

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental dengan melakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun ramania (*B.macrophylla* Griffith) terhadap bakteri *S.aureus* dengan variasi konsentrasi ekstrak 0,512 mg/mL, 1,024 mg/mL, 2,048 mg/mL, 4,096 mg/mL, dan 8,192 mg/mL. Pengujian dilakukan sebanyak empat kali pengulangan berdasarkan perhitungan dengan menggunakan rumus Federer (Nabila dkk, 2021) :

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

Dimana n adalah jumlah minimal pengulangan dan t adalah jumlah kelompok.

Perhitungan jumlah minimal pengulangan :

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

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \approx 4$$

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2021 sampai bulan Juni 2022.

3.2.2. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Mikrobiologi-Parasitologi, dan Laboratorium Steril STIKES Borneo Lestari Banjarbaru.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi dan Sampel

a. Populasi

Semua tanaman ramania (*B.macrophylla* Griffith) yang diperoleh dari daerah kota Banjarbaru Kalimantan Selatan.

b. Sampel

Sampel tanaman ramania (*B.macrophylla* Griffith) yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari daerah Banjarbaru Kalimantan Selatan. Bagian ramania yang digunakan adalah daun segar berwarna hijau.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak metanol daun ramania (*B.macrophylla* Griffith).

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona hambat ekstrak metanol daun ramania (*B.macrophylla* Griffith) terhadap bakteri *S.aureus*.

3.5. Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu autoklaf (All american[®]), *aluminium foil*, batang pengaduk, blender, gelas beker (Pyrex[®]), Bunsen, cawan petri, cawan penguap, Erlenmeyer (Pyrex[®]), *cork borer*, inkubator, jangka sorong, kaca arloji, kapas, *Laminar Air Flow* (LAF), lemari pengering simplisia, mikropipet, ose, oven (Thermo Scientific[®]), rak tabung reaksi, *rotary evaporator* (IKRF10[®]), tabung reaksi (iwaki[®]), timbangan analitik (Ohaus[®]), penayak, dan Waterbath (Memmart[®]).

3.5.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu aquades, bakteri *S.aureus*, daun ramania (*B.macrophylla* Griffith), FeCl₃, HCl pekat, klindamicin, larutan standar *Mc-Farland* 0,5, media *Nutrient Agar* (NA), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), metanol, pereaksi *Dreagendorff*, pereaksi *Wagner*, pereaksi *Mayer*, serbuk magnesium, reagen *liberman burchard*.

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pengambilan sampel

Tumbuhan ramania (*B.macrophylla* Griffith) diperoleh dari daerah Banjarbaru Kalimantan selatan. Bagian tumbuhan yang diambil adalah daunnya, sebanyak 1 kg daun ramania (*B.macrophylla* Griffith) diambil pada bulan Desember 2021.

3.6.2. Determinasi Tumbuhan Ramania (*B.macrophylla* Griffith)

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

3.6.3. Pembuatan Simplisia Daun Ramania (*B.macrophylla* Griffith)

Pembuatan ekstrak diawali dengan proses pengumpulan sampel. Sebanyak 1 kg sampel daun ramania dikumpulkan lalu dilakukan sortasi basah yang bertujuan untuk menghilangkan bagian tanaman selain daunnya. Lalu sampel daun dicuci dengan air mengalir hingga bersih, kemudian sampel dipotong-potong/dirajang menjadi bagian kecil. Daun ramania kemudian dikeringkan dengan menggunakan lemari pengering simplisia pada suhu 40°C. Daun ramania yang telah kering dihaluskan dengan blender sehingga didapatkan serbuk halus daun ramania (Ekklesia dkk, 2020). Serbuk simplisia diayak dengan menggunakan mesh nomor 40 kemudian

timbang dan hitung rendemen simplisianya (Erwandi dkk, 2018). Rendemen simplisia dihitung menggunakan rumus (Safrina & Priyambodo, 2018):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat simplisia (BS)}}{\text{berat bahan baku (BK)}} \times 100\%$$

3.6.4. Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Ramania (*B.macrophylla* Griffith)

Sebanyak 250gram serbuk halus daun ramania diekstraksi menggunakan metode maserasi. Serbuk simplisia daun ramania direndam dengan pelarut metanol perbandingan 1:5 pada suhu ruang (Sukalingam, 2018). Maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam, ekstrak disaring setiap 24 jam dan diganti dengan pelarut yang baru. Ekstrak hasil maserasi diuapkan pelarutnya menggunakan evaporator pada suhu 40°C kemudian dipekatkan dengan *waterbath* sehingga didapatkan ekstrak kental (Ekklesia dkk, 2020: Nguyen dkk, 2020). Ekstrak kental yang didapat dihitung rendemennya dengan rumus (Fatmawati & Aji, 2019):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kental (g)}}{\text{berat awal simplisia (g)}} \times 100\%$$

3.6.5. Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

2 g ekstrak sampel uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu tetesi dengan 5 mL HCl 2N, kemudian dipanaskan. Biarkan dingin, lalu dibagi dalam 3 tabung reaksi yang masing-

masing berisi 1 mL karutan. Tiap tabung ditambahkan dengan masing-masing pereaksi yaitu pereaksi *Mayer*, *Wagner*, dan *Dragendorff*. Pada penambahan pereaksi *Mayer*, positif mengandung alkaloid apabila terbentuk endapan putih atau kuning. Pada penambahan pereaksi *Wagner*, positif mengandung alkaloid apabila terbentuk endapan coklat. Pada penambahan pereaksi *Dragendorff*, positif mengandung alkaloid apabila terbentuk endapan jingga (Muthmainna, 2017).

b. Uji Flavonoid

Masukkan beberapa tetes sampel uji kedalam tabung reaksi lalu tambahkan dengan 2 mg serbuk Mg dan 3 tetes HCl pekat. Kocok sampel dan amati, apabila larutan berwarna merah, kuning hingga jingga maka menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Wahidah dkk, 2021).

c. Uji Saponin

Pengujian saponin dilakukan dengan 1 mL ekstrak ditambah dengan 10 mL air panas, kemudian ditutup dan gojok kuat selama 10 detik hingga terbentuk busa dengan tinggi 1-2 cm. kemudian tambahkan 1 tetes HCl 2N melalui dinding tabung, apabila busa tidak hilang maka sampel mengandung saponin (Kumalasari, dkk. 2019; Marpaung & Romelan, 2018).

d. Uji steroid/Triterenoid

Beberapa tetes sampel uji dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan reagen *liberman burchard*. Kemudian amati, apabila terjadi perubahan warna merah jingga/ungu menandakan adanya senyawa terpenoid sedangkan terjadi perubahan warna biru menandakan adanya senyawa steroid (Panggabean dkk, 2020).

e. Uji Tanin

2 mL sampel uji dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 tetes larutan gelatin 10%. Sampel positif mengandung tannin apabila terbentuk endapan putih (Makalalag dkk, 2015).

f. Uji Kuinon

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).

g. Uji Fenol

Sampel uji ditetesi dengan larutan FeCl₃ 10%, kemudian diamati. Apabila larutan berubah menjadi warna biru kehitaman maka sampel uji mengandung senyawa fenol (Harahap dkk, 2021; Putri dkk, 2021).

3.6.6. Pengujian Antibakteri *S.aureus*

a. Sterilisasi Alat dan Media

Alat disiapkan dan dicuci bersih terlebih dahulu. Kemudian, alat yang sudah dicuci maka dikeringkan lalu dibungkus menggunakan aluminium foil. Alat-alat gelas disterilkan dengan oven pada suhu 170 °C selama 1 jam. Media disterilkan menggunakan autoklaf dengan dipertahankan pada suhu 121°C selama 15 menit (Fitriyanti dkk, 2019; Pratomo, 2017).

b. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Media NA ditimbang sebanyak 1,12 gram lalu dilarutkan dalam 40 mL *aquadest*. Kemudian dipanaskan di atas *hot plate* hingga mendidih sambil diaduk-aduk sampai larut sempurna. Kemudian disterilkan menggunakan *autoklaf* dengan mempertahankan suhu 121°C selama 15 menit (Zamilah, 2020; Pratomo, 2017). Dinginkan, lalu miringkan tabung yang berisi NA dan biarkan membeku (Rezi dkk, 2014).

c. Peremajaan Bakteri Menggunakan Media *Nutrient Agar* (NA)

Peremajaan bakteri *S.aureus* dilakukan pada media miring NA dengan cara ambil bakteri satu ose lalu goreskan secara merata pada media NA. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Lestari dkk, 2020).

d. Pembuatan larutan standar 0,5 Mc Farland

Campurkan larutan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 mL dan larutan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL, kemudian kocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Larutan keruh ini dipakai sebagai standar kekeruhan dari suspensi bakteri uji dan setara dengan kepadatan bakteri 10⁸ CFU/mL (Pehino dkk, 2021).

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Biakan bakteri *S.aureus* dari NA plate diinokulasikan dalam NaCl 0,9% dengan ose bulat kemudian kekeruhannya disamakan dengan standar *Mc Farland* (Dewangga & Nirwana, 2019).

f. Pembuatan Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)

Timbang media MHA sebanyak 6,84 gram lalu tambahkan aquades 180 mL. Selanjutnya media MHA diaduk dan dipanaskan menggunakan *hot plate*. Selanjutnya media MHA dimasukkan kedalam *autoklaf* dengan memepertahankan suhu 121°C selama 15 menit guna mensterilkan media. Kemudian media dituangkan kedalam cawan petri sebanyak 15 mL dan dilakukan di dalam LAF (Mahmudah dan Atun, 2017; Pratomo, 2017).

g. Pembuatan kontrol negatif (Na CMC 0,5%)

Na CMC 0,5% dibuat dengan cara 0,5 gram Na CMC dilarutkan kedalam 100 mL aquades steril, kemudian dikocok hingga larutan homogen (Dima dkk, 2016).

h. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Metanol Daun Ramania

Variasi konsentrasi ekstrak metanol daun ramania yang digunakan adalah 0,512 mg/mL, 1,024 mg/mL, 2,048 mg/mL, 4,096 mg/mL dan 8,192 mg/mL.

- Pembuatan larutan induk / konsentrasi 8,192 mg/mL

Pembuatan larutan induk dilakukan dengan menimbang 81,92 mg ekstrak metanol daun Ramania kemudian dilarutkan dalam 10 mL NaCMC 0,5%.

- Pembuatan konsentrasi 4,096 mg/mL

Pembuatan konsentrasi 4,096 mg/mL yaitu dengan cara mengambil 1 mL larutan induk lalu dilarutkan dengan 1 mL NaCMC 0,5%.

- Pembuatan konsentrasi 2,048 mg/mL

Pembuatan konsentrasi 2,048 mg/mL yaitu dengan mengambil 1 mL larutan konsentrasi 4,096 lalu dilarutkan dengan 1 mL NaCMC 0,5%.

- Pembuatan konsentrasi 1,024 mg/mL

Pembuatan konsentrasi 1,024 mg/mL yaitu dengan cara mengambil 1 mL larutan konsentrasi 2,048 lalu dilarutkan dengan 1 mL NaCMC 0,5%.

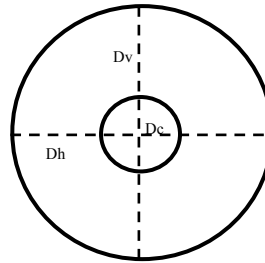
- Pembuatan konsentrasi 0,512 mg/mL

Pembuatan konsentrasi 0,512 mg/mL yaitu dengan cara mengambil 1 mL larutan konsentrasi 1,024 mg/mL lalu dilarutkan dengan 1 mL NaCMC 0,5%..

i. Pengujian Antibakteri Dengan Metode Sumuran

Media MHA yang telah dingin dan memadat selanjutnya ditanami bakteri *S.aureus* menggunakan metode sebar yang diambil dari suspensi bakteri. Lalu dibuat lubang sebanyak yang diperlukan menggunakan *cork borer*. Pada masing-masing lubang sumuran dimasukan kontrol positif menggunakan klindamisin, kontrol negatif menggunakan Na CMC dan 5 variasi konsentrasi ekstrak yang diujikan sebanyak 20 µl. Cawan petri yang berisis larutan uji dimasukkan kedalam inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan cawan petri tidak diletakan terbalik (Fitriyanti dkk, 2019; Ningrum dkk, 2020). Setelah diinkubasi selama 24 jam lalu dilakukan pengukuran diameter bening. Zona bening yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong (Putrajaya dkk, 2019).

Rumus perhitungan diameter zona hambat antibakteri
(Winastri dkk, 2020) :



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

Dimana :

Dv : Diameter vertikal zona bening

Dh : Diameter horizontal zona bening

Dc : Diameter sumuran

Dari hasil yang didapat kemudian akan diinterpretasikan kedalam kategori klasifikasi zona hambat apakah dalam kategori tidak ada, lemah, sedang, ataupun kuat. Interpretasi hasil zona hambat control positif clindamycin berdasarkan CLSI adalah sensitif bila zona hambat yang terbentuk ≥ 20 mm, sedang 15-20 mm, dan resisten apabila ≤ 14 mm.

3.7. Analisis Data

Data yang diambil berupa data kuantitatif yaitu besarnya zona hambat ekstrak metanol daun ramania (*B. macrophylla* Griffith). Data yang didapat dianalisis menggunakan SPSS *For Windows* dengan taraf kepercayaan ($p < 0,05$). Pengujian dengan SPSS untuk melihat apakah ada

perbedaan yang bermakna dari masing-masing kelompok uji yang mengandung kontrol positif, kontrol negatif dengan berbagai variasi konsentrasi ekstrak metanol daun *Ramania* (*B.macrophylla* Griffith) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S.aureus*.

Data yang didapat dianalisis menggunakan SPSS dengan uji pendahuluan yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Jika data yang didapat terdistribusi normal dan homogen kemudian dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* dan uji *Post Hoc* LSD namun jika data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji *Kruskall-wallis* dan uji *Mann-whitney*.