara pembuatan variasi ekstrak :

- Pembuatan konsentrasi 32,760 mg/mL

Pembuatan konsentrasi 32,760 mg/ml ditimbang lalu dimasukkan ke dalam vial kemudian dilarutkan dengan menggunakan larutan Na-CMC 0,5%.

- Pembuatan 16,384 mg/mL

Pembuatan konsentrasi 16,384 mg/ml ditimbang lalu dimasukkan ke dalam vial kemudian dilarutkan dengan menggunakan larutan Na-CMC 0,5%

- Pembuatan konsentrasi 8,192 mg/ml

Pembuatan konsentrasi 8,192 mg/ml ditimbang lalu dimasukkan ke dalam vial kemudian dilarutkan dengan menggunakan larutan Na-CMC 0,5%

- Pembuatan konsentrasi 4,096 mg/mL

Pembuatan konsentrasi 4,096 mg/ml ditimbang lalu dimasukkan ke dalam vial kemudian dilarutkan dengan menggunakan larutan Na-CMC 0,5%

- Pembuatan konsentrasi 2,048 mg/ml

Pembuatan konsentrasi 2,048 mg/ml ditimbang lalu dimasukkan ke dalam vial kemudian dilarutkan dengan menggunakan larutan Na-CMC 0,5%

- Pembuatan konsentrasi 1,024 mg/ml

Pembuatan konsentrasi 1,024 mg/ml ditimbang lalu dimasukkan ke dalam vial kemudian dilarutkan dengan menggunakan larutan Na-CMC 0,5%

#### 1.5.6. Uji Skrining Fitokimia

##### a. Pemeriksaan Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 1 ml HCL 2N dan 10 ml akuades, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring sampai dapat filtrat. Pada tabung 1 diambil 0,5 ml filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer, apabila hasil positif akan terbentuk endapan berwarna putih dan kuning. Pada tabung 2 diambil filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Wagner, akan terbentuk endapan berwarna coklat sampai kehitaman menunjukka hasil positif. Pada tabung 3 diambil 0,5 ml filtrat lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff, akan terbentuk endapan coklat atau merah kecoklatan (Fitriyanti dkk, 2019).

##### b. Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ditambahkan 10 ml air panas, didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diambil 5 ml lalu ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah dan diperhatikan warna yang terbentuk pada lapisan amil alkohol.



Senyawa flavonoid akan menghasilkan warna merah, kuning atau jingga (Marjoni, 2016).

c. Tanin

Masukkan 2 ml sampel uji dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl 10%. Apabila keluar warna hitam menunjukkan adanya senyawa tanin, sedangkan warna hijau menunjukkan adanya 2 gugus hidroksil pada inti aromatis tanin. (Ngajow dkk, 2013).

d. Saponin

Sebanyak 0,5 g ditambahkan 10 mL aquades hangat dan di kocok kuat hingga terbentuk buih 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit. Pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, buih tidak hilang (Fitriyanti *et al.*, 2019).

e. Terpenoid atau steroid

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditempatkan pada plat tetes dan ditambahkan asam asetat anhidrat sampai sampel terendam semuanya, dibiarkan selama kira-kira 15 menit, enam tetes larutan dipindahkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Adanya terpenoid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah, jingga atau ungu, sedangkan steroid ditunjukkan dengan adanya warna biru (Fitriyanti dkk, 2019).

f. Kuinon

Sebanyak 0,05 gram sampel uji dilarutkan dengan 10 mL air panas sampai terbentuk larutan, kemudian tambahkan beberapa tetes NaOH 1 N. Apabila filtrat terbentuk warna merah menunjukkan adanya kuinon (Lestari dkk, 2021).

#### **1.6. Sterilisasi Alat**

Sterilisasi media yang akan digunakan untuk uji mikrobiologi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, cara flambir pada nyala Bunsen dilakukan untuk mensterilkan jarum ose dan cara direndam dengan etanol 70% dilakukan untuk mensterilkan bahan yang terbuat dari karet. Pengerjaan menggunakan cara aseptis pada lemari aseptis yang dibersihkan menggunakan etanol 70% lalu disinari lampu UV 15 menit sebelum digunakan (Aziz, 2010). Alat gelas disterilkan dalam oven pada suhu 170°C selama  $\pm$  1 jam (Toy *et al.*, 2015).

#### **1.7. Teknik Aseptis**

Teknik aseptis merupakan cara menjaga sterilitas ketika yang bertujuan untuk mencegah kontaminasi. Dasar digunakannya teknik aseptis karena banyaknya mikroorganisme yang terdapat pada debu yang mungkin masuk ke dalam cawan, mulut erlenmeyer atau mengendap pada area kerja. Teknik aseptis biasanya dilakukan pada saat bekerja dengan mikroorganisme dan menggunakan agen atau senyawa yang berbahaya. Beberapa aturan umum pada

teknik aseptis antara lain yaitu memastikan meja kerja bersih dari kotoran dan benda yang tidak akan digunakan, usap meja kerja dengan menggunakan etanol 70% sebelum digunakan, membakar mulut atau bagian tepi dari suatu alat untuk membunuh mikroorganisme yang menempel, semua alat harus steril dan diperiksa apakah ada kebocoran, cuci tangan sebelum dan setelah bekerja, menggunakan masker dan sarung tangan lateks secara berkala (Hafisan, 2014).

## **1.8. Persiapan Uji Aktivitas Antibakteri**

### **1.8.1. Pembuatan NA (Nutrient Agar)**

Media agar miring dibuat dengan cara melarutkan *Nutrient agar* (Na) sebanyak 0,46 gr dalam 15 ml aquades menggunakan erlenmeyer. Setelah itu dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* diatas penangas air sampai mendidih. Media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, Media yang sudah disteril dituang sebanyak 5 ml dituangkan masing-masing pada 3 tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium *foil* kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama kurang lebih 30 menit sampai media memadat. Media agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri atau peremajaan bakteri (Muljono et al., 2016).

### **1.8.2. Pembuatan Suspensi Bakteri *E. coli***

Ambil bakteri yang telah diinokulasi menggunakan kawat ose steril kemudian disuspensikan dalam tabung yang berisi 10 mL larutan

NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan *Mc. Farland* (Dima *et al.*, 2016)

### **1.8.3. Pembuatan MHA ( Muller Hinton Agar)**

Ditimbang Mueller Hinton Agar sebanyak 7,60 gr dalam 200 ml aquades, kemudian dipanaskan serta diaduk menggunakan *magnetik stirrer* hingga larut sampai larut. Larutan tersebut kemudian disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C dipertahankan selama 15 menit (Indriani dkk, 2019).

### **1.8.4. Pembuatan Na-CMC 0,5%**

Kontrol negatif pada penelitian ini adalah Na-CMC 0,5 %. Timbang 500 mg Na-CMC 0,5% , kemudian tambahkan 100 mL aquadest. Diaduk sampai larutan homogen (Tendean *et al.*, 2017).

### **1.8.5. Pembuatan Larutan *Mc. Farland***

Campurkan  $H_2SO_4$  1% sebanyak 9,95 mL dengan larutan  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  1% sebanyak 0,5 mL ke dalam erlenmeyer. Kocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan dari larutan *Mc. Farland* digunakan sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri (Febrianti *et al.*, 2019).

### **1.8.6. Pengujian Antibakteri menggunakan metode sumuran**

Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran, dengan cara mengukur diameter hambatan pertumbuhan bakteri terhadap bakteri *E. coli* prosedurnya yaitu.

- a. Masukkan suspensi bakteri *E.coli* dalam media *MHA*, dan diratakan dengan menggunakan cotton swab. tiap cawan petri dibuat menjadi 3 bagian pada lubang sumuran kemudian diberi label pada masing-masing lubang sumuran dengan masing-masing konsentrasi serta kontrol negatif nya adalah Na-CMC 0,5% dan kontrol positif adalah Ciprofloxacin  $5\mu\text{g}/\text{disk}$  perlakuan diulang sebanyak 4 kali (Fitriyanti, 2019).
- b. Setelah diberi label dimasukkan ekstrak metanol daun ramania kedalam lubang sumuran pada masing-masing konsentrasi dengan menggunakan mikropipet (Fitriyanti, 2019).
- c. Masukkan cawan petri yang berisi bakteri dengan berbagai konsentrasi kedalam inkubator 1x24 jam pada suhu  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Misna, 2016)
- d. Cawan agar diinkubasi 1x24 jam pada suhu  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Misna, 2016) setelah itu , melihat zona hambat terbentuk. Jika ada, diukur diameter daerah hambatan disekitar dengan menggunakan jangka sorong (Ngajow, 2013).

Perhitungan jumlah minimal pengulangan :

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

$$(n-1) (7-1) \geq 15$$

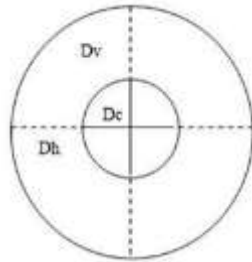
$$(n-1) 6 \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$n \geq 3,5$$

$$n = 4$$

### 1.8.7. Perhitungan Zona Hambat



$$\text{zona hambat} = \frac{(Dv - Dc) + (Dh - Dc)}{2}$$

Dimana :

Dv : Diameter vertikal zona bening

Dh : Diameter horizontal zona bening

Dc : Diameter sumuran

### 1.8.8. Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diambil berupa data kuantitatif yaitu besarnya zona hambat ekstrak metanol daun ramania (*B. macrophylla* Griffith). Analisis data yang dilakukan terlebih dahulu yaitu uji Normalitas dan uji Homogenitas. Uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk*, data dikatakan berdistribusi normal jika  $\alpha < 0,05$ . Kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas ( dengan uji *Levene*), data dikatakan homogen jika nilai  $\alpha > 0,05$ . Apabila data berdistribusi normal dan homogen maka

dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA*. Apabila data tidak berdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji statistika non parametik seperti *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan *Mann – whitney*.