

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA USU, Laboratorium Herbarium Medanense USU, Laboratorium Farmasi USU dan Laboratorium Kimia Organik USU Jln. Dr Mansyur. Penelitian dilaksanakan dari Februari sampai April 2022.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, tabung reaksi, gelas beaker, tabung erlenmayer, rotary evaporator, waterbath, autoklave, oven, inkubator, bunsen, gelas ukur, jangka sorong, ose, pinset, pipet tetes, spatula, mikropipet, timbangan analitik, *hot plate*, kertas cakram, kertas saring, kertas label, cawan petri, masker, tissue, catton bad steril, kain kasa steril, kapas steril, rak tabung, pipet ukur, aluminium foil, cling wrab plastic, kertas HVS, botol sampel, vortex, spektometer, kupet, pisau, gunting.

##### **3.2.2 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.), biakan murni isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae* Dan *Streptococcus pneumoniae*, Aquades steril, Alkohol 70%, NaCl, Media *Nutrient Agar* (NA), Media *Mueller Hinton Agar* (MHA), Kloramfenikol, Etanol 96, dan DMSO.

#### **3.3 Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang diambil di Desa Kolam, Kecamatan Percut Sei Tuan, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara. Biakan bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Streptococcus pneumoniae* diperoleh dari Laboratorium Farmasi USU.

### 3.4 Rancangan Penelitian

Menggunakan rancangan penelitian eksperimen dengan RAL, dan metode difusi cakram (*Kirbi Bauer*), digunakan 6 kelompok, 4 kali pengulangan. Data yang dikumpulkan dengan mengukur daya hambat yang terbentuk. Perlakuan yang digunakan adalah 4 konsentrasi daun kersen *Muntingia calabura* L. sebesar 20%, 40%, 60% dan 80%. Selain itu, dua kontrol yang akan digunakan yaitu kontrol positif dengan antibiotik kloramfenikol, dan kontrol negatif menggunakan aquades steril. Rancangan penelitiannya yaitu:

- a. Kelompok K+ : Antibiotik Kloramfenikol
- b. Kelompok K- : Aquades Steril
- c. Kelompok U1 : Ekstrak daun kersen konsentrasi 20%
- d. Kelompok U2 : Ekstrak daun kersen konsentrasi 40%
- e. Kelompok U3 : Ekstrak daun kersen konsentrasi 60%
- f. Kelompok U4 : Ekstrak daun kersen konsentrasi 80%

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Identifikasi Tanaman Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)

Identifikasi tanaman daun kersen (*Muntingia calabura* L.) akan dilakukan di Laboratorium Herbarium Medanense USU, Jln. Bioteknologi Medan.

#### 3.5.2 Pembuatan Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)

Daun kersen yang akan digunakan sebanyak 5 kg. Pertama daun kersen dicuci dengan air mengalir hingga kotoran atau zat asing dari daun menghilang. Selanjutnya, sampel daun diangin-anginkan sampai kering tanpa terkena cahaya matahari. Setelah daun kering, masukkan kedalam blender hingga menghasilkan serbuk. Setelah itu, serbuk daun kersen ditimbang menjadi 300 gr.

Pelarut yang akan digunakan adalah 1:4. Tahap maserasi berlangsung selama 3x24 jam, dengan pengadukan dilakukan sesekali setiap 6 jam. Selanjutnya, kertas saring digunakan untuk menyaring filtrat daun kersen. Selanjutnya, proses evaporasi digunakan dalam memisahkan larutan etanol 96% dengan zat aktif. Setelah selesai, hasilnya dituangkan ke dalam Erlenmeyer, dan filtrat yang tersisa dipekatkan dalam rotary evaporator hingga mendapatkan ekstrak kental (Sulaiman, *et al.* 2017).

### 3.5.3 Skrining Fitokimia Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*)

#### a. Flavonoid

0,5 gram ekstrak dituangkan ke tabung reaksi, kemudian dipekatkan dengan pelarut heksana. Ekstrak ini diekstraksi dengan 10 ml etanol 96% lalu ditambah 0,5 gram logam Mg dan 0,5 ml HCl. Adanya Flavonoid berwarna merah muda ataupun ungu (Syahara dan Yenni. 2019).

#### b. Saponin

0,5 gram ekstrak dituangkan ke tabung reaksi, kemudian didinginkan dan dikocok selama 10 detik. 1 ml campuran diencerkan dengan 10 ml air lalu dikocok dengan kuat selama 10 menit, kemudian tambahkan 1 tetes HCl 2 N, jika buihnya teap ada maka terdapat senyawa saponin.

#### c. Tanin

Selama 15 menit 0,5 gram ekstrak dimaserasi dengan 10 ml aquades dan disaring, lalu encerkan filtrat dengan aquades hingga hampir tidak memiliki warna. Selanjutnya ditambahkan 2 ml filtrat dan 2 tetes FeCl<sub>3</sub> 10%, lalu diperhatikan warnanya. Warna biru menunjukkan adanya tanin, sedangkan warna hijau menunjukkan adanya dua gugusan hidroksil (Syahara dan Yenni. 2019).

#### d. Alkaloid

Setelah ekstrak daun kersen dituangkan ke tabung reaksi dan ditambah beberapa tetes HCl 2 N, air suling, dipanaskan selama 2 menit di atas penangas air, didinginkan dan kemudian disaring. Uji alkaloid, larutan pereaksi yang akan digunakan yaitu sebagai berikut:

- 3 tetes filtrat dicampur dengan 2 tetes larutan Mayer, lalu diamati.
- 3 tetes filtrat dicampur dengan 2 tetes Bouchardat, lalu diamati.
- 3 tetes filtrat dicampur dengan 2 tetes Wagner, lalu diamati.

Jika terjadi endapan ataupun kekeruhan dalam minimal dua dari tiga tes diatas, alkaloid dapat dikatakan positif. Untuk pereaksi Wagner, warna kuning kecoklatan muncul, dan untuk pereaksi Meyer, endapan kuning muncul (Meigaria, Komang Mirah, *et al.* 2016).

### 3.5.4 Sterilisasi Alat dan Bahan

Setelah dibersihkan dengan air mengalir, peralatan yang digunakan dikeringkan lalu dibungkus dengan kertas hvs, mulut wadah ditutup dengan menggunakan kapas. Sterilisasi selama 5 menit dalam autoklaf pada suhu 121°C. Jarum ose dan pipet dicelupkan ke dalam alkohol 70%, lalu dipemijaran dengan api Bunsen. Bahan seperti media NA dan media MHA di sterilisasi selama 15 menit dalam autoklaf pada suhu 121 °C (Almaleni, *et al.* 2019).

### 3.5.5 Pembuatan Media

#### a. Media *Nutrient Agar* (NA)

0,3 gram serbuk media NA dilarutkan ke gelas beaker yang berisi aquades 30 ml, panaskan di atas hot stir plate sampai mendidih hingga terlihat bening. Lalu, selama 15 menit di sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C.

#### b. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Dilarutkan 12 gram serbuk media MHA ke gelas beaker yang berisi aquades 300 ml, lalu panaskan di atas hot stir plate sampai mendidih hingga terlihat bening. Kemudian di sterilisasi selama 15 menit dengan suhu 121°C.

### 3.5.6 Pembuatan Kontrol Positif Dan Negatif

Kontrol positif yang digunakan ialah kloramfenikol 0,25 g. Dibuka cangkang kapsulnya dan di timbang serbuknya menjadi 0,2 g. Sedangkan kontrol negatif menggunakan aquades steril (Kumayas, *et al.* 2015).

### 3.5.7 Peremajaan dan Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

#### a. Peremajaan Bakteri Uji

1 ose isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Streptococcus pneumoniae* yang telah tumbuh ditambahkan ke dalam media agar miring NA ke tabung reaksi lalu digoreskan secara aseptik. Di inkubasi selama 1x24 jam pada suhu 30°C.

#### b. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Stok kultur bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Streptococcus pneumoniae* yang telah tumbuh diambil 1 kawat ose steril, kemudian

disuspensi dalam tabung reaksi 10 ml NaCl. Selanjutnya bakteri di vortex hingga homogen sampai kekeruhannya sama dengan kekeruhan larutan standard Mc. Farland (Ayen, *et al.* 2017).

### 3.6 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*)

Ekstrak etanol daun kersen diencerkan dengan menggunakan larutan DMSO. Konsentrasi larutan 20% ditimbang ekstrak sebanyak 0,2 gram, lalu dimasukkan ke botol sampel kemudian ditambah DMSO sebanyak 1 ml. Konsentrasi 40% ditimbang ekstrak sebanyak 0,4 gram ekstrak etanol daun kersen kemudian dimasukkan kedalam botol sampel kemudian ditambah DMSO sebanyak 1 ml. Konsentrasi 60% ditimbang ekstrak sebanyak 0,6 gram ekstrak etanol daun kersen kemudian dimasukkan kedalam botol sampel kemudian ditambah DMSO sebanyak 1 ml. Dan konsentrasi 80% ditimbang ekstrak sebanyak 0,8 gram ekstrak etanol daun kersen kemudian dimasukkan kedalam botol sampel kemudian ditambah DMSO sebanyak 1 ml.

### 3.7 Pengujian Antibakteri

Bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Streptococcus pneumoniae* yang sudah disuspensi diambil dengan menggunakan cotton bud kemudian digoreskan secara sinambung ke atas permukaan media MHA steril yang sudah padat. Kemudian, diletakkan kertas cakram yang sudah direndam larutan ekstrak pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%, larutan kontrol positif dan larutan kontrol negatif pada permukaan media yang sudah ditanami bakteri. Selanjutnya diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 30 °C (Hudaya, *et al.* 2014).

### 3.8 Tahap Pengukuran Diameter Zona Hambat

- a. Setelah di inkubasi, dilakukan pengukuran zona hambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* dan *Streptococcus pneumoniae*, pada petridish yang sudah diberi perlakuan.
- b. Pengamatan dilakukan dengan mengukur zona hambat menggunakan jangka sorong digital.

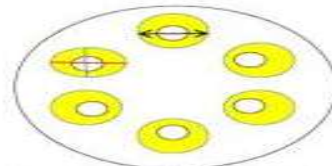
Rumuss:

$$\frac{Dv + Dh}{2}$$

Keterangan: Dv: Diameter vertikal

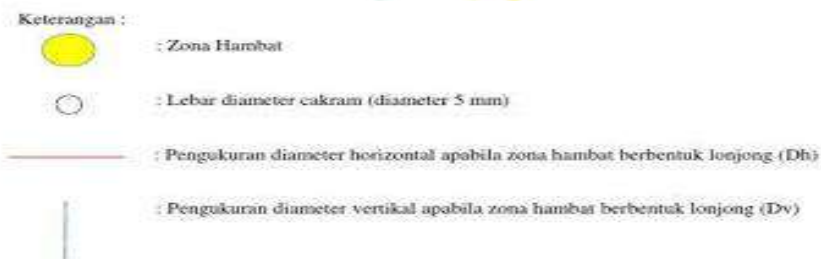
Dh: Diameter horizontal

- c. Untuk mendapatkan hasil zona hambat data yang sudah diperoleh kemudian dirata-ratakan.



Gambar3.1 Pengukuran zona hambat

Sumber: Pormes *et al.* 2016



Adanya daya hambat ekstrak pada perlakuan jika terdapat zona bening di sekitar kertas cakram. Zona difusi ekstrak di area kertas cakram tersebut berfungsi untuk memengaruhi pertumbuhan bakteri. Besarnya diameter zona yang terbentuk dapat menunjukkan sifat antibakteri pada ekstrak.

Menggolongkan kemampuan dari diameter yang diperoleh lebih mudah dengan mengkategorikan kekuatan zona hambat, menurut Davis dan Stout dalam Oroh *et al* (2015). Ekstrak diameter hambatan lebih dari 20 mm (kategori sangat kuat), struktur dengan diameter 10-20 mm (kategori kuat), diameter 5-10 mm (kategori sedang), pada diameter kurang dari 5 mm (kategori lemah).

Daya Hambat Bakteri	Kategori
$\geq 20$ mm	Sangat Kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
$\leq 5$ mm	Lemah

Davis dan Stout, 1971.

### 3.9 Analisis Data

Data dikumpulkan dengan mengukur diameter zona bening masing-masing konsentrasi setelah 1x24 jam masa inkubasi. Diukur secara vertikal, horizontal. Kemudian, nilai rata-ratanya dihitung dan diperoleh nilai diameter zona hambat. Sedangkan Analisis data menggunakan ANOVA satu arah/jalan dengan tujuan mengetahui perbedaan antara kelompok perlakuan. Setelah terdapat perbedaan pada uji *one way* ANOVA selanjutnya uji *Post Hoc* (*Duncan*).

