

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini yaitu jenis penelitian yang eksperimental dilakukan di laboratorium akan membandingkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Proses maserasi ini dilakukan untuk mengekstraksi daun rosella dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Metode yang dilakukan untuk menguji aktivitas antibakteri adalah metode difusi cakram yang digunakan untuk melihat ada atau tidak daya hambat daun rosella pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Salmonella typhi*.

B. Lokasi dan Waktu

Uji determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. 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 dilaksanakan pada bulan Mei-Juli 2022.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi yaitu daun rosella yang diambil di Krajan I, RT 02/RW 01, Kiyudan, Majaksingi, Kecamatan Borobudur, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah 56553 yang terletak di ketinggian 265 mdpl. 7° 36' 28' LS dan 110° 12' 13' BT.
2. Sampel yaitu menggunakan daun rosella sebanyak 4 kg dengan ukuran sedang yang masih segar, utuh, tidak rusak dan berwarna hijau. dicuci dengan air yang mengalir agar lebih bersih kemudian dijemur ± selama 2 hari setelah itu dilanjutkan pengeringan dengan menggunakan oven untuk

meminimalisir hidupnya jamur pada daun rosella untuk pengeringan yang lebih efektif dengan suhu 50° C, kemudian daun rosella yang sudah kering dijadikan serbuk dengan menggunakan *grinder*.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah yang bisa mempengaruhi konsentrasi pada saat pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan sampel ekstrak etanol daun rosella.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang diamati atau hasil pengaruh dari variabel bebas yaitu diameter zona hambat atau luas area bening pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Salmonella typhi*.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol yaitu variabel yang ikut berpengaruh pada saat percobaan yaitu Waktu pengukuran dan pada saat inkubasi terhadap media uji selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator.

E. Definisi Operasional

1. Pada saat pengujian menggunakan ekstrak etanol daun rosella dengan beberapa konsentrasi yaitu 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%.
2. Pengukuran diameter zona hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Salmonella typhi* dengan menggunakan jangka sorong atau penggaris secara horizontal, vertikal, dan diagonal dengan satuan milimeter (mm).
3. Waktu pengukuran dan inkubasi pada media uji selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator.

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 labu takar, corong, loyang, kaca arloji, baskom, corong plastik, gelas ukur.
- b. Alat uji organoleptik dan uji fitokimia yaitu tabung reaksi, rak tabung, timbangan analitik, gelas beaker, labu ukur, kertas saring, *hot plate* (IKA HS-7) pipet tetes, corong, pipet ukur, propipet, *droplate*.
- c. Alat untuk uji KLT yaitu gelas bejana, labu takar, gelas beaker, lampu UV 254-366 nm (UvOC-02), *white tip*.
- d. Alat untuk uji aktivitas antibakteri yaitu autoklaf (Gea LS-B 50L), *BSC* (Daihan Labtech), *beaker glass*, batang L, cawan petri, *hot plate*, inkubator (Memmert IN30), jarum ose, jangka sorong, lemari pendingin, labu erlenmeyer (iwaki), mikropipet 100-1000 μL , *blue tip*, *magnetic stirrer*, oven (Memmert UN160), pembakar bunsen, pinset, tabung reaksi, batang pengaduk.

2. Bahan

- a. Bahan yang digunakan pada saat determinasi yaitu tanaman Rosella.
- b. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi yaitu serbuk simplisia, etanol 70% dan kain mori.
- c. Bahan yang digunakan untuk uji fitokimia yaitu ekstrak etanol daun Rosella, H_2SO_4 , HCL 2 N, dragendroff, mayer, wagner, etanol 70%, serbuk magnesium, akuades, FeCl_3 1%.
- d. Bahan yang digunakan untuk uji KLT yaitu, 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%, *white tip*.
- e. Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu ekstrak etanol daun rosella, bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella*

typhi, nutrient agar (*merck*) akuades, aluminium foil, kasa, asam sulfat 1%, barium klorida 1%, NaCl fisiologis 0,1%, Media Muller Hinton Agar (*merck*) dan ampisilin.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan Sampel

a. Determinasi Tanaman

Dilakukan identifikasi daun rosella di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta karena untuk meyakinkan bahwa spesimen menggunakan daun rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) sesuai yang diinginkan.

b. Pembuatan Sampel

Dicuci daun rosella sebanyak 4 kg di bawah air yang mengalir setelah itu daun rosella dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C sampai daun rosella menjadi kering. Kemudian daun rosella yang sudah kering dihaluskan menggunakan grinder hingga menjadi serbuk lalu melakukan pengayakan untuk mendapatkan hasil yang diinginkan yaitu dengan ayakan yang berukuran 40 mesh, daun rosella siap untuk diekstraksi.

c. Pembuatan Ekstrak

Serbuk daun rosella diambil sebanyak 500 gram dan direndam dalam 5L etanol dengan konsentrasi 70% dalam toples kaca yang sudah di bungkus dengan lakban selama 3 hari dengan pengadukan setiap 12 jam. Toples kaca yang berisi serbuk disimpan di tempat yang terjaga dari sinar matahari. Kemudian hasil dari perendaman disaring untuk mendapatkan filtrat, residu direndam kembali dalam pelarut etanol 70% sebanyak 2,5L selama 1 hari dan diaduk tiap 12 jam sekali. filtrat dari perendaman yang pertama dan perendaman yang kedua digabungkan. Setelah itu diuapkan untuk pemekatan hasil dari ekstrak

pekat dihitung dan dinyatakan dalam bentuk persentase (%b/b) (Chairunnisa et al., 2019).

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

2. Kontrol Kualitas

a. Uji organoleptik

Dilakukan percobaan organoleptik untuk mengamati ekstrak etanol daun rosella ada beberapa yang harus diamati antara lain warna, bentuk, rasa dan bau.

b. Skrining fitokimia

1) Identifikasi alkaloid

Disiapkan ekstrak etanol daun rosella lalu ditimbang sebanyak 0,5 gram. setelah itu siapkan tabung reaksi untuk tempat sampel yang telah ditimbang tadi kemudian tambahkan H_2SO_4 2 N sebanyak 10 ml dipanaskan di atas *hot plate* selama 30 menit dengan suhu 50°C atau ekstrak sudah mengendap. setelah itu di saring dan dibagi menjadi 3 bagian, tambahkan reagen ke setiap tabung. Pada tabung reaksi yang pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer apabila terjadi endapan putih maka menunjukkan hasil positif, tiga tetes preaksi Dragendroff pada tabung kedua apabila menunjukkan warna endapan jingga maka hasil positif dan tiga tetes preaksi Wagner pada tabung ketiga jika ditabung ketiga ada endapan merah kecoklatan maka hasilnya adalah positif. (Dahlia et al., 2012).

2) Identifikasi flavanoid

Disiapkan ekstrak etanol daun rosella lalu ditimbang sebanyak 0,5 gram. selanjutnya dimasukkan ke tabung reaksi dan dilarutkan menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian masukkan sedikit demi sedikit bubuk magnesium sebanyak 0,1 gram dan

asam klorida ditambahkan 2-3 tetes. Untuk mencapai hasil positif dengan adanya flavanoid yang membentuk warna merah menyala (Dahlia et al., 2012).

3) Identifikasi saponin

Disiapkan ekstrak etanol daun rosella lalu ditimbang sebanyak 0,5 gram dan kemudian tambahkan 5 mL air panas pada tabung reaksi serta digojok selama 30 detik. Jika adanya busa kemudian ditambahkan dengan larutan HCL 2N selanjutnya ditunggu selama 2 menit, terdapat saponin apabila adanya busa (Agustina, dkk., 2017).

4) Identifikasi tanin

Disiapkan ekstrak etanol daun rosella lalu ditimbang sebanyak 0,5 gram dan setelah itu masukkan ke tabung reaksi kemudian ditambahkan 5 ml air panas dilanjutkan penambahan FeCl 1% sebanyak 2-3 tetes. Apabila menunjukkan warna biru tua atau hitam artinya terdapat adanya tanin (Agustina, dkk., 2017).

c. Identifikasi golongan senyawa dengan metode KLT

Mengidentifikasi senyawa flavanoid sebagai antibakteri menggunakan metode KLT (Theodora et al., 2019).

1) Persiapan plat KLT

Silika gel GF254 yang berukuran 10 cm × 4 cm digunakan sebagai fase diam. Kemudian tandai bagian atas dengan garis untuk menunjukkan batas proses elusi.

2) Penjenuhan bejana

Dilakukan penjenuhan bejana dengan menggunakan kloroform, metanol, asam asetat, (14:2:1) sebanyak 17 ml sebagai fase gerak. Sedangkan untuk senyawa standar yang digunakan untuk pembanding yaitu kuarsetin. Jenuhkan eluen terlebih dahulu kedalam chamber menggunakan kertas saring dengan waktu 10-15

menit, dipotong kertas saring dengan ukuran vertikal dimasukkan ke dalam gelas bejana hingga supernatan, dan gelas bejana ditutup rapat menggunakan kaca arloji. dianggap jenuh ketika pengelusi telah mencapai puncak dari kertas saring. Agar menyamakan tekanan uap pada semua bagian gelas.

3) 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).

4) Pembuatan larutan ekstrak etanol daun rosella

Ditimbang 0,5 mg ekstrak etanol daun rosella dan dilarutkan dengan etanol 70% sebanyak 5 ml.

5) Penotolan ekstrak pada plat KLT

Tahap pertama yang dilakukan yakni dipanaskan terlebih dahulu lembaran silika gel yang telah diukur menggunakan oven dengan suhu 110°C selama 30 menit untuk mengurangi kadar air pada lembaran silika. Lembaran silika kemudian dibagi menjadi dua bagian yaitu bagian atas dan bagian bawah dengan ukuran 1 cm pada pipa kapiler di tepi bawah plat. totolkan sampel secara vertikal kemudian dimasukan tempat yang telah dijenuhkan terlebih dahulu. Selanjutnya ditutup kembali hingga pengelusi mencapai batas atas lempeng.

6) Mengidentifikasi senyawa flavanoid menggunakan sinar UV 254 nm dan 366 nm

Plat diambil dari gelas bejana yang telah dikeringkan. Diangin-anginkan terlebih dahulu. Selanjutnya untuk lempeng diamati dibawah sinar UV pada 254 nm dan 366 nm. kemudian disemprotkan AlCl_3 guna untuk melihat reaksi AlCl_3 5% dengan

membentuk kompleks antara gugus hidroksil dan keton. pada area yang terlihat dapat ditandai untuk menentukan nilai Rf.

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

3. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi alat

Sebelum menggunakan semua alat, dibersihkan alat dibawah air yang mengalir dan ditunggu sampai kering, Sebelum dibungkus dengan kertas payung semprotkan alkohol 70% kemudian ditunggu sampai kering pada semua alat untuk meminimalisir keberadaan bakteri lain, kemudian alat disterilkan dalam ke dalam oven pada suhu 171°C selama 1 jam. Alat-alat logam disterilkan dengan cara dipijarkan pada api bunsen.

b. Sterilisasi bahan

Bahan yang harus disterilkan antara lain *blue tip*, NaCl 0,9%, media peremajaan bakteri dan media uji, serta akuades. Sterilisasi dilakukan dengan metode sterilisasi panas basah yaitu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Pembuatan Media

Pembuatan media dilakukan sebanyak dua kali yaitu pada Nutrient Agar sebagai peremajaan bakteri dan Agar Mueller-Hinton untuk uji aktivitas antibakteri.

1) Nutrient Agar untuk peremajaan bakteri

Peremajaan ini dilakukan agar bakteri dapat aktif dan tumbuh secara optimal. sebanyak 1g NA (*merck*) dimasukan ke dalam erlenmeyer serta dilarutkan dengan 50ml akuades, panaskan di atas *hot plate* dan dibantu dengan *magnetic stirrer* hingga larutan menjadi homogen. Selanjutnya, media dituangkan ke dalam 6 tabung reaksi steril dengan tiap-tiap tabung sebanyak 5

ml, lubang tabung reaksi ditutup dengan kain kassa atau kapas lalu dibungkus *aluminium foil*. 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.

2) Mueller-Hinton Agar untuk uji aktivitas antibakteri

Sebelum melakukan uji aktivitas antibakteri langkah yang pertama yakni menimbang 9,18 gram Mueller-Hinton Agar dan dilarutkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 270 ml akuades. Selanjutnya panaskan di atas *hot plate* sampai dengan mendidih kemudian aduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut homogen, kemudian ditutup lubang erlenmeyer dengan kapas dan *aluminium foil* medium yang telah masak, disterilisasi dengan menggunakan alat yaitu autoklaf pada waktu 15 menit dengan suhu 121°C. Selanjutnya baru dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah disterilkan didalam BSC didinginkan dan dibiarkan hingga mengeras. Media yang digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri adalah media *Muller Hinton Agar* (MHA), pemilihan media MHA ini sebagai uji aktivitas antibakteri karena secara umum sangat baik digunakan sebagai uji sensitivitas antimikroba.

d. Pembuatan larutan standar *Mc Farland* 0,5

Larutan *Mc Farland* dibuat dengan mencampurkan asam sulfat (H_2SO_4) sebanyak 9,95 mL dan 0,05 mL barium klorida ($BaCl_2$) 1%. Digunakan *Mc Farland* sebagai standar karena standar ini biasa digunakan untuk uji kepekaan terhadap antibiotik dan kinerja media

kultur. 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 akuades 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.

e. Pembuatan suspensi bakteri

Kultur murni yang dipakai ialah bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Salmonella typhi* dibiakan dalam media Nutrient Agar (NA) secara aseptis dimasukkan ke inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Salmonella typhi* kemudian diambil sebanyak 1-2 ose, kemudian diencerkan dengan menggunakan NaCl fisiologis dan disetarakan dengan kekeruhan standart *Mc farland* Setara dengan *Mc farland* 0,5 atau sama dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ (CFU/ml) (Rukmana & Mulyowati, 2015)

f. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak uji

Ekstrak etanol daun rosella sebanyak 20 gram dilarutkan dengan akuades sebanyak 20 mL untuk mendapatkan konsentrasi 100%. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25% dan 30% dalam 5 mL akuades dengan rumus pengenceran yaitu $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ (Putri et al., 2019).

g. Pengujian antibakteri ekstrak daun rosella

Pada penelitian ini dilakukan uji difusi cakram, Bakteri uji (*Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*) diambil 0,1 mL. Plat agar Mueller-Hinton Agar diinokulasi dengan medium dan diratakan menggunakan batang L. Celupkan kertas cakram secara aseptis selama

5 menit guna untuk menarik senyawa yang ada di ekstrak cairan sampel sampai seluruh cakram basah. Kemudian untuk kontrol negatif dicelupkan ke dalam akudes karena di dalam akuades tidak mempunyai zatr aktif. Sedangkan ampisilin sebagai kontrol positif karena antibiotik ini memiliki aktivitas terhadap banyak infeksi gram positif dan gram negatif, antibiotik ini dicadangkan untuk infeksi gram negatif serius, seperti demam tifoid dan *salmonellosis*.

Setiap cakram dipindahkan ke media agar yang sudah diinokulasikan mikroba dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah selesai diinkubasi diamati zona bening atau zona hambat disekitar paper disk dengan menggunakan jangka sorong. Dimana pengujian ini dilakukan beberapa pengukuran yaitu horizontal, vertikal dan diagonal. Semakin luas area bening menunjukkan semakin tinggi aktivitas antimikroorganisme dari sampel (Lestari & Hendrayan, 2017), (Prasetyoputri et al., 2021).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Dalam penelitian ini peneliti menggunakan metode analisis dengan cara yaitu analisis parametrik *One-Way* ANOVA (Analysis of Variance) atau metode satu arah dengan tingkat kepercayaan 95%. Metode *One-Way* ANOVA untuk menentukan apakah ada pengaruh konsentrasi terhadap zona hambat yang diibuktikan dengan nilai signifikan pada output.