

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian.

Rancangan penelitian ini yaitu penelitian kualitatif eksperimental (*True Experimental*) dimana sampel daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) di fraksinasi dengan fraksi etil asetat lalu diuji skrining fitokimia, uji organoleptis dan aktivitas antibakteri menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*.

B. Populasi dan sampel.

Sampel pada penelitian ini adalah daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kostem) yang diambil di daerah sempaja, Samarinda, Kalimantan Timur. Populasi pada penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes* yang dikembangbiakan di Laboratorium Mikrobiologi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Samarinda.

C. Waktu dan Tempat Penelitian.

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Januari-Juni 2021 dilaksanakan di aboratorium Kimia Bahan Alam Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur, laboratorium Mikrobiologi di Sekolah Tinggil Ilmu Kesehatan Samarinda Laboratorium Ekologi dan Konservasi Keanekaragaman Hayati Hutan Tropis Universitas Mulawarman.

D. Definisi Operasional

1. KHM atau kadar hambat minimum adalah suatu konsentrasi antibiotik terendah tetapi masih bisa menghambat pertumbuhan organisme tertentu. Prosedur ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi antibiotik yang efektif untuk mencegah pertumbuhan bakteri patogen dan mengindikasikan dosis antibiotik yang efektif untuk mengontrol infeksi.

2. Variabel Penelitian

a. Variable bebas dalam penelitian ini yaitu konsentrasi sampel, konsentrasi jumlah perkembangan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*.

b. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu Konsentrasi Hambat minimum (KHM) dari bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*.

c. Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu suhu, serta komposisi media agar.

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan penelitian

Sampel daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm), Etanol 96%, *aquadest*, etil asetat, *n*-Heksan, HCL pekat, pereaksi *Dragendroff*, *Aquadest*, asetat anhidrit, air hangat, klindamisin, metanol PA, bakteri *Staphylococcus aureus*, bakteri *Propionibacterium acnes*, BaCL₂ 1% H₂SO₄ 1%, NaCl 0,9%, DMSO 0,5%, FeCL₃.

2. Alat penelitian

Gelas ukur, beker gelas, corong gelas, pengaduk kaca, karet penghisap, piper ukur, pipet volume, pipet tetes, labu ukur, batang pengaduk, erlemeyer, neraca analitik, botol semprot, mortar dan stamper, lampu spiritus, cawan porselin, corong pisah, timbangan analitik, ose, cawan petri, blender, kertas saring, toples kaca, aluminium foil, batang pengaduk, tabung reaksi beserta rak, *rotary evaporation*, *Laminar air flow*.

F. Teknik Analisis Data

Data dianalisis menggunakan SPSS 15.0 windows serta diuji dengan *Kruskal wallis test* untuk mengukur kadar hambat minimum (KHM).

G. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan sampel

Sampel penelitian ini adalah daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) yang diambil didaerah sempaja Samarinda, Kalimantan Timur.

2. Proses Determinasi Tanaman

Daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) dilakukan determinasi dilaboratorium Ekologi dan Konservasi Keanekaragaman Hayati Hutan Tropis Universitas Mulawarman.

3. Pembuatan simplisia

Daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) disortasi basah, kemudian dibersihkan menggunakan air mengalir untuk membersihkan kotoran yang masih menempel, selanjutnya dipotong kecil-kecil,

kemudian diangin-anginkan dengan cara diletakan pada nampan, dan dijemur ditempat yang tidak mengenai sinar matahari langsung. Pengeringan dilakukan selama kurang lebih 1 minggu, setelah itu dihaluskan dengan menggunakan blender.

4. Metode ekstraksi

Pembuatan ekstrak daun mangga kasturi dilakukan dengan cara metode maserasi, yaitu serbuk simplisia sebanyak 2,5kg daun kasturi direndam dengan pelarut etanol 96% sebanyak 7,5 Litter. Perendaman dilakukan selama 3 hari dalam toples kaca dan diletakan di ruangan gelap dan diaduk tiap 24 jam. Selanjutnya hasil perendaman disaring dengan menggunakan sebanyak 3 kali atau sampai didapat filtrat yang bersih. Semua filtrat disatukan kemudian diuapkan dengan *Rotary evaporatorion* hingga menjadi kental lalu diuapkan dengan menggunakan waterbath hingga terbentuk ekstrak kental.

5. Fraksinasi

Proses fraksinasi dilakukan dengan cara ekstrak daun mangga kasturi ditimbang sebanyak 2 gram dalam beker gelas lalu ditambahkan air hangat 20 ml aduk hingga larut kemudian dimasukan kedalam corong pemisah lalu ditambah pelarut *n*-Heksan aduk selama 2-3 menit diamkan hingga larutan memisah. Setelah itu lapisan bawah *n*-heksan dikeluarkan lalu ditambahkan 20 ml etil asetat dikocok selama 2-3 menit didiamkan hingga 30 menit, terdapat dua lapisan dalam corong pisah (lapisan etil asetat di bagian atas dan lapisan fraksi etanol di bagian bawah) (Farmakope Herbal Indonesia Edisi 1, 2008).

6. Uji Organoleptis

Uji organoleptis serbuk daun mangga kasturi dilihat menggunakan panca indra untuk menentukan bentuk, bau dan rasa (Depkes RI, 2000).

7. Penapisan fitokimia

a) Uji Alkaloid

Dengan menggunakan pereaksi Mayer, 1 mL ekstrak ditambahkan 2-3 tetes larutan pereaksi dragendroff, jika positif maka akan terbentuk endapan menggumpal berwarna kuning (Harborne, 1987).

b) Uji Saponin

Memasukan 1 mL sampel kedalam tabung reaksi, tambahkan 10 mL air yang telah dipanaskan selama 2-3 menit. Kemudian dinginkan, setelah dingin segera kocok kuat selama 10 detik. Saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap selama 10 menit setinggi 1-10 cm (Depkes RI, 1995).

c) Uji Flavonoid

Memasukan 1 mL sampel tambahkan 10 tetes HCl pekat (pereaksi shinoda), jika positif akan berwarna jingga, merah muda atau merah (Harborne, 1987).

d) Uji Tanin

Sampel dipanaskan dengan 20 ml air lalu disaring. Ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1% adanya tanin ditunjukkan

dengan warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Harborne, 1987).

e) Uji Steroid/Terpenoid

1 mL Sampel ditambahkan H₂SO₄ pekat dan asetat anhidrit. Perubahan warna hijau-biru menunjukkan positif steroid dan jika perubahan warna merah-ungu menunjukkan positif triterpenoid (Harborne, 1987).

8. Uji Antibakteri

a. Sterilisasi Alat dan Bahan.

Semua alat dan bahan yang dipakai sebelumnya dicuci bersih, dikeringkan, serta dibungkus dengan kertas coklat sebelum disterilisasi didalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dengan mengatur tekanan sebesar 1,5 atm. Sterilisasi untuk alat *Laminar air flow* dilakukan dengan menyalakan sinar UV selama 15 menit lalu disemprot alkohol, keringkan dengan tisu.

b. Pembuatan Media Agar.

Larutkan 7 gram agar dalam 250 ml *aquadest*, dipanaskan hingga media larut dengan sempurna kemudian dimasukkan dalam cawan petri sebanyak 10ml, lalu larutan agar disterilkan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Prihandani, 2015).

c. Pembuatan Kultur bakteri.

Bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*. Stok bakteri yang digunakan berasal dari stok kultur koleksi Laboratorium Mikrobiologi di Sekolah Tinggi Ilmu

Kesehatan Samarinda diremajakan dalam medium NA miring, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Kemudian didispersikan dengan air steril yang selanjutnya dapat digunakan sebagai mikroba uji.

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri dibuat dengan menambahkan NaCl 0,9% kedalam tabung reaksi yang sudah berisi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*. Kocok sampai mendapatkan kekeruhan yang sesuai dengan standar kekeruhan *Mc Farland* 0.5 untuk mendapatkan bakteri sebanyak $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Setelah itu diukur kekeruhan dengan cara membandingkan suspensi bakteri secara berdampingan menggunakan latar belakang kertas kertas putih bergaris hitam yang kontras dan dilakukan oleh dua pengamat di ruangan yang terang. Jika suspensi bakteri kurang keruh maka dapat ditambahkan bakteri hingga mendapatkan kekeruhan yang sama. Jika suspensi terlalu keruh maka dapat ditambahkan larutan NaCl 0,9% hingga didapatkan tingkat kekeruhan yang sama.

e. Pembuatan kontrol Antibiotik

Kontrol positif dibuat dengan cara melarutkan 0,05 gram antibiotik klindamicin ke dalam 10 ml *aquadest* lalu dimasukkan kedalam wadah tertutup rapat.

f. Persiapan dan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram (*Test KirbyBauer*)

Tahapan persiapan meliputi peremajaan bakteri, pembuatan

suspensi bakteri, pembuatan cakram kertas, persiapan kontrol negatif, persiapan kontrol positif, dan pembuatan seri konsentrasi yaitu konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, dan 20%. Uji aktivitas antibakteri menggunakan adalah metode *Disc Diffusion (Tes Kirby-Bauer)*. Suspensi bakteri uji sebanyak 20 μ L di masukkan pada media dalam petri kemudian goreskan dengan katembat steril diatas media uji (Difco,1977). Katembat steril diulas secara merata dalam cawan petri yang berisi bakteri. Cakram kertas dengan diameter berukuran 6 mm.Kontrol positif berupa klindamicin 50 mg, fraksi etil asetat daun mangga kasturi dengan masing-masing konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20%. Kemudian cakram ditempatkan diatas permukaan media sesuai dengan posisi yang diinginkan. Media selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian pengukuran diameter zona hambat jangka sorong yang dinyatakan dalam satuan milimeter.

H. Jadwal Penelitian.

No	Kegiatan	Jan	Feb	Maret	April	Mei	Juni
1.	Pengambilan sampel						
2.	Pembuatan simplisia						
3.	Pembuatan fraksi + pengujian determinasi						
4.	Penelitian						
5.	Perkiraan hasil penelitian						

