

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian yang bersifat eksperimental di laboratorium, dengan tujuh kelompok perlakuan yaitu infusa dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40, 50% b/v dan dua kelompok kontrol yaitu kontrol positif (kloramfenikol 30 µg) dan kontrol negatif (aquadest). Variabel bebas adalah konsentrasi infusa daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) dan variabel terikatnya yaitu zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus*.

Pengulangan pada penelitian ini adalah (Hanafiah, 2001:6)

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

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

$$6r-6 \geq 15$$

$$6r \geq 15+6$$

$$6r \geq 21$$

$$r \geq \frac{21}{6}$$

$$r \geq 3,5 \approx 4$$

Keterangan : r = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

15 = tetapan yang telah ditentukan

#### B. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah infusa daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40 % dan 50% b/v.

### C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang untuk melakukan proses identifikasi tanaman, proses ekstraksi infundasi, uji skrining fitokimia, serta pengujian aktivitas antibakteri. Waktu penelitian ini dilaksanakan mulai Maret-Mei tahun 2021.

### D. Alat dan bahan

#### 1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, gelas ukur 100 ml, beaker glass 1000 ml, beaker glass 100 ml, mikropipet, labu ukur, tabung reaksi, erlenmeyer 100 ml, kaca arloji, batang pengaduk, oven, autoklaf, inkubator, cawan petridish, cawan penguap, *hot plate*, lampu spiritus, aluminium foil, kapas steril, blender, ose, pinset, corong gelas, spatula, jangka sorong, disc kosong, disc Streptomisin 10 µg, spidol, kertas tempel, kertas saring, kertas buram.

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) Aquadest, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Mueller Hinton Agar* (MHA), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, BaCl<sub>2</sub> 1%, NaCl 0,9%, HCl 2N, Pereaksi Mayer, Pereaksi Bouchardat, Pereaksi Dragendrof, Serbuk Mg, HCl (P), H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (P), dan FeCl<sub>3</sub> 1%.

### E. Prosedur Kerja Penelitian

#### 1 Identifikasi Tanaman Mantangan

Tanaman daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) Daun Berbangun jantung sampai dengan bulat, tekstur daun halus. Pangkal daun mantangan berbentuk bulat ataupun hati. Memiliki daun yang berwarna merah marun ketika daun masih muda. Tulang daun mantangan menyirip dan berwarna merah marun, dapat terlihat jelas pada bagian belakang daun mantangan. Tepi daun rata. tangkai daun berada di bagian tengah atau peltate. Daun mantangan ini dapat tumbuh melebar sekitar 7 cm sampai 30 cm.

Batang ketika muda tampak berwarna marun lalu hijau lunak, tumbuh menjadi batang berwarna hijau dan lebih keras (padat berisi), lalu terus tumbuh berwarna coklat dan semakin keras berkayu, akar tidak akan dijumpai ketika sulur batang hanya menyentuh atau merambat batang tanaman lain atau tiang-tiang penyangga, Bunga tumbuh lebih dari satu, memiliki warna bunga yang bervariasi dari putih hingga kuning, tumbuhan ini tumbuh di atas di lahan rerumputan, semak-semak belukar. Daun mantangan didapatkan di daerah Ketapang, Kabupaten Pesawaran.

## 2. Pembuatan Simplisia Daun Mantangan

- a. Daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) segar diambil.
- b. Dilakukan sortasi basah dengan memisahkan daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) dari kotoran dan bahan asing lain seperti batang dan tangkai.
- c. Dicuci bersih daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) menggunakan air mengalir.
- d. Dilakukan perajangan daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) untuk memperkecil ukurannya.
- e. Daun mantangan diletakkan di atas nampan yang ditutupi dengan kain hitam
- f. Kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari.
- g. Dilakukan sortasi kering dengan cara pemilihan daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) dari bahan yang rusak atau terkena kotoran.
- h. Diperhalus daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) merr.) dengan menggunakan blender menjadi serbuk kering.
- i. Daun mantangan yang sudah halus diayak menggunakan ayakan No.44.

## 3. Infundasi Daun Mantangan dengan Pelarut air

- a. Disiapkan wadah yaitu bejana yang digunakan untuk infudasi.
- b. Ditimbang serbuk kering daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) pada neraca analitik, dimasukkan ke dalam panci infusa.
- c. Ditambahkan 100 ml aquades steril sehingga semua daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) terendam larutan tersebut dan di panaskan sampai suhu 90°C selama 15 menit dan diaduk
- d. Kemudian disaring menggunakan kertas saringdan dipisahkan antara hasil

saringan dan endapan

- e. Kemudian infusa ini ditampung dalam labu erlenmeyer steril dan ditutup rapat
- f. Bila volume infusa kurang dari 100 ml ditambah aquades steril hingga volume sampai 100 ml (Bimmahariyanto, Suhada, dan Hamdani 2019).

#### 4. Skrining Fitokimia

##### a. Pemeriksaan Alkaloid

Identifikasi menggunakan 2 ml infusa daun mantangan 10%, 20%, 30%, 40 % dan 50% b/v. masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 5 ml HCl 2N dan dipanaskan pada penangas air, setelah dingin disaring dan filtrat

- 1) Diambil 3 tetes filtrat lalu ditambahkan 2 tetes reagen Mayer. Keberadaan alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan atau kekeruhan
- 2) Diambil 3 tetes filtrat lalu ditambahkan 2 tetes reagen bouchardat. Keberadaan alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan coklat hitam
- 3) Diambil 3 tetes filtrat lalu ditambahkan 2 tetes reagen dragendorf. Keberadaan alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan merah bata  
Apabila terdapat endapan putih paling sedikit dengan 2 atau 3 dari pengujian diatas, maka dinyatakan positif mengandung alkaloid (Marjoni, 2016:8).

##### b. Pemeriksaan Flavonoid

Identifikasi menggunakan 2 ml infusa daun mantangan 10%, 20%, 30%, 40 % dan 50% b/v. masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 500 mg serbuk magnesium, ditambahkan 1 ml HCl pekat, kemudian ditambahkan 2 ml amil alkohol, dikocok hingga memisah  
Terbentuknya warna jingga, merah, kuning pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Marjoni, 2016:9).

##### c. Pemeriksaan Saponin

Identifikasi menggunakan 2 ml infusa daun mantangan 10%, 20%, 30%, 40 % dan 50% b/v. masing-masing ditambahkan dengan 10 ml aquades panas didinginkan dan dikocok. Terbentuknya busa atau buih yang stabil selama 10 menit setinggi 1-10 cm, kemudian ditambahkan HCl 2N apabila

buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Marjoni, 2016:10).

d. Pemeriksaan terpenoid atau steroid

Identifikasi menggunakan 5 ml infusa daun mantangan 10%, 20%, 30%, 40 % dan 50% b/v. masing-masing ditambahkan 20 ml n-heksana dimasukkan ke dalam cawan selama 2 jam lalu diuapkan pada sisa, ditambahkan dengan 1 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Jika terbentuk warna ungu dan kemerahan, kemudian berubah menjadi hijau biru menunjukkan adanya terpenoid dan steroid (Marjoni, 2016:12).

e. Pemeriksaan fenol

Identifikasi menggunakan 2 ml infusa daun mantangan 10%, 20%, 30%, 40 % dan 50% b/v. masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 ml air panas dan tiga tetes  $\text{FeCl}_3$  0,1%. Terbentuknya warna biru, hijau atau ungu menunjukkan adanya fenol (Rheza, 2015).

5. Pewarnaan Gram

Menurut (Sahli dan Kurniawan, 2019:13).

- a. Buat preparat ulas dari bakteri *staphylococcus aureus*, kemudian fiksasi diatas nyala api
- b. Beri larutan kristal violet selama 1 menit
- c. Miringkan kaca objek di atas bak pewarna untuk membuang kelebihan kristal violet, lalu bilas dengan air suling
- d. Tiriskan kaca objek dengan menegakkan sisi pada kaca objek diatas kertas serap, dan kembalikan ke atas rak pewarna
- e. Beri larutan iodium selama 1 menit
- f. Miringkan kaca objek untuk membuang kelebihan iodium lalu bilas dengan air suling dari botol pijit
- g. Cuci dengan etanol 95%, tetes demi tetes selama 30 detik atau sampai zat warna kristal violet tidak terlihat lagi mengalir dari kaca objek
- h. Cuci dengan air, lalu tiriskan, lalu kembalikan di rak pewarna
- i. Beri safranin selama 1 menit
- j. Miringkan kaca objek untuk membuang kelebihan safranin lalu bilas dengan air
- k. Tiriskan kaca objek dan serap kelebihan air pada olesan dengan menekankan

kertas serap hati-hati di atasnya

1. Amati dibawah mikroskop dengan lensa objektif.

6. Sterilisasi Alat

Semua alat yang terbuat dari kaca dicuci bersih dan dikeringkan, setelah itu dibungkus dengan kertas buram. Sterilisasi dilakukan dengan oven pada suhu 160°C selama 1 jam, sedangkan jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara pemijaran. (Hamidy; dkk, 2006). Untuk bahan seperti media dan aquades setelah dilarutkan, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditutup dengan kapas dan alumunium foil, lalu dimasukkan autoklaf dan disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

7. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar (MHA)*

*Mueller Hinton Agar* ditimbang sebanyak 38,0 gram dalam 1 L aquades kemudian dipanaskan hingga mendidih pada hot plate hingga larut kemudian ditutup dengan kapas yang dibungkus alumunium foil, lalu disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, dan dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 45°C-50°C dan dituangkan ke dalam cawan petridish (Safitri dan Novel, 2010:80)

8. Pembuatan *Nutrient Agar (NA)*

*Nutrient Agar* ditimbang sebanyak 28,0 gram dalam 1 L aquades kemudian, dipanaskan sampai mendidih pada hot plate hingga larut kemudian ditutup dengan kapas yang dibungkus alumunium foil, lalu disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, dan dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 40°C-45°C kemudian dimiringkan (Safitri dan Novel, 2010:78).

9. Pembuatan *Nutrient Broth (NB)*

*Nutrient Broth* ditimbang sebanyak 13.0 gram dalam 1 L aquades lalu, dipanaskan hingga mendidih pada hot plate hingga larut kemudian, ditutup dengan kapas yang dibungkus alumunium foil, lalu disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, dan dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 40°C-45°C kemudian masukkan kedalam tabung reaksi (Safitri dan Novel, 2010:46).

#### 10. Pembuatan NaCl 0,9%

Ditimbang sebanyak 0,45 gram NaCl kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml, ditambahkan dengan aquadest hingga 50 ml lalu dihomogenkan. Larutan NaCl dituangkan kedalam tabung reaksi sebanyak 5 ml, kemudian ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil kemudian disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm (Salsabila, 2020).

#### 11. Pembuatan Standar Mac Farland 0,5

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sebanyak 9,95 ml kedalam tabung reaksi lalu dicampurkan dengan larutan BaCl<sub>2</sub> 1% sebanyak 0,05 ml, lalu dikocok hingga homogen. Sebelum menggunakan kocok terlebih dahulu agar larutan merata (Nuria, 2010).

#### 12. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil satu mata ose biakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah diremajakan pada media *Nutrient Agar Slant (NAS)* disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 ml media *Nutrient Broth (NB)* kemudian kocok hingga homogen dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri tersebut kekeruhannya dibandingkan dengan larutan standar Mac Farland 0,5 apabila suspensi bakteri keruh maka ditambahkan NaCl 0,9% steril, jika kurang keruh ditambahkan bakteri hingga kekeruhannya sama dengan standar Mac Farland (Nuria, 2010).

#### 13. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Uji Aktivitas Antibakteri (Iswara, 2015).

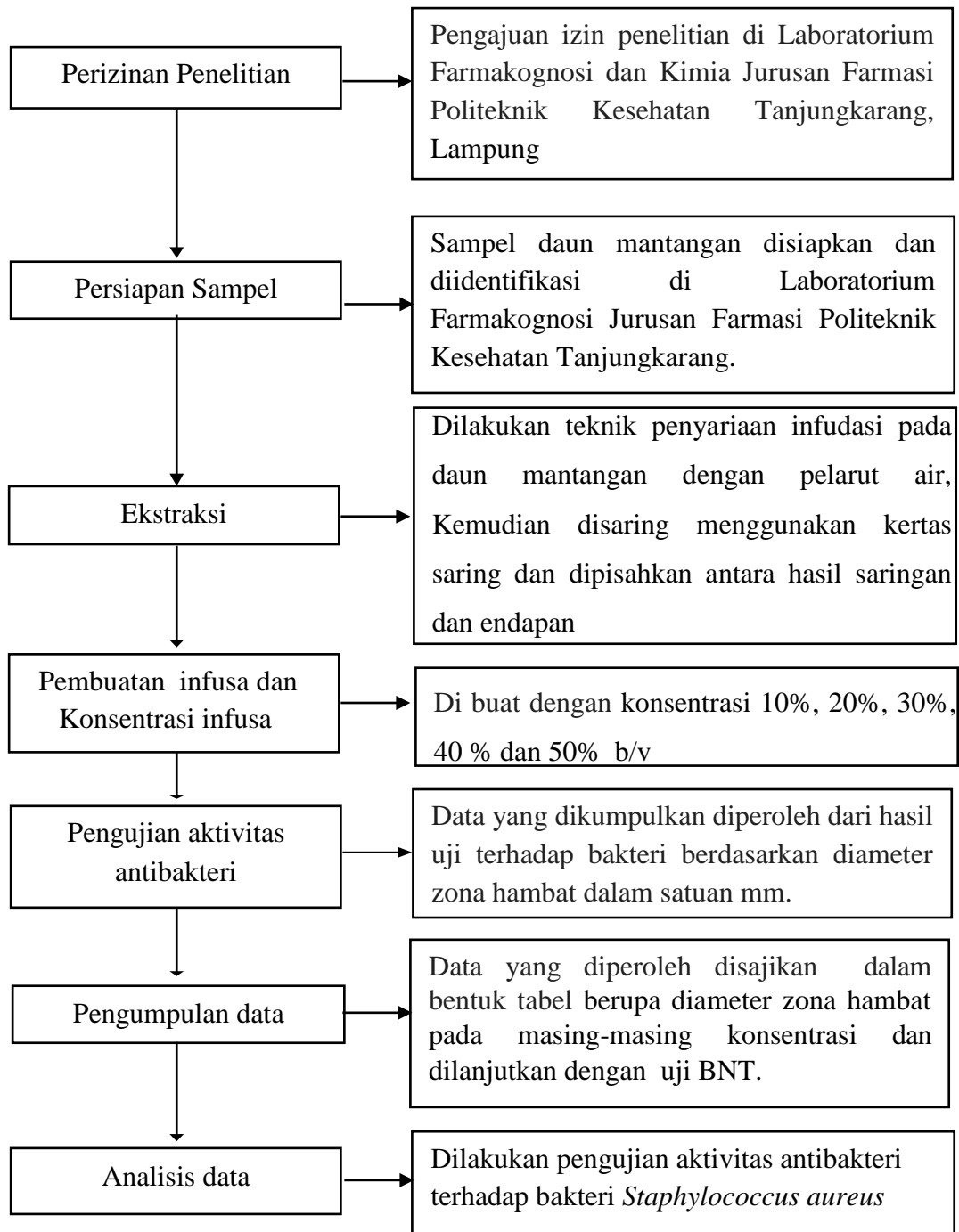
- a. Alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan terlebih dahulu.
- b. Lidi kapas steril dimasukkan ke suspensi bakteri yang sudah disamakan kekeruhannya dengan standar Mac Farland 0,5 selama 10-15 detik.
- c. Lidi kapas diangkat dan diperas dengan cara ditekan pada dinding bagian dalam tabung sambil diputar-putar.
- d. Lidi kapas dipulaskan pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) sampai merata.
- e. Media yang telah dipulaskan dibiarkan selama 15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam media. Kemudian dilakukan proses penempelan disk yang

telah direndam pada kontrol negatif, infundasi daun mantangan dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40 % dan 50% selama 15 menit, lalu ditempelkan di atas pulasan bakteri pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) menggunakan pinset steril dengan cara ditekan satu persatu supaya disk cakram menempel dengan baik pada media, lalu diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37° C selama 24 jam.

- f. Diameter zona hambat yang terjadi pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) diukur dengan menggunakan jangka sorong (dalam satuan mm).



## F. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

### **G. Pengumpulan Data**

Data diperoleh berdasarkan hasil pengamatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* disekitar disk pada setiap konsentrasi ditandai dengan adanya daerah bening, lalu diukur menggunakan alat ukur jangka sorong dengan satuan milimeter (mm) yang kemudian dicatat dan didokumentasikan sebagai salah satu bukti pada penelitian ini dan dilanjutkan pengumpulan data yang diperoleh kemudian dimasukkan kedalam tabel.

### **H. Pengolahan dan Analisis Data**

Data-data hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel hasil penelitian berupa diameter zona hambat dalam satuan mm pada masing-masing konsentrasi, untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan hasil infundasi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan uji statistik ANOVA (*Analysis of Varians*). Apabila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada tingkat kesalahan 5% untuk menentukan perlakuan-perlakuan mana yang berbeda diantara perlakuan lainnya.