

## BAB III METODE PENELITIAN

### A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian yang bersifat eksperimental di laboratorium, dengan lima kelompok perlakuan yaitu ekstraksi *Soxhletasi* dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm v/v dan dua kelompok kontrol yaitu kontrol positif (Kloramfenikol 30 µg) dan kontrol negatif (akuades). Variabel bebas adalah konsentrasi ekstrak etanol 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 ekstrak etanol daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) hasil dari ekstraksi *Soxhletasi* dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm v/v.

### C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi, Kimia, dan Steril Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang. Waktu penelitian ini dilaksanakan mulai Februari-Mei tahun 2022.

## D. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- |  |  |
|--|--|
| – Neraca analitik                                  | – Batang pengaduk                                  |
| – Alat <i>Soxhlet</i>                              | – Oven   |
| – Gelas ukur 250 mL                                | – Autoklaf   |
| – <i>Cotton</i> steril                             | – Inkubator  |
| – Pipet mikro 50 mL                                | – Cawan <i>petridish</i>                           |
| – Tabung reaksi                                    | – Cawan penguap                                    |
| – Spatula  | – <i>Heating mentle</i>                            |
| – Kaca arloji                                      | – Lampu spiritus                                   |
| – Blender  | – <i>Ose</i>                                       |
| – Corong gelas                                     | – Sudip  |
| – Jangka sorong                                    | – Spidol   |
| – <i>Beaker glass</i> 100 mL, 50 mL,<br>dan 250 mL | – <i>Erlenmeyer</i> 100 mL, 250<br>mL, dan 1000 mL |

### 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- |  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| – Daun mantangan ( <i>Merremia</i><br><i>peltata</i> (L.) Merr.) | – Etanol 96%                          |
| – <i>Nutrient Broth</i> (NB)                                     | – <i>Nutrient Agar</i> (NA)           |
| – Akuades  | – <i>Mueller Hinton Agar</i><br>(MHA) |
| – Kertas buram   | – H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%   |
| – BaCl <sub>2</sub> 1%   | – NaCl 0,9%,                          |
| – HCl 2N   | – Pereaksi <i>Mayer</i>               |
| – Pereaksi <i>Bouchardat</i>                                     | – Pereaksi <i>Dragendrof</i>          |
| – Serbuk Mg  | – HCl (P)                             |
| – H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (P)               | – FeCl <sub>3</sub> 1%                |
| – Amil alkohol   | – Asetat anhidrat                     |
| – N-heksan   |                                       |

## E. Prosedur Kerja Penelitian

### 1. Identifikasi Tanaman Mantangan

Tanaman daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.). Daun berbentuk 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 lahan rumput, semak-semak belukar. Daun mantangan didapatkan di daerah Ketapang, Kabupaten Pesawaran. Identifikasi tanaman dilakukan oleh peneliti berdasarkan literatur yaitu buku Ooststroom and Hoogland (1953). Identifikasi ini dilakukan untuk mengidentifikasi kebenaran sampel daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.).

### 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 proses perajangan daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) untuk memperkecil ukurannya.
- e. Daun mantangan diletakkan di atas nampan yang ditutupi dengan kain hitam kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari langsung.

- f. Dilakukan sortasi kering dengan cara pemilihan daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) dari bahan yang rusak atau terkena kotoran.
  - g. Diperhalus ukuran daun mantangan (*Merremia peltata* (L.) Merr.) dengan menggunakan blender menjadi serbuk kering.
  - h. Daun mantangan yang sudah halus diayak menggunakan ayakan No.44.
3. Ekstraksi *Soxhletasi* Daun Mantangan dengan Pelarut Etanol 96%
    - a. Disiapkan alat *Soxhlet*.
    - b. Sampel yang sudah dihaluskan, ditimbang sebanyak 20 g dan dibungkus dengan kertas saring berbentuk silinder dan diikat dengan tali, kemudian sampel ditempatkan dalam "*Thimble*" (selongsong tempat sampel).
    - c. Masukkan pelarut yaitu etanol 96% ke dalam labu alas bulat 200 mL dan letakkan di atas *heating mantle*.
    - d. Alat *Soxhlet* dirangkai dan pastikan air untuk pendingin berjalan.
    - e. Nyalakan *heating mantle* pada suhu 60 °C.
    - f. Pelarut akan panas, kemudian menguap dan naik melewati pipa F menuju kondensor. Air yang mengalir melewati bagian luar kondensor akan mengembunkan uap pelarut sehingga kembali ke fase cair, kemudian menetes secara teratur pada *Thimble* (selongsong) yang berisi sampel. Pelarut secara perlahan akan merendam sampel dan melarutkan zat aktif yang terdapat dalam *Thimble*. Ketika pelarut telah memenuhi ruangan bahan, sifon akan mengeluarkan seluruh pelarut kembali menuju labu alas bulat.
    - g. Satu siklus *Soxhlet* berakhir ketika sifon mengeluarkan seluruh isinya menuju labu alas bulat. Siklus tersebut dilakukan berulang-ulang hingga seluruh senyawa yang diinginkan terekstraksi (pelarut yang di keluarkan oleh *sifon* berwarna jernih).
    - h. Setelah proses ekstraksi selesai, matikan *heating mantle*, kemudian hasil ekstrak di kentalkan di *waterbath* dengan suhu 70 °C.

#### 4. Skirining Fitokimia

##### a. Pemeriksaan Alkaoid

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 0,5 g, ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air suling, lalu dipanaskan di atas tangas air selama 2 menit, setelah selesai kemudian dinginkan lalu saring. Filtrat digunakan untuk percobaan berikut:

- 1) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi *Mayer* akan menghasilkan endapan putih atau kuning.
- 2) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi *Bouchardat* akan menghasilkan endapan coklat hitam.
- 3) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi *Dragendrof* akan menghasilkan endapan merah bata.

Apabila terdapat endapan putih paling sedikit 2 atau 3 dari pengujian diatas, maka simplisia dinyatakan positif mengandung alkaloid.

##### b. Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 10 g serbuk simplisia ditambahkan dengan 100 mL air panas, didihkan selama kurang lebih 5 menit, kemudian disaring ketika panas. Filtrat yang diperoleh kemudian di ambil sebanyak 5 mL lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg, 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol, dikocok, dan biarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (cincin).

##### c. Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 0,5 g sampel dimasukan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air suling panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, akan terbentuk buih atau busa yang selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes larutan HCl 2 N, jika buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin.

d. Pemeriksaan Steroid/Terpenoida

Sebanyak 1 g sampel dimaserasi dengan 20 mL n-heksan selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap. Pada sisa ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Senyawa steroid ditunjukkan dengan warna hijau biru, dan senyawa terpenoid ditunjukkan dengan warna ungu atau merah.

e. Pemeriksaan Fenol

Ekstrak sampel 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 tetes air panas dan 3 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  3%. Jika warna larutan berubah menjadi warna hijau kebiruan atau biru gelap, menunjukkan adanya senyawa fenol.

5. Pewarnaan Gram

- a. Dibersihkan kaca objek dengan cara di usap searah dengan kapas alkohol 70%.
- b. Diberi tanda pada kaca objek bagian belakang.
- c. Ditetaskan  $\text{NaCl}$  0,9 % pada kaca objek.
- d. Dipijarkan *ose* hingga pijar menggunakan lampu spirtus kemudian diambil bakteri dari tabung 2-3 mata *ose*, lalu diratakan bagian depan kaca objek yang telah diberi tanda. *Ose* yang telah digunakan dibakar lagi.
- e. Difiksasi kaca objek pada hawa panas bunsen hingga sampel kering kemudian dibiarkan hingga dingin.
- f. Ditetaskan gram A (violet) pada sampel ditunggu hingga 2 menit lalu dibilas dengan meneteskan air pada kaca objek.
- g. Ditetaskan gram B (lugol) pada sampel, ditunggu hingga 1 menit lalu dibilas dengan meneteskan air pada kaca objek.
- h. Ditetaskan gram C (alkohol 96%) pada sampel ditunggu hingga 30 detik lalu bilas dengan air pada kaca objek.
- i. Ditetaskan gram D (safranin) pada sampel, ditunggu hingga 30 detik lalu bilas dengan air pada kaca objek, lalu dikeringkan kaca objek.
- j. Diamati sampel menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali dengan ditetesi minyak anisol.

## 6. Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan dan 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. Untuk bahan seperti media dan akuades setelah dilarutkan, lalu dimasukkan ke dalam *Erlemeyer*, ditutup dengan kapas dan alumunium foil, lalu dimasukkan autoklaf dan disterilkan pada suhu 121 °C selama 15 menit.

## 7. Pembuatan Larutan Uji

- a. Ekstrak yang didapat dari daun mantangan yang sudah diuapkan, ekstrak berupa kental dianggap sebagai ekstrak dengan konsentrasi 100% sebagai larutan induk.
- b. Larutan induk tersebut dibuat larutan konsentasi 1% (10000 ppm) kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm dengan aquadest sebagai pelarutnya.
- c. Pengenceran konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm digunakan metode pengenceran bertingkat menggunakan rumus:

$$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$$

Keterangan:

$V_1$  : Jumlah volume yang digunakan (mL)

$V_2$  : Jumlah volume yang diinginkan (mL)

$\%_1$  : Konsentrasi yang tersedia (%)

$\%_2$  : Konsentrasi yang akan dibuat (%)

## 8. Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

*Muller Hinton Agar* ditimbang sebanyak 10,2 g dalam 300 mL aquadest kemudian dipanaskan 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 *petridisk*.

9. Pembuatan *Nutrient Agar* (NA)

*Nutrient Agar* ditimbang sebanyak 1 g dalam 50 mL akuades kemudian, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut kemudian ditutup dengan kapas yang dibungkus aluminium 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.

10. Pembuatan *Nutrient Broth* (NB)

*Nutrient Broth* ditimbang sebanyak 0,4 g dalam 50 mL akuades lalu, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut kemudian, ditutup dengan kapas yang dibungkus aluminium 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 ke dalam tabung reaksi.

11. Pembuatan Standar *Mac Farland* 0,5

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sebanyak 9,95 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampurkan dengan larutan BaCl 1% sebanyak 0,05 mL, lalu dikocok hingga homogen. Sebelum menggunakan kocok terlebih dahulu agar larutan merata.

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* (NA) 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*.

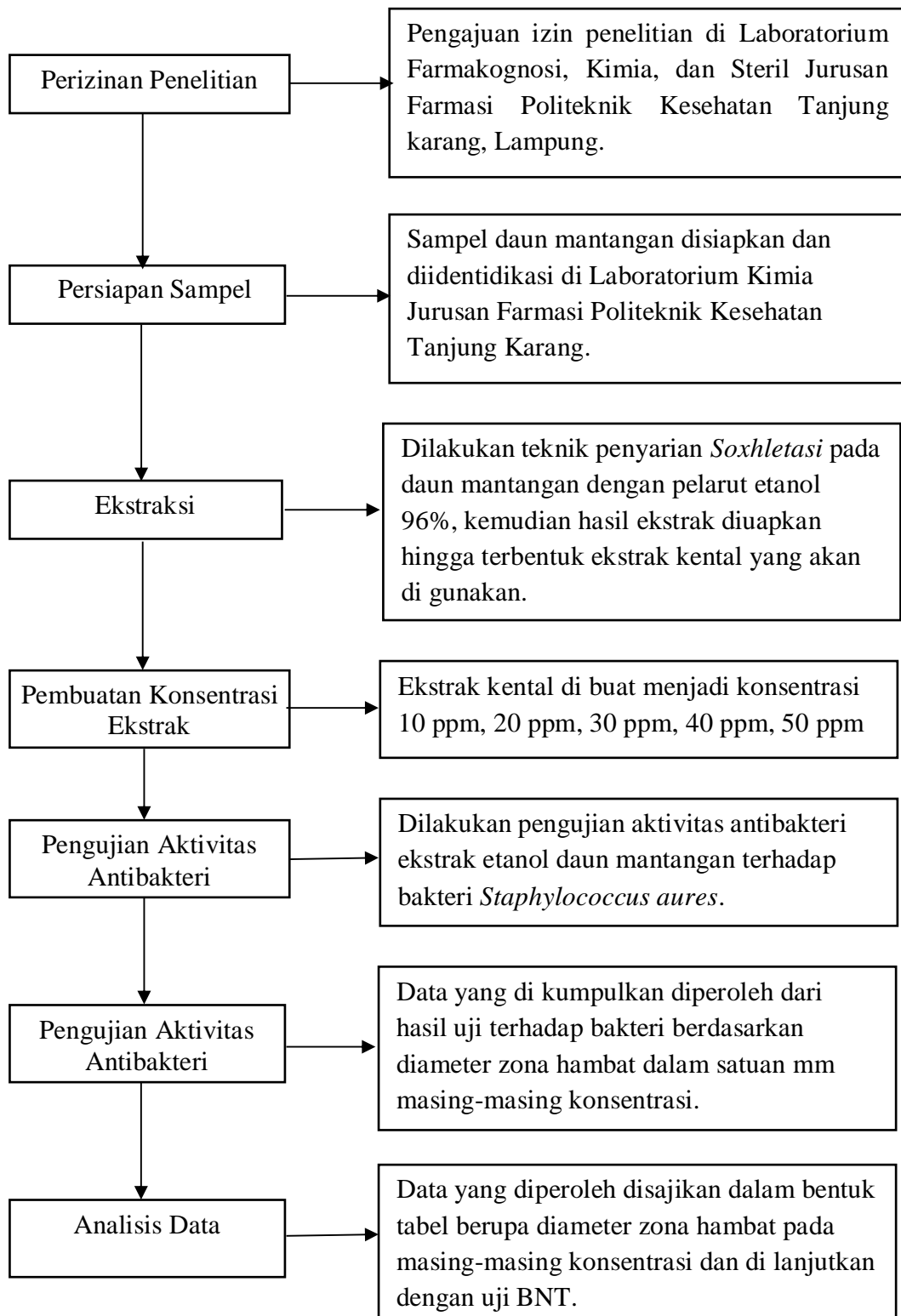
13. Pengujian Aktivitas Antibakteri

- 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 5 - 15 detik agar suspensi bakteri meresap ke dalam media.
- f. Kemudian dilakukan proses penempelan *disk* yang telah direndam pada kontrol negatif, ekstrak etanol daun mantangan dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm selama 3 – 10 detik, lalu ditempelkan di atas pulasan bakteri pada media MHA (*Muller Hinton Agar*) dengan menggunakan pinset steril yang dilakukan dengan cara ditekan satu persatu supaya *disk* cakram menempel dengan baik pada media, lalu diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam.
- g. Diameter zona hambat yang terjadi pada media MHA (*Muller Hinton Agar*) akan diukur dengan menggunakan jangka sorong (dalam satuan mm), kemudian dicatat dan dimasukkan ke dalam tabel pengumpulan data.

## F. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

### **G. Pengumpulan Data**

Data diperoleh berdasarkan hasil uji skirining fitokimia dengan berbagai pereaksi untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun mantangan serta pengamatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* disekitar *disk* pada setiap konsentrasi ditandai dengan adanya daerah bening, lalu diukur menggunakan alat ukur jangka sorong dengan satuan millimeter (mm) yang kemudian dicatat dan didokumentasikan sebagai salah satu bukti pada penelitian ini dan dilanjutkan pengumpulan data yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam 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 ekstrak etanol dengan metode ekstraksi *Soxhletasi* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan uji statistik ANOVA (*Analysis of Varians*). Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) akan dilanjutkan jika terdapat perbedaan nyata, pada tingkat kesalahan 5% untuk menentukan perlakuan-perlakuan yang mana berbeda dengan yang lain.