

## BAB II METODE PENELITIAN

### A. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Maret-Agustus 2022 di Laboratorium Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Nasional, Jakarta.

### B. Instrumen penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain grinder, ayakan 60 mesh, kuas, gelas piala 300 mL, gelas ukur 1L, wadah gelap 1L, wadah gelap 30 mL, wadah gelap 5 mL, labu Kjeldahl 10 mL, kertas saring, corong, batang pengaduk, *aluminium foil*, *rotary vacuum evaporator*, timbangan analitik, timbangan digital, pipet volume 10 mL, bulb pipet, kuvet, spektrofotometer UV-VIS, cawan petri, Erlenmeyer 500 mL, tabung reaksi, karet, koran, nampan plastik, plastik tahan panas, autoklaf, inkubator, *laminar air flow*, bunsen, jarum ose, kapas swab steril, kompor listrik, *vortex*, *cork borer*, mikropipet, tip kuning, penggaris, spidol, label nama, jangka sorong, dan alat pelindung diri (sarung tangan, masker, jas laboratorium).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain simplisia akar, buah matang, dan daun tua Mangkinang blawau, etanol 70%, akuadestilata, serbuk kuersetin,  $\text{AlCl}_3$  10%, asam asetat glasial, serbuk asam tanat, Folin Ciocalteu,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20%, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, media *Nutrient Agar* (NA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Mueller Hinton Broth* (MHB), antibiotik kloramfenikol, dan serbuk NaCl.

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari variabel dependen yang meliputi kandungan senyawa fitokimia secara kuantitatif dan aktivitas antibakteri, sedangkan variabel independen meliputi bagian tumbuhan Mangkinang blawau yang dimanfaatkan untuk penyembuhan luka, variasi konsentrasi ekstrak etanol, dan jenis bakteri uji. Definisi Operasional Variabel (DOV) dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Definisi Operasional Variabel (DOV)**

No.	Variabel	DOV	Sumber	Satuan
1.	Bagian tumbuhan Mangkinang blawau	Bagian tumbuhan dari Mangkinang blawau berupa akar, buah matang, dan daun tua	Stasiun Penelitian Tuanan, Kalimantan Tengah	-
2.	Kandungan fitokimia secara kuantitatif	Kadar total senyawa flavonoid dan tanin pada ekstrak etanol akar, buah matang, dan daun tua	Hasil pemeriksaan laboratorium	%
3.	Konsentrasi ekstrak etanol	Ekstrak etanol dibuat dari bagian akar, buah matang, dan daun tua menjadi lima taraf konsentrasi, yaitu 75%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%	Ekstrak etanol 70% akar, buah matang, dan daun tua	%
4.	Jenis bakteri uji	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	Laboratorium Mikrobiologi UNAS	-
5.	Aktivitas antibakteri	Penentuan aktivitas antibakteri berdasarkan: 1. Diameter zona hambat 2. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)	Hasil pengamatan langsung	1. mm 2. %

## **C. Cara kerja**

### **1. Persiapan sampel tumbuhan**

Tumbuhan Mangkinang blawau diperoleh dari Stasiun Penelitian Tuanan yang berlokasi di Dusun Tuanan, Kecamatan Mantangai, Kabupaten Kapuas, Kalimantan Tengah. Bagian tumbuhan yang dimanfaatkan berupa akar, buah matang, dan daun tua yang sebelumnya sudah dibersihkan dan dikeringkan langsung di bawah sinar matahari atau menggunakan oven dengan suhu 50°C hingga cukup kering untuk dijadikan serbuk simplisia.

### **2. Pembuatan serbuk simplisia**

Pembuatan serbuk simplisia akar, buah matang, dan daun tua menggunakan grinder dan diayak menggunakan ayakan 60 mesh (Hermawati, 2021). Serbuk simplisia yang diperoleh kemudian dibungkus dengan plastik dan disimpan dalam suhu ruang (20-25°C) untuk digunakan dalam proses ekstraksi.

### **3. Ekstraksi**

Ekstraksi dilakukan terhadap 300 g serbuk simplisia akar, buah matang, dan daun tua yang ditempatkan dalam wadah gelap berisi pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10 (b/v). Sampel kemudian didiamkan selama 3 hari dalam suhu ruang (20-25°C) dan dihomogenkan setiap 24 jam sekali (Hermawati, 2021). Semua maserat disaring dengan kertas saring, filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* (Pauner dan Hamzah, 2022). Ekstrak pekat tersebut disimpan dalam wadah kedap udara untuk digunakan dalam analisis kuantitatif fitokimia dan uji aktivitas antibakteri.

### **4. Analisis kuantitatif fitokimia**

Analisis fitokimia secara kuantitatif merujuk pada jurnal (Nurmila *et al.*, 2019) dan (Aryantini, 2021) terhadap senyawa flavonoid dan tanin.

#### **a. Kuantitatif flavonoid**

##### **1) Pembuatan kurva standar**

Serbuk kuersetin ditimbang 0,025 g dan dilarutkan dalam 25 mL etanol 70% sehingga diperoleh larutan standar kuersetin 100 ppm. Larutan tersebut dibuat seri konsentrasi, yaitu 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, dan 80 ppm. Sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi larutan standar kuersetin ditambahkan 3 mL

etanol 70%, 0,2 mL AlCl<sub>3</sub> 2%, 0,2 mL asam asetat glasial, dan 5,6 mL akuadestilata hingga volume akhir tepat 10 mL. Masing-masing larutan tersebut didiamkan 30 menit dalam suhu ruang, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 415 nm (Nurmila *et al.*, 2019).

## 2) Penentuan kadar flavonoid

Ekstrak etanol akar, buah matang, dan daun tua ditimbang 0,025 g dan dilarutkan dalam 25 mL etanol 70%. Sebanyak 1 mL dari masing-masing larutan sampel ditambahkan 3 mL etanol 70%, 0,2 mL AlCl<sub>3</sub> 2%, 0,2 mL asam asetat glasial, dan 5,6 mL akuadestilata hingga volume akhir tepat 10 mL. Masing-masing larutan sampel tersebut didiamkan 30 menit dalam suhu ruang, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 415 nm dan dilakukan sebanyak dua replikasi (Nurmila *et al.*, 2019).

Dari hasil perhitungan kurva standar, didapatkan persamaan regresi linear  $Y = bx+a$  kemudian dihitung kadarnya dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Perhitungan kadar \%} = \frac{\text{Konsentrasi (mg/L)} \times \text{Volume ekstrak (L)}}{\text{Berat ekstrak (g)}} \times 100\%$$

## b. Kuantitatif tanin

### 1) Pembuatan kurva standar

Serbuk asam tanat ditimbang 0,005 g dan dilarutkan dalam 50 mL akuadestilata sehingga diperoleh larutan standar asam tanat 1000 ppm. Larutan tersebut dibuat beberapa seri konsentrasi, yaitu 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm. Sebanyak 0,5 mL dari masing-masing konsentrasi larutan standar asam tanat ditambahkan 0,5 mL Folin Ciocalteu, 1,5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%, dan akuadestilata 7,5 mL hingga volume akhir tepat 10 mL. Masing-masing larutan tersebut didiamkan 30 menit dalam suhu ruang, kemudian dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 750 nm (Aryantini, 2021).

## 2) Penentuan kadar tanin

Ekstrak etanol akar, buah matang, dan daun tua ditimbang 0,01 g dan dilarutkan dalam 10 mL akuadestilata. Sebanyak 0,5 mL dari masing-masing larutan sampel ditambahkan 0,5 mL Folin Ciocalteu, 1,5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%, dan akuadestilata 7,5 mL hingga volume akhir tepat 10 mL. Masing-masing larutan sampel tersebut didiamkan 30 menit dalam suhu ruang, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 750 nm dan dilakukan sebanyak dua replikasi (Aryantini, 2021).

Dari hasil perhitungan kurva standar, didapatkan persamaan regresi linear  $Y = bx+a$  kemudian dihitung kadarnya dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Perhitungan kadar (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi (mg/L)} \times \text{Volume ekstrak (L)}}{\text{Berat ekstrak (g)}} \times 100\%$$

## 5. Persiapan uji antibakteri

### a. Sterilisasi alat

Alat-alat kaca yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan, dan dibungkus dengan koran dan plastik tahan panas kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2atm selama 30 menit. Jarum ose dapat disterilkan di atas bunsen hingga berpijar merah membara. Sedangkan untuk *laminar air flow* disterilkan dengan cara seluruh bagian *laminar* disemprotkan alkohol 70% dan disinari dengan lampu UV selama 30-60 menit (Pinarsi Emilda, 2021).

### b. Pembuatan media pertumbuhan bakteri

#### 1) NA (*Nutrient Agar*)

Serbuk NA sebanyak 28 g dilarutkan dalam 1L akuadestilata, kemudian dipanaskan di atas kompor listrik dan diaduk hingga larut. Media dipindahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 mL dan disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2atm selama 15 menit (Torar, 2017).

#### 2) MHA (*Mueller-Hinton Agar*)

Serbuk MHA sebanyak 38 g dilarutkan dalam 1L akuadestilata, kemudian dipanaskan di atas kompor listrik dan diaduk hingga larut. Media dipindahkan ke

dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 18 mL dan disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2atm selama 15 menit (Rosyadi *et al.*, 2022).

### 3) MHB (*Mueller-Hinton Broth*)

Serbuk MHB sebanyak 21 g dilarutkan dalam 1L akuadestilata, kemudian dipanaskan di atas kompor listrik dan diaduk hingga larut. Media dipindahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 9 mL dan disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2atm selama 15 menit (Rosyadi *et al.*, 2022).

### c. Pembuatan kontrol negatif dan positif

Kontrol negatif yang digunakan adalah akuadestilata, sedangkan kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik kloramfenikol yang dibuat dengan cara 0,25 g kloramfenikol dilarutkan dalam 250 mL akuadestilata steril kemudian dihomogenkan (Indriyani, 2021).

### d. Pembuatan NaCl fisiologis 0,9%

Serbuk NaCl ditimbang sebanyak 0,9 g dan dilarutkan dalam 100 mL akuadestilata. Larutan tersebut kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2atm selama 15 menit (Kholishoh, 2021).

## 6. Uji aktivitas antibakteri

### a. Peremajaan bakteri uji

Peremajaan bakteri uji dilakukan dengan cara biakan murni bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* diinokulasikan satu ose ke dalam media NA miring secara aseptis. Media yang berisi bakteri tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Torar, 2017).

### b. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan suspensi bakteri uji dilakukan dengan cara beberapa ose hasil peremajaan bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCl 0,9% steril dan diukur transmitannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 580 nm. Apabila transmittan menunjukkan 25% maka suspensi bakteri uji siap digunakan (Syamsul, 2015).

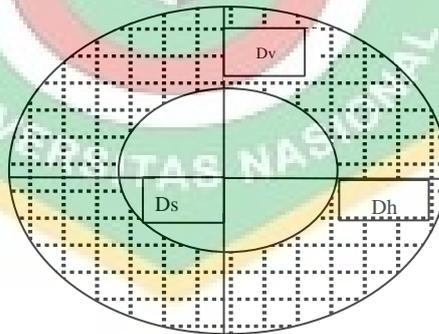
### c. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak

Variasi konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 75%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25% (b/v) yang dibuat dengan cara masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 0,75 g; 0,5 g; 0,25 g; 0,125 g; dan 0,0625 g. Ekstrak tersebut kemudian dilarutkan dalam akuadestilata steril hingga 1 mL (Torar, 2017).

### d. Uji daya hambat antibakteri

Uji daya hambat antibakteri dilakukan terhadap *S. aureus* dan *P. aeruginosa* menggunakan metode difusi sumuran dengan cara media MHA steril sebanyak 18 mL dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Digoreskan secara merata 100  $\mu$ L suspensi bakteri uji menggunakan kapas swab steril ke seluruh permukaan media, kemudian dibuat lubang sumuran dengan *cork borer* berdiameter 6 mm. Pada media yang sudah terbuat sumuran, diberikan 25  $\mu$ L ekstrak akar, buah matang, dan daun tua sesuai konsentrasi yang telah ditentukan serta kontrol positif dan negatif sebagai pembanding, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,001 mm (Torar, 2017). Diameter zona hambat dapat diukur dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{(Dv - Ds) + (Dh - Ds)}{2}$$



Gambar 1. Rumus perhitungan diameter zona hambat (Tansil et al., 2016)

Keterangan:

Dv = Diameter vertikal

Dh = Diameter horizontal

Ds = Diameter sumuran

e. **Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)**

1) Penentuan KHM

Penentuan KHM dilakukan terhadap ekstrak dengan konsentrasi terendah hasil uji daya hambat antibakteri dengan cara disiapkan 9 mL media MHB steril dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,5 mL suspensi bakteri dan 0,5 mL ekstrak. Pada tabung reaksi berbeda disiapkan 2 mL media MHB steril dan 2 mL ekstrak sebagai kontrol negatif serta 2 mL media MHB steril dan 2 mL suspensi bakteri sebagai kontrol positif. Sampel tersebut dipindahkan ke dalam kuvet sebanyak 3 mL secara aseptis kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 580 nm (setara dengan 0,5 Mc Farland). Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dihomogenkan, dan diukur nilai absorbansinya kembali. Perhitungan nilai KHM menggunakan persamaan berikut:

$$\text{KHM} = \text{Optical Density sesudah} - \text{Optical Density sebelum inkubasi}$$

Konsentrasi terendah yang dapat menghambat bakteri ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan setelah diinkubasi ( $OD \leq 0$ ). Berdasarkan penelitian Magdalena dan Kusnadi (2015), pada dasarnya panjang gelombang 580 nm digunakan karena sel-sel bakteri menyerap pada panjang gelombang ini. Jika nilai absorbansi sesudah inkubasi bertambah, maka dapat disimpulkan masih terjadi pertumbuhan bakteri. Namun sebaliknya jika nilai absorbansi sesudah inkubasi berkurang, maka dapat disimpulkan tidak terjadi pertumbuhan bakteri.

2) Penentuan KBM

Penentuan KBM dilakukan terhadap sampel dengan konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak adanya kekeruhan setelah inkubasi dari hasil pengukuran KHM. Sampel tersebut digoreskan pada media MHA kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Apabila pada media menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri setelah inkubasi, maka sampel dengan konsentrasi tersebut dinyatakan sebagai nilai KBM (Fitriana *et al.*, 2020).

#### **D. Analisis data**

Rancangan penelitian yang digunakan untuk menguji hipotesis yang diajukan dalam uji daya hambat antibakteri adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL-F) yang terdiri dari tiga perlakuan dengan tiga ulangan. Perlakuan pertama adalah tiga jenis ekstrak tumbuhan, yaitu akar, buah matang, dan daun tua. Perlakuan kedua adalah ekstrak yang masing-masing dibuat menjadi lima taraf konsentrasi, yaitu 75%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%, serta kontrol positif kloramfenikol dan kontrol negatif akuadestilata sebagai pembanding. Perlakuan ketiga adalah dua jenis bakteri uji, yaitu *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Sementara untuk uji lainnya dijelaskan secara deskriptif.

Data yang dihasilkan dari uji daya hambat antibakteri dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) menggunakan *Statistical Program for Social Science* (SPSS) dan jika bermakna dilanjutkan dengan *Post Hock Tukey*.



