

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian kuantitatif berupa eksperimental yang membandingkan efektivitas dari kelompok perlakuan dan kontrol. Metode untuk mengekstraksi daun rosella yaitu metode maserasi dimana larutan yang digunakan yaitu etanol 70%. metode yang dipakai yakni difusi sumuran karena untuk melihat adanya hambatan daun rosella pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*.

B. Lokasi dan Waktu

Uji determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan. Proses ekstraksi, uji kontrol kualitas dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi dan uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2022.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi pada penelitian ialah ekstrak daun rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang masih segar dan berwarna hijau diambil di Krajan 1, RT 02/RW 01, Kiyudan, Majaksingi, Kecamatan Borobudur, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah, terletak di ketinggian 265 pl 7⁰ 36' 28'' LS dan 110⁰ 12' 13'' BT.
2. Sampel yang digunakan pada penelitian ini ialah ekstrak etanol daun rosella.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas dalam penelitian ini ialah variasi konsentrasi ekstrak etanol daun rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.).
2. Variabel terikat dalam penelitian ini ialah diameter zona hambat atau zona bening pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*.

3. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah pelarut ekstraksi, waktu pengukuran uji aktivitas, bagian daun yang digunakan, dan ukuran sumuran.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun rosella yang dibikin dengan variasi kadar konsentrasi yakni 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100%.
2. Melakukan uji aktivitas antibakteri pada kontrol positif dan kontrol negatif ekstrak etanol daun rosella dengan mengukur diameter zona hambat atau zona bening menggunakan alat jangka sorong.
3. Pelarut ekstraksi yang digunakan yaitu etanol 70%, waktu pengukuran uji aktivitas pada jam ke 4-8 tahapan ini dinamakan fase log atau fase xponensial dimana bakteri mengalami periode pertumbuhan yang sangat cepat, bagian daun yang digunakan dari urutan ke-2 sampai 5 dari pucuk tanaman, ukuran sumuran yang digunakan yaitu 6 mm.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a) Alat yang digunakan untuk ekstraksi yaitu spatula kayu, timbangan neraca analitik (Ohaus), wajan, toples besar, ayakan ukuran 40 mesh, kompor listrik (maspion), grinder, gelas beaker 1000 ml, gelas ukur 50 ml.
 - b) Alat yang digunakan untuk uji organoleptik dan uji fitokimia yaitu tabung reaksi, timbangan analitik (Ohaus), gelas beaker 250 ml, gelas ukur 10 ml, kertas saring, *hotplate* (IKA HS-7), pipet tetes, labu erlenmeyer 250 ml. Alat untuk uji KLT yaitu gelas bejana, gelas ukur 10 ml, gelas beaker 100 ml, lampu UV *Viewing Cabinet* 254 nm dan 366 nm (UvOC-02), whitetip.
 - c) Alat untuk uji aktivitas antibakteri yaitu autoklaf (Gea LS-B50L), *Biological Safety Cabinet* (Daihan Labetch), *beaker glass* 250 ml, *borer*, batang L, cawan petri, *hotplate magnetic stirrer* (IKA HS-7), inkubator (Memmert IN30), jarum ose, jangka sorong bersatuan mm, lemari pendingin, labu erlenmeyer 250 ml,

mikropipet 100-1000 μL , *bluetip*, oven (Memmert UN160), pembakar bunsen, gelas ukur 50 ml, labu takar 5 ml, pinset, tabung reaksi.

2. Bahan

- a) Bahan yang digunakan pada saat determinasi yaitu tanaman rosella. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi yaitu serbuk simplisia, etanol 70% dan kain mori.
- b) Bahan yang digunakan untuk uji fitokimia yaitu ekstrak etanol daun rosella HCL 2 N, dragendroff, mayer, wagner, etanol 70%, serbuk Mg, aquades, FeCl_3 1%.
- c) Bahan yang digunakan pada uji KLT adalah kloroform : metanol : asam asetat (14:2:1), kertas saring, serbuk kuersetin 0,1%, etanol 70%, ekstrak etanol daun rosella, plat silika GF254, AlCl_3 5%, whitetip.
- d) Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu ekstrak etanol daun rosella, bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada dan *Salmonella typhi* diperoleh di Balai Laboratorium dan Kalibrasi Yogyakarta, *nutrient agar (merck)*, aquades, *aluminium foil*, kassa, asam sulfur 1%, barium klorida 1%, NaCl 0,9%, *Media Muller Hinton Agar (merck)*, *cork borer* 6 mm, kloramfenikol.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Daun rosella diambil dari Krajan 1, RT 02/RW 01, Kiyudan, Majaksingi, Kecamatan Borobudur, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah, terletak di ketinggian 265 pl 7⁰ 36' 28'' LS dan 110⁰ 12' 13'' BT. Tanaman rosella terutama bagian daun dideterminasi di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan, yang bertujuan supaya meminimalisir

terjadinya kelalaian pada saat pengambilan tanaman dan untuk mengetahui kebenaran identitas tumbuhan yang akan diteliti.

2. Persiapan sampel

a. Pembuatan simplisia

Daun rosella sebanyak 4 kg yang telah dicuci bersih pada air mengalir, kemudian ditiriskan lalu dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C sampai menjadi simplisia kering. Tujuan pengeringan untuk menguapkan air yang ada dalam sampel. Setelah kering selanjutnya haluskan dengan alat grinder, lalu simplisia yang telah halus diayak dengan ukuran ayakan 40 mesh. Kemudian serbuk daun rosella disimpan dalam toples kaca.

b. Pembuatan ekstrak etanol daun rosella

Bubuk daun rosella ditimbang 500 g dan dimasukkan ke dalam toples kaca. Di ekstraksi dengan 5000 L etanol 70% menggunakan metode perendaman atau maserasi selama 3 hari. Sampel dimasukkan ke dalam toples kaca besar, disimpan di ruangan tertutup dan hindari dari sinar matahari. Setiap 12 jam sekali lakukan pengadukan. Kemudian filtrat disaring menggunakan kain mori lalu residunya diremaserasi selama 1 hari. Filtrat hasil remaserasi dicampur dengan hasil filtrat yang pertama kemudian dipekatkan di atas kompor listik sehingga mendapatkan ekstrak pekat, setelah itu dihitung rendemen ekstrak.

$$\text{Rendemen (\% b/b)} = \frac{\text{Berat ekstrak (gram)}}{\text{Berat simplisia (gram)}} \times 100\%$$

3. Kontrol kualitas ekstrak etanol daun rosella

a. Uji organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan pengamatan secara visual antara lain warna, tekstur serta bau sediaan.

b. Uji fitokimia

Metode yang digunakan berdasarkan (A'yun & Laily, 2015) :

1) Identifikasi alkaloid

Ekstrak etanol daun rosella ditimbang sebanyak 0,5 g dan dimasukkan pada tabung reaksi serta ditambahkan 10 ml HCL 2 N. sampel dipanaskan diatas kompor listrik selama 30 menit, setelah itu didinginkan dan disaring untuk mendapatkan filtrat. Kemudian filtrat yang diperoleh dibagi dan dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi serta ditambahkan dengan pereaksi yang berbeda setiap tabungnya. Untuk tabung pertama ditetes pereaksi dragendroff sebanyak 2 tetes lalu diamati jika terdapat endapan berwarna jingga maka terdapatnya kandungan alkaloid pada sampel. Pada tabung ke-2 ditambahkan reagen mayer sebanyak 2 tetes lalu diamati jika adanya endapan putih maka sampel menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Tabung terakhir ditambahkan pereaksi wagner sebanyak 2 tetes lalu diamati jika terdapatnya endapan yang berwarna merah kecoklatan maka sampel positif adanya alkaloid.

2) Identifikasi flavonoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun rosella dimasukkan ke pada tabung reaksi lalu larutkan menggunakan 5 ml etanol 70%. Selanjutnya ditambahkan beberapa tetes HCl 2N pekat serta serbuk Mg sebanyak 0,2 g. sampel diamati jika terdapat endapan yang berwarna merah tua atau hitam kemerahan maka terdapatnya kandungan flavonoid pada sampel.

3) Identifikasi saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun rosella dimasukkan pada tabung reaksi serta dilarutkan dengan 10 ml air panas kemudian didiamkan, setelah sampel dingin dikocok kuat-kuat lalu ditambahkan 2 tetes HCl. Sampel diamati jika terdapat buih

yang stabil atau dalam beberapa detik buih tersebut tidak hilang maka sampel tersebut positif adanya kandungan saponin.

4) Identifikasi tanin

Sebanyak 0,5 g ekstrak daun rosella dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan dalam 5 ml air panas dan dikocok hingga rata. Selanjutnya ditambahkan 2-3 tetes FeCl_3 1%, kemudian diamati jika membentuk warna biru tua atau hitam maka terdapatnya kandungan tanin pada sampel.

c. Identifikasi senyawa flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi senyawa flavonoid sebagai antibakteri dengan metode KLT, sebagai berikut :

1) Penjenuhan bejana

Dilakukan penjenuhan bejana, kemudian dilakukan pembuatan fase gerak menggunakan kloroform : metanol : asam asetat (14:2:1) untuk 17 ml, larutan dimasukan dalam bejana. Selanjutnya dipotong kertas saring sepanjang 18 cm lalu dimasukan dalam bejana yang telah terisi fase gerak, kemudian ditutup dan didiamkan sampai fase gerak jenuh. Fase gerak dikatakan jenuh apabila eluen telah membasahi kertas saring sampai ke ujung.

2) Pembuatan larutan standar kuarsetin 0,1 %

Ditimbang baku standar kuarsetin 0,1% sebanyak 2 mg kemudian dilarutkan dengan etanol 70% sampai 2 ml. (Asmorowati & Lindawati, 2019)

3) Pembuatan larutan

Ditimbang 5 mg ekstrak etanol daun rosella dan dilarutkan dengan etanol sebanyak 5 ml. Untuk pembandingan pada uji ini digunakan standar kuarsetin.

4) Uji KLT

Dibuat garis bagian atas dan bawah pada plat silika GF254 selebar 1 cm agar mempermudah penotolan, lalu dipanaskan di oven ± 30 menit dengan suhu 110°C . Adapun tujuan plat silika dipanaskan agar kandungan air pada plat tersebut berkurang. Sampel ditotolkan pada plat silika dengan menggunakan *whitetip* dan dimasukkan dalam bejana yang sebelumnya telah jenuhkan terlebih dahulu, kemudian didiamkan hingga eluen sampai tanda batas yang telah ditentukan. Setelah itu, plat silika dikeluarkan dan diangin-anginkan sampai kering, kemudian dilakukan penyinaran pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya disemprotkan AlCl_3 5% sebagai penampak bercak lalu diamati dengan melihat noda yang ada pada lempeng kemudian tentukan nilai Rf. (Theodora et al., 2019)

$$Rf = \frac{\text{jarak elusi sampel (cm)}}{\text{jarak perambatan fase gerak dari titik penotolan (cm)}}$$

4. Persiapan uji aktivitas antibakteri (Nor et al., 2018)

a. Sterilisasi alat dan bahan

Alat yang harus disterilkan yaitu *beaker glass*, cawan petri, batang L, dan tabung reaksi yang telah dicuci bersih dan disemprot alkohol 70% kemudian dibungkus menggunakan kertas payung terlebih dahulu, disterilkan dengan cara panas kering atau dengan menggunakan oven yang bersuhu 171°C selama 1 jam. Untuk alat tabung reaksi ditutup lobang menggunakan kapas agar terhindar dari kontaminasi setelah dikeluarkan dari oven dan untuk alat logam disterilkan menggunakan bunsen. Media yang akan digunakan disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sterilisasi bertujuan agar alat yang digunakan terhindar dari kontaminasi, jika alat yang digunakan

tidak disterilkan bisa menyebabkan kontaminasi dan dapat menghambat proses penelitian.

b. Pembuatan media peremajaan bakteri

Bahan yang digunakan pada peremajaan bakteri ini yaitu *Nutrient Agar* (NA). Peremajaan ini dilakukan agar isolat bakteri dapat aktif dan tumbuh secara optimal. Sebanyak 1 g NA (*merck*) dimasukan ke dalam erlenmeyer serta dilarutkan dengan 50 ml aquades, selanjutnya dipanaskan di atas *hotplate* dibantu dengan *magnetic stirrer* hingga larutan homogen. Selanjutnya, media dituangkan ke dalam 6 tabung reaksi steril dengan tiap-tiap tabung sebanyak 5 ml, dan untuk lubang tabung reaksi ditutup dengan kain kasa atau kapas lalu dibungkus *aluminium foil*. Media yang telah dibungkus kemudian disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C yang bertekanan 1 atm selama 15 menit. Selanjutnya media didiamkan pada suhu ruangan sampai media memadat dengan kemiringan 30° agar dalam mengamati pertumbuhan bakteri dapat dilakukan dengan mudah. Kultur isolat bakteri yang diuji diremajakan dan diinokulasikan pada media kemudian diinkubasi menggunakan inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

c. Pembuatan larutan standar *McFarland* 0,5

Bahan yang digunakan pada pembuatan standar *McFarland* pada penelitian yaitu asam sulfur dan barium klorida. *McFarland* digunakan sebagai standar karena standar ini biasanya digunakan untuk menguji kerentanan terhadap antibiotik dan kinerja media kultur. Untuk pembuatan larutan standar asam sulfur 1% sebanyak 9,95 ml dicampurkan dengan barium klorida 1% sebanyak 0,05 ml. sampel larutan standar diukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm, agar mengetahui bahwa larutan standar tersebut memiliki nilai absorbansi 0.08-0,1 (Simpson et al., 2014). Jika hasil yang didapat

tidak memenuhi syarat maka dilakukan pengenceran dengan aquades dan diukur kembali. Standar *Mc Farland* yang akan digunakan yaitu *Mc Farland* 0,5 artinya perkiraan jumlah suspensi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

d. Pembuatan suspensi bakteri

Bahan yang digunakan pada suspensi bakteri yaitu biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* dan NaCl 0,9%. Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* yang telah dibiakan terlebih dahulu disuspensikan pada larutan NaCl 0,9% steril sebanyak 1-2 ose. Uji suspensi terlihat mendapatkan kekeruhan yang setara dengan standar *McFarland* 0,5 atau setara dengan jumlah mikroorganisme $1,5 \times 10^8$ (CFU/ml). Syarat untuk jumlah bakteri dikatakan bagus apabila uji kepekaannya yaitu 10^5 - 10^8 CFU/ml.

e. Pembuatan larutan uji

Dibuat variasi konsentrasi larutan ekstrak daun rosella pada konsentrasi 20%; 40%; 60; 80% ;100%. Sebanyak 20 gram ekstrak etanol daun rosella dilarutkan menggunakan 20 ml aquades untuk larutan stok 100%. Encerkan larutan stok hingga menjadi konsentrasi 20%;40%;60%; dan80% dengan rumus pengenceran $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ dalam 5 ml.

f. Uji aktivitas antibakteri

Bahan yang digunakan untuk media uji pada penelitian ini yaitu *Media Muller Hinton Agar* (MHA). Ditimbang 9,86 g MHA (*merck*) dimasukan pada erlenmayer lalu larutkan menggunakan 290 ml aquades di atas *hotplate* dengan bantuan *magnetic stirrer* hingga homogen. Kemudian dituangkan ke dalam 14 cawan petri dengan tiap-tiap cawan petri sebanyak 20 ml selanjutnya di sterilkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C media yang telah dibungkus dengan *aluminum foil* selama 15 menit. Metode yang digunakan pada perlakuan ini yaitu metode difusi sumuran.

Diinokulasikan bakteri uji sebanyak 100 μ L atau 0,1 ml diatas media MHA sambil diratakan, dibuat lubang sumuran pada media MHA dengan menggunakan *cork borer* berdiameter 6 mm dan diberi label sesuai dengan konsentrasi yang di lakukan. Setelah dibuat lubang, dimasukan 20 μ L larutan sampel dengan variasi konsentrasi yang telah dibuat ke dalam lubang sumuran. Setelah itu, diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam, karena suhu tersebut adalah suhu optimal dalam pertumbuhan bakteri. Kemudian diamati dan diukur zona hambat yang terbentuk secara vertikal, horisontal dan diagonal menggunakan alat jangka sorong bersatuan milimeter dan dilakukan *reflikasi* sebanyak 3 kali.

Alasan penggunaan media MHA (*merck*) sebagai uji aktivitas antibakteri adalah karena secara keseluruhan sangat baik digunakan sebagai uji daya sensitivitas antimikroba.

Uji aktivitas antibakteri dapat dikelompokkan menjadi 2 perlakuan:

- 1) Kontrol positif pada perlakuan ini dilakukan menggunakan antibiotik kloramfenikol karena antibiotik ini memiliki aktivitas terhadap banyak infeksi gram positif dan gram negatif. Antibiotik kloramfenikol dibuat variasi konsentrasi 20%;40%;60%;80% dan 100%, sebanyak 20 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 20 ml aquades untuk larutan stok 100%. Encerkan larutan stok hingga menjadi konsentrasi 20%;40%;60%; dan 80% dengan rumus pengenceran $V_1.M_1=V_2.M_2$ dalam 5 ml. Kemudian untuk uji kontrol negatif menggunakan aquades karena di dalam aquades tidak terdapat zat aktif yang dapat mempengaruhi aktivitas bakteri.
- 2) Uji perlakuan ini menggunakan larutan ekstrak etanol daun rosella dengan variasi konsentrasi 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100%

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Untuk menganalisis data diameter zona hambat dilakukan menggunakan uji *One-Way ANOVA*. Dimana untuk uji perlakuan dan uji kontrol dianalisis secara statistik. Metode *One-Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan ialah 95% atau $\alpha = 0,005$. Uji *One-Way ANOVA* ialah uji yang digunakan untuk melihat ada tidaknya daya antibakteri pada setiap kelompok perlakuan dengan melihat nilai pada *output*.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA
PERPUSTAKAAN