

### BAB III METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental.

#### B. Lokasi Penelitian

Laboratorium Universitas Ngudi Waluyo jl. Diponegoro No.186, ngablak, Gedanganak, Kec. Ungaran Timur. Semarang.

#### C. Subjek Penelitian

Penelitian ini yang di ambil sebagai populasi adalah tumbuhan daun mangga kasturi di desa Sungai Tabukan. Sedangkan sampel pada penelitian ini yaitu 150 gr serbuk simplisia daun mangga kasturi yang telah di hancurkan menggunakan blender.

#### D. Definisi Operasional

**Tabel 2.** Defisini Operasional

Definisi Operasional	Variabel	Alat	Hasil
Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun mangga kasturi ( <i>Mangifera casturi</i> ) terhadap pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> dan <i>Methicillin-resistant staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Zona Hambat	Penggaris	1. Memiliki Aktivitas Antibakteri jika terbentuk zona bening di sekitar kertas cakram 2. Tidak Memiliki Aktivitas Antibakteri jika tidak terbentuk zona bening disekitar kertas cakram

#### E. Pengumpulan Data

##### 1. Alat dan Bahan

Alat : Oven (Binder), Waterbath (KD-98-IIA), Rotary Evaporator (RE-2000E), Kain flanel, Tabung reaksi (Iwaki), Cawan porselin, Penangas air (Maspion), sinar UV panjang gelombang 366 nm (Merck K6AA), Mikroskop

cahaya (Boeco), objek glass (Sail Brand), Ose, Autoklaf (HVE-50), Beker glass (Iwaki), Bunsen, Cawan petri, Inkubator (Binder), Mikro pipet (Huawei), Swab kapas steril, pipet volume (Iwaki), gelas ukur (Iwaki), cakram kosong (Oxoid).

Bahan : Serbuk simplisia daun mangga kasturi, Etanol 96% (Sydney), Ekstrak daun mangga kasturi, ( larutan  $\text{FeCl}_3$ , kloroform, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, aseton P, serbuk halus asam borat P, serbuk halus asam oksalat P dan Eter P, Crystal violet, Larutan iodine, Alkohol 96%, Minyak immerse , Media agar, Dimetil sulfoksida (DMSO) (menggunakan bahan kimia dari PT. Merck Indonesia Tbk) ), Safranin (Hartman), Aquades steril (Sentra Kimia), Kultur *Escherichia coli* dan *Methicillin-resistant staphylococcus aureus* (MRSA), ciprofloxacin inf 0,005% (OGB Dexa).

## 2. Determinasi

Determinasi tumbuhan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Sudarto, Tembalang, Kota Semarang.

## 3. Ekstraksi

Ekstrak daun mangga kasturi dibuat menggunakan metode maserasi dengan cara mencuci sebanyak 1 kg daun mangga kasturi dan dikeringkan pada oven bersuhu  $40^{\circ}\text{C}$  selama 4 jam. Setelah kering, di blender secukupnya. 150 gr Serbuk simplisia tersebut direndam selama 1x24 jam menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian remaserasi dilakukan sebanyak 2 kali, perbandingan antara serbuk dan pelarut yaitu adalah 1:5. hasil rendaman

dari maserasi dan remaserasi tersebut disatukan dan di saring dengan menggunakan kain flanel hingga di dapatkan filtrat nya. Hasil filtrat tersebut kemudian di tempatkan pada Rotary Evaporator untuk proses penguapan sampai ekstrak menjadi kental. Ekstrak kental tersebut dipanaskan di atas waterbath dengan suhu 40°C agar ekstrak kental terbebas dari pelarut. Proses pemanasan ini sampai di peroleh bobot konstan dari ekstrak kental tersebut. (Ridhwana *et al.*, 2020).

Berikut rumus perhitungan untuk mendapatkan % rendemen :

$$\% \text{ rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (g)}}{\text{bobot serbuk simplisia (g)}} \times 100\%$$

#### 4. Identifikasi Senyawa Tanin, Triterpenoid dan Flavonoid

##### A. Uji Tanin

Untuk mengetahui kandungan senyawa tannin dapat dilakukan dengan cara ekstrak 2 ml ditetesi dengan larutan FeCl<sub>3</sub> 2-3 tetes. Amati perubahan warna pada larutan uji, jika terdapat senyawa tanin maka larutan uji akan nampak berwarna hijau kehitaman (Khotimah, 2016).

##### B. Uji Triterpenoid

Untuk mengetahui kandungan senyawa triterpenoid dapat dilakukan dengan cara ekstrak 2 ml diuapkan didalam cawan porselin. Residu yang muncul lalu ditambahkan dengan kloroform dan asam asetat anhidrat masing-masing 0,5 mL, kemudian 2 ml asam sulfat pekat di tambahkan melalui dinding tabung, jika terdapat senyawa triterpenoid maka larutan uji akan menghasilkan cincin berwarna kecoklatan atau violet pada batas (Khotimah, 2016).

### C. Uji Flavonoid

Untuk mengetahui kandungan senyawa flavonoid dapat dilakukan dengan cara ekstrak 1 ml diuapkan didalam cawan porselin. Residu yang muncul ditambahkan aseton P, serbuk halus asam borat P dan serbuk halus asam oksalat P masing-masing secukupnya, serta dilanjutkan dengan pemanasan di atas penangas air dan perhatikan nyala api agar tidak berlebihan. Ditambahkan Eter P sebanyak 10 mL. Amati larutan uji dengan sinar Ultra violet panjang gelombang 366 nm. Jika terdapat senyawa flavonoid maka larutan uji akan nampak warna dengan fluorensi kuning (Ningsih & Rejeki, 2018).

## 5. Uji Aktivitas Antibakteri

### A. Pembuatan Media Nutrient Agar

10 gr Nutrient agar ditimbang dan ditambahkan 500 ml aquades steril kedalam labu erlenmeyer, kemudian dipanaskan pada penangas air sampai larut. Sterilkan di dalam Autoklaf selama 15 menit dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$ . Tuangkan sebanyak 15-20 ml nutrient agar cair pada masing-masing cawan petri, ditunggu sampai nutrient agar memadat (Wahyuni, 2014).

### B. Pembuatan Kontrol Petumbuhan Bakteri Uji dengan Metode Streak Plate

Koloni bakteri diambil menggunakan jarum ose steril dan ditanamkan dengan cara menggoreskan pada media agar. Inkubasi selama 24 jam di inkubator bersuhu  $37^{\circ}\text{C}$  (Wahyuni, 2014).

### C. Identifikasi Bakteri

Di atas objek glass di buat pulasan bakteri, keringkan dan fiksasi dengan api bunsen. Cat crystal violet (Gram A) di teteskan secukupnya dan didiamkan selama 1 menit. Buang dan cuci sisa cat menggunakan air mengalir, selanjutnya di teteskan larutan iodine (Gram B) secukupnya dan didiamkan selama 1 menit, buang dan cuci sisa catnya menggunakan air mengalir. Decolorisasi menggunakan alkohol (Gram C) secukupnya dan didiamkan selama 20 detik, buang dan cuci sisa cat nya menggunakan air mengalir. Di teteskan larutan safranin (Gram D) secukupnya dan diamkan selama 20 detik, buang dan cuci cat nya kembali menggunakan air mengalir, keringkan objek glass yang telah dilakukan pengecatan bakteri sampai kering dengan cara di angin-anginkan, lalu amati objek glass tersebut pada perbesaran kuat (1000x) menggunakan minyak immerse di bawah mikroskop (Nurhidayati *et al.*, 2015).

### 6. Sterilisasi

Sebelum melakukan penelitian, sterilisasikan alat-alat penelitian yang digunakan di dalam oven dengan suhu 180<sup>0</sup> C selama 2 jam. Khusus untuk jarum ose disterilkan dengan cara dibakar menggunakan lampu Bunsen (Fardin & Wulan, 2016).

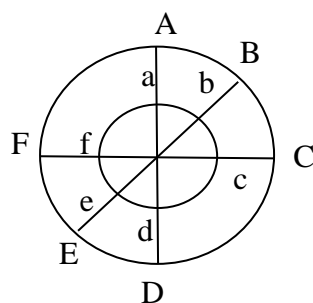
### 7. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mangga Kasturi

Media agar dituangkan kedalam cawan petri steril dan di beri segel sesuai dengan konsentrasi ekstrak yang di uji seperti :

1. Ekstrak konsentrasi 0,5 %, 1 %, 2%, 4%, 6%, (Ridhwana *et al.*, 2020)

2. DMSO 0,5% sebagai kontrol negatif
3. ciprofloxacin inf 0,005% sebagai kontrol positif
4. Kontrol Bakteri

Selanjutnya diambil koloni bakteri yang di uji, ditanamkan pada media agar dengan metode streak plate (cara gores) menggunakan jarum ose steril, kemudian kertas cakram ditetesi dengan sejumlah konsentrasi ekstrak sebanyak 20  $\mu$ l, ditempatkan pada media agar yang telah ditanamkan koloni bakteri yang akan di uji. Lakukan inkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Inkubasi dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan sebuah biakan yang murni tanpa adanya mikroba lain yang tidak diinginkan ikut tumbuh (Harti, 2015). Setelah diinkubasi, amati diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram, lalu gunakan penggaris sebagai alat pengukur diameter zona hambat yang terbentuk. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan untuk mengetahui kekuatan hambatan dari ekstrak uji terhadap mikroorganisme yang diuji. Rumus mengukur kekuatan hambatan ekstrak sebagai berikut :



**Gambar 6.** diagram pengukuran diameter zona hambat (Kadarwenny, 2017).

$$\text{Diameter zona hambat} = \frac{(AD-ad)+(BE-be)+(CF-cf)}{3}$$

keterangan :

lingkaran (abcdef) = kertas Cakram

lingkaran (ABCDEF) = Zona Bening

### 1. Perhitungan Pengenceran Konsentrasi

$$\text{A. DMSO } 100\% = \frac{100 \text{ gram}}{100 \text{ ml}}$$

$$\text{DMSO } 0,5\% = V1 \cdot M1 = V2 \cdot M2$$

$$100\% = 100 \text{ ml} \cdot 0,5\%$$

$$V1 = \frac{100 \times 0,5}{100} = 0,5 \text{ ml ad } 100 \text{ ml aquades steril}$$

$$\text{B. Ekstrak } 6\% = \frac{6 \text{ gram}}{100 \text{ ml}} = \frac{0,6 \text{ gram}}{10 \text{ ml}}$$

$$\text{C. Ekstrak } 4\% = V1 \cdot M1 = V2 \cdot M2$$

$$6\% = 10 \text{ ml} \cdot 4\%$$

$$V1 = \frac{10 \times 4}{6} = 6,6 \text{ ml ad } 10 \text{ ml DMSO } 0,5\%$$

$$\text{D. Ekstrak } 2\% = V1 \cdot M1 = V2 \cdot M2$$

$$4\% = 10 \text{ ml} \cdot 2\%$$

$$V1 = \frac{10 \times 2}{4} = 5 \text{ ml ad } 10 \text{ ml DMSO } 0,5\%$$

$$\text{E. Ekstrak } 1\% = V1 \cdot M1 = V2 \cdot M2$$

$$2\% = 10 \text{ ml} \cdot 1\%$$

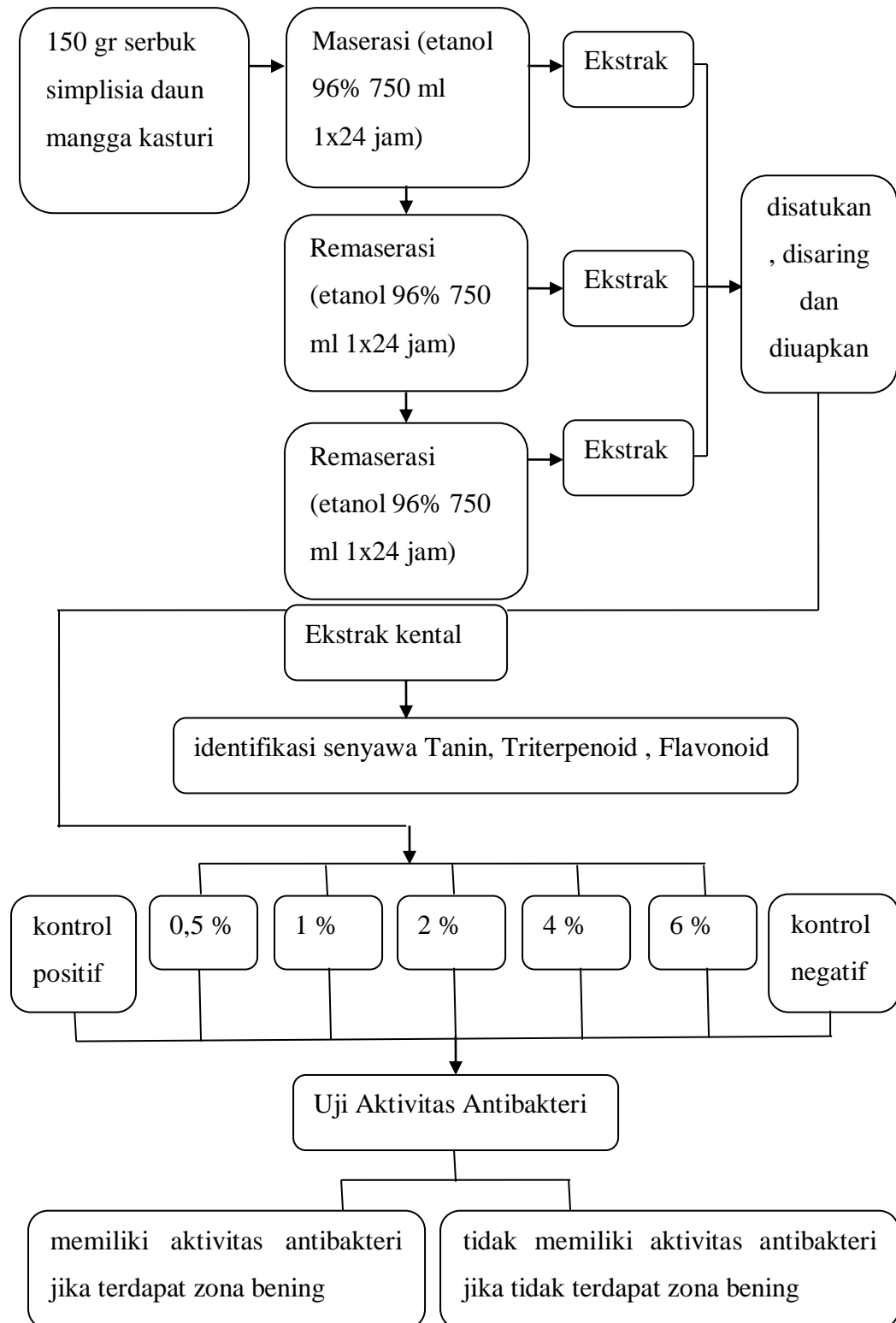
$$V1 = \frac{10 \times 1}{2} = 5 \text{ ml ad } 10 \text{ ml DMSO } 0,5\%$$

$$\text{F. Ekstrak } 0,5\% = V1 \cdot M1 = V2 \cdot M2$$

$$1\% = 10 \text{ ml} \cdot 0,5\%$$

$$V1 = \frac{10 \times 0,5}{1} = 5 \text{ ml ad } 10 \text{ ml DMSO } 0,5\%$$

## 2. Skema Kerja



Gambar 7. Skema kerja



## **F. Pengolahan dan Analisis Data**

Perolehan data hasil identifikasi metabolit sekunder dan uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini di buat dalam bentuk tabel, untuk analisis dari uji aktivitas antibakteri dianalisis secara deskriptif dalam bentuk diameter zona hambat dan dilakukan analisis uji statistik. Langkah awal dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Apabila data yang diperoleh terdistribusi secara normal dan homogen, maka dapat dilanjutkan uji One Way Anova dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji tersebut untuk melihat adanya perbedaan pada kemampuan aktivitas antibakteri ekstrak uji. Uji statistik Wilcoxon digunakan jika data yang didapat tidak memenuhi syarat uji normalitas dan uji homogenitas. Jika hasil uji One Way Anova ataupun Wilcoxon menunjukkan adanya perbedaan, dapat dilanjutkan uji post hoc dengan LSD pada Anova, tingkat kepercayaan bernilai 95% dengan nilai ( $p < 0,05$ ) dianggap terdapat perbedaan bermakna dan ( $p > 0,05$ ) dianggap tidak terdapat perbedaan bermakna.