



BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental dengan metode difusi cakram untuk mengetahui uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) terhadap pertumbuhan bakteri *methicillin-resistant staphylococcus aureus* (MRSA).

B. Lokasi Penelitian

Pembuatan ekstrak daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) dan penelitian uji aktivitas antibakteri ekstrak daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) terhadap pertumbuhan bakteri *methicillin-resistant staphylococcus aureus* (MRSA) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Fitokimia Program Studi S1 Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Semarang.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Tumbuhan Daun Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) diambil dari desa Beringin, Kec. Kusan Hilir, Kab. Tanah Bumbu, Provinsi Kalimantan Selatan.

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini yaitu 500 gram simplisia daun karamunting yang telah dihancurkan menggunakan blender.

D. Definisi Operasional

1. Bakteri *methicillin resistant staphylococcus aureus (MRSA)* adalah bakteri hasil biakan murni di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Sudarto, Tembalang, Kota Semarang. Bakteri ditanam pada media agar, kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
2. Aktivitas antibakteri ialah kemampuan suatu bahan dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan dan perbanyakan diri dari bakteri.
3. Ekstrak daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) merupakan ekstrak kental hasil ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.
4. Maserasi adalah proses perendaman simplisia daun karamunting yang sudah halus atau terbentuk serbuk dalam pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel sehingga zat-zat melarut.

E. Variable Penelitian

1. Variabel Bebas

Komponen senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) yang digunakan berbagai konsentrasi yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, 25% dan ciprofloxacin sebagai kontrol positif.

2. Variabel Terikat

Diameter zona hambat yang dihasilkan oleh senyawa uji.

F. Pengumpulan Data

1. Penyiapan sampel

a) Determinasi Tanaman

Dalam penelitian ini langkah pertama untuk menghindari kesalahan dalam penelitian yaitu dengan determinasi tanaman. Tanaman yang masih lengkap dengan akar, batang, daun, bunga, dan buahnya kemudian diambil dan dilakukan determinasi. Determinasi dilakukan di Laboratorium Ekologi Dan Biosistematika Fakultas Sains dan Matematika Departemen Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

b) Daun karamunting yang telah diambil kemudian dibersihkan dengan air mengalir, lalu dikeringkan didalam suhu ruangan dan sesekali di keluarkan dijemur diwabah matahari dan ditutup menggunakan kain hitam, setelah kering daun karamunting karamunting diblender hingga menjadi serbuk kasar kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 60 serbuk siap di ekstraksi.

G. Alat dan Bahan Penelitian Uji Aktivitas Antibakteri

1. Alat Penelitian

Beaker glass, kertas saring, autoklaf, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose inkubator, bunsen, penggaris, pipet mikro, swab kapas steril, *cotton bud*, Erlenmeyer, gelas ukur 100 mL (IWAKI), *rotary evaporator* RE-2000E,

pinset, neraca analitik (*Excellent scale*), *hot plate*, *waterbath*, cawan porselin, *cover glass*, kaca arloji.

2. Bahan Penelitian

Daun karamunting, etanol 96%, nutrient agar (KGaA) , *dimethyl sulfoxide* (DMSO) 10%, aquadest, aluminium foil, kultur Bakteri MRSA, ciprofloxacin infus, NaCl 10%, HCl pekat, logam magnesium, FeCl₃ 1%, kloroform, asam asetat anhidrat, garam gelatin.

H. Pengolahan Data

1. Pembuatan ekstrak daun karamunting

Serbuk daun karamunting sebanyak 500 gram dimaserasi dalam pelarut etanol sebanyak 1.500 mL selama 3x24 jam pada suhu kamar terlindung oleh sinar matahari dan sesekali diaduk setiap 5 jam. Residu dari sampel maserasi kemudian diremaserasi selama 1x24 jam dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1.500 mL. maserat yang dihasilkan dijadikan satu dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk pemekatan simplisia menjadi lebih kental maserat yang tersisa diuapkan diatas penangas dengan suhu 50°C sampai didapatkan ekstrak kental proses penguapan dihentikan ketika maserat yang didapat sudah terlihat kental secara visual dan dipastikan dengan pengukuran kadar air ekstrak tidak lebih dari 10%. Ekstrak kental yang didapat dari daun karamunting dihitung rendemennya dengan rumus:

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

2. Skrining fitokimia

a. Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 3 gram sampel diekstraksi dengan aquadest panas kemudian didinginkan. Setelah itu ditambahkan 5 tetes NaCl 10% dan disaring. Filtrat ditambah garam gelatin, kemudian diamati perubahan yang terjadi.

b. Pemeriksaan Saponin

Uji saponin dilakukan dengan metode Forth yaitu dengan cara memasukkan 2 gram sampel ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL aquadest lalu dikocok selama 30 detik, diamati perubahan yang terjadi. Apabila terbentuk busa yang mantap (tidak hilang selama 30 detik) maka identifikasi menunjukkan adanya saponin.

c. Pemeriksaan Flavonoid

Satu gram sampel diekstraksi dengan 5 mL etanol kemudian ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan 1,5 gram logam magnesium. Adanya flavonoid, diindikasikan dari terbentuknya warna pink atau merah magenta dalam waktu 3 menit

d. Pemeriksaan Fenol

Sebanyak 1 gram sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditetaskan FeCl_3 1% sebanyak 2 tetes. Hasil positif menunjukkan warna hijau atau hijau kehitaman.

3. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan harus di sterilisasi terlebih dahulu di dalam autoklaf dengan suhu 121°C. Khususnya untuk jarum ose disterilkan dengan cara dibakar menggunakan lampu Bunsen.

4. Pengukuran Kadar Air dengan Menggunakan *Moisture Analyser*

Pengukuran kadar air dengan menggunakan *Moisture Analyser* membutuhkan waktu yang sangat cepat yaitu hanya sekitar 3-15 menit. Pengukuran akan segera berhenti setelah sampel mengalami penurunan berat lebih rendah dari 1 mg per 90 s (Zhu, *et al*, 2015). Dengan waktu yang singkat tentunya hal ini membantu dalam mempersingkat waktu pengujian.

5. Pembuatan Media *Nutrien Agar* (NA)

- a. Media NA ditimbang sebanyak 5 gram kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 250 mL dan dipanaskan di atas *hot plate* sampai homogen.
- b. Media NA yang sudah homogen dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL dan sisanya dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas.
- c. Media NA disterilisasi dalam autoklaf.
- d. Media NA dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dimiringkan (Ro'isah & Khoirur, 2019).

6. Inokulasi Suspensi Bakteri pada Media Agar

Diambil koloni bakteri dengan menggunakan jarum ose, kemudian ditanamkan pada media nutrient agar dengan cara menggoreskan, setelah itu diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

7. Uji Aktivitas Antibakteri

Media agar dituang ke dalam cawan petri steril, kemudian diberi penamaan sesuai dengan konsentrasi ekstrak yang di uji yaitu :

1. Ekstrak konsentrasi (5 %, 10 %, 15%, 20%, 25%)
2. Kontrol negatif yaitu DMSO 10%
3. Kontrol positif yaitu antibiotik ciprofloxacin
4. Kontrol Bakteri MRSA

Cakram kertas ditetesi dengan masing-masing konsentrasi zat uji yang telah disiapkan menggunakan mikro pipet kemudian diletakkan pada permukaan media agar yang telah di inkubasi dengan mikroba, kemudian dilakukan inkubasi ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam, setelah itu dilakukan pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan penggaris. Hal ini dilakukan untuk mengukur kekuatan hambatan dari ekstrak yang di uji terhadap mikroorganisme yang diuji. Rumus mengukur kekuatan hambatan ekstrak sebagai berikut :

IP = Diameter Zona Bening – Diameter Zona Kertas Cakram

Keterangan : IP (Indeks Penghambatan)

8. Perhitungan Pengenceran Konsentrasi

a. $\text{DMSO } 100\% = \frac{100 \text{ gram}}{100 \text{ mL}}$

$$\text{DMSO } 10\% = V1 \cdot M1 = V2 \cdot M2$$

$$V1 \cdot 100\% = 50 \text{ mL} \cdot 10\%$$

$$V1 = \frac{50 \times 10}{100} = 5 \text{ mL ad } 50 \text{ mL Aquadest}$$

b. $\text{Ekstrak } 25\% = \frac{25 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} = \frac{2,5 \text{ gram}}{10 \text{ mL}} = 2,5 \text{ gram ad } 10 \text{ mL DMSO } 10\%$

c. $\text{Ekstrak } 20\% = \frac{20 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} = \frac{2 \text{ gram}}{10 \text{ mL}} = 2 \text{ gram ad } 10 \text{ mL DMSO } 10\%$

d. $\text{Ekstrak } 15\% = \frac{15 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} = \frac{1,5 \text{ gram}}{10 \text{ mL}} = 1,5 \text{ gram ad } 10 \text{ mL DMSO } 10\%$

e. $\text{Ekstrak } 10\% = \frac{10 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} = \frac{1 \text{ gram}}{10 \text{ mL}} = 1 \text{ gram ad } 10 \text{ mL DMSO } 10\%$

f. $\text{Ekstrak } 5\% = \frac{5 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} = \frac{0,5 \text{ gram}}{10 \text{ mL}} = 0,5 \text{ gram ad } 10 \text{ mL DMSO } 10\%$

9. Identifikasi Bakteri MRSA

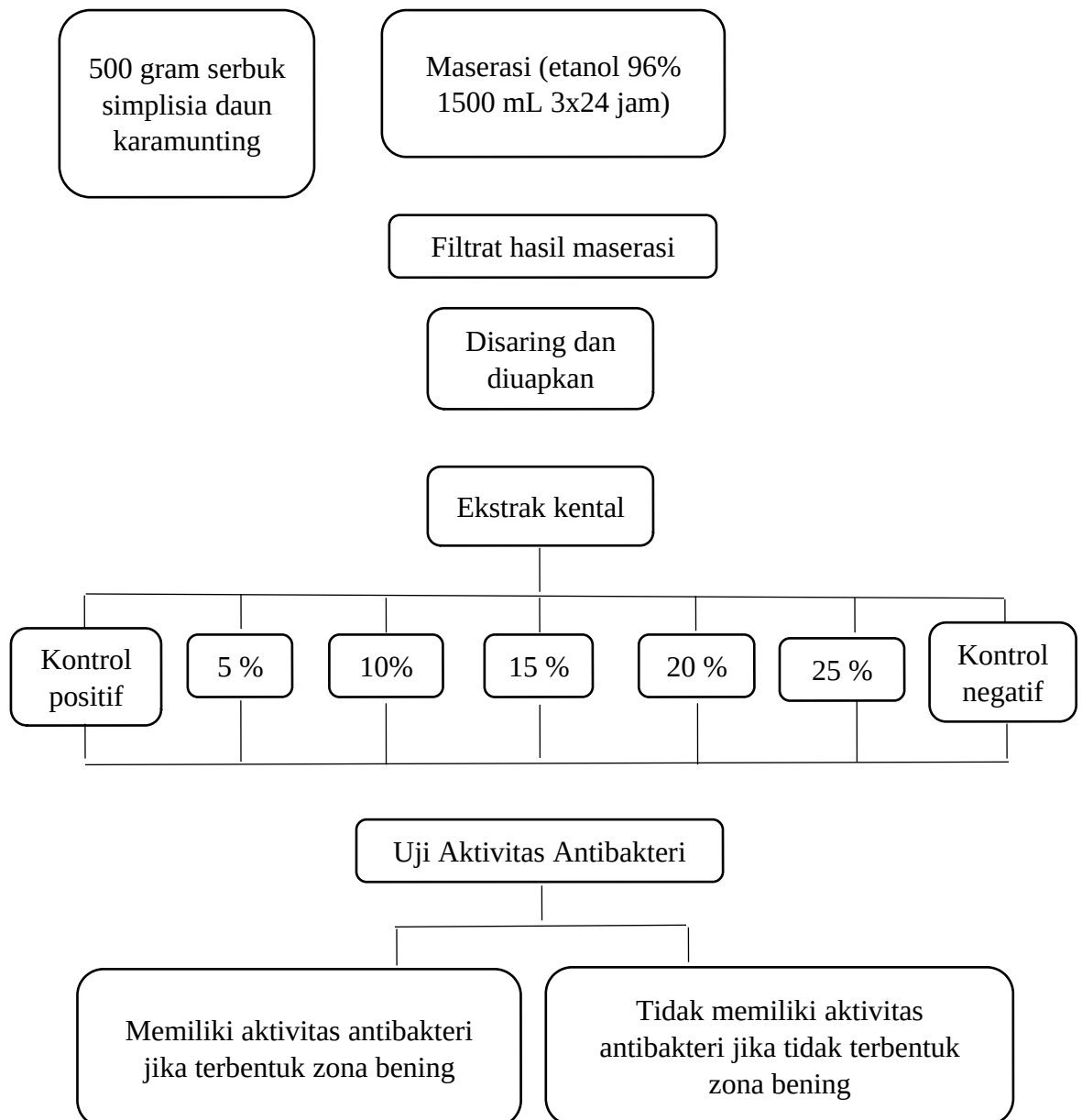
Pewarnaan bakteri MRSA yang dilakukan adalah pewarnaan gram. Pewarnaan bakteri dilakukan untuk identifikasi dan untuk memastikan tidak ada kontaminan pada kultur kerja. Objek kaca yang digunakan dibersihkan dengan alkohol 96% dan dikeringkan. Kemudian ditambahkan aquadest 1 tetes di atas objek kaca dan diambil biakan bakteri yang akan dilakukan

pewarnaan dengan jarum ose steril (biakan bakteri yang diambil hanya 1 koloni saja), kemudian biakan diratakan di permukaan objek kaca yang telah berisi aquadest. Objek kaca kemudian difiksasi dengan api bunsen (lewatkan diatas api 2-3 kali). Setelah kering, pertama ditetesi dengan pewarna *Crystal Violet* kemudian ditunggu 1 menit lalu dibilas dengan aquadest. Kedua ditetesi dengan lugol dan ditunggu 1 menit lalu dibilas dengan aquadest. Ketiga dibilas dengan alkohol 96% lalu bilas aquadest. Keempat ditetesi dengan pewarna Safranin dan ditunggu 1 menit lalu dibilas dengan aquadest, kemudian keringkan objek kaca dengan tisu lalu periksa dengan mikroskop (perbesaran 100 x 10). Bakteri MRSA berwarna ungu berbentuk kokus merupakan bakteri gram positif.

10. Analisis Data

Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan program computer *International Business Machines corporation Statistical Package for the Social Sciences* (IBM SPSS) Statistics deskriptif dan normalitas data diuji dengan (*Shapiro-Wilk*). Data yang terdistribusi normal dianalisis secara statistik parametrik menggunakan *Analysis of Variance (ANOVA)*. Data yang tidak terdistribusi normal dianalisis secara statistik non-parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Jika data uji *Kruskal Wallis* tidak terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Perbedaan dikatakan signifikan jika $p < 0,05$.

11. Skematis Kerja



Gambar 6. Skema Kerja