# **BAB III**

# **METODOLOGI PENELITIAN**

## 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode eksperimental. Sampel yang digunakan adalah daun mengkudu *(Morinda citrifolia* L). Dimana tahapan-tahapan penelitian meliputi pengumpulan sampel, pengolahan sampel, pembuatan ekstrak etanol daun mengkudu, skrining fitokimia, serta pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi menggunakan kertas cakram.

### 3.1.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun mengkudu dengan konsentrasi 30%, 40%, dan 50%. Variabel terikat yaitu aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar menggunakan kertas cakram. Kontrol positifnya yaitu Kloramfenikol 30µg, dan kontrol negatif yaitu DMSO (Dimetil Sulfoksida).

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter penelitian meliputi uji skrining fitokimia untuk mengidentifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, saponin, steroid/triterpenoid dan glikosida serta diameter daya hambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa.*

##

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

### 3.2.1 Jadwal Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2022 sampai dengan bulan April 2022.

**3.2.2 Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah.

## 3.3 Bahan

Bahan yang digunakan untuk pengujian terbagi menjadi tiga bagian, yakni bahan tumbuhan, bahan-bahan kimia dan kultur bakteri murni. Bahan tumbuhan yang digunakan adalah daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L). Bahan kimia yang digunakan adalah Etanol 96%, Akuades, Dimetil Sulfoksida (DMSO), Magnesium Serbuk, Pereaksi Bouchardat, Pereaksi Mayer, Pereaksi Dragendorf, Asam Sulfat pekat (Merck®), Pereaksi FeCl3 1%, Asam Asetat Anhidrida (Merck®), Natrium Hidroksida 2N, Pereaksi Molish, Cakram Kloramfenikol, Cakram Kosong, Eter, Barium Klorida (Merck®), Mueller Hilton Agar (Himedia®), Nutrient Agar (Merck®). Kultur bakteri murni yang digunakan adalah *Psedomonas aeruginosa*.

### 3.4 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat – alat gelas laboratorium (*Pyrex®*), Cawan Petri, Cawan Penguap, Blender (*Miyako®*), Bunsen, Inkubator (*Memmert®*), Oven (*Memmert®*), Jangka Sorong Digital (*Nankai®*), Kompor Gas (*Rinnai®*), Lemari Pendingin (*LG®*), Lemari Pengering, Rak dan Tabung Reaksi (*Pyrex®*), *Rotary Evaporator* (*Eyela®*),Timbangan Analitik (*Newtech®*), Vial, Kertas Saring, Spatel, Laminar Air Flow (*Biobase®*), Kertas Cakram (*Oxoid®*), Vortex (*B-One®*), Hot Plate, Autoclaf (*B-One®*), Penangas Air, Kawat Ose, dan Kertas Perkamen.

## 3.5 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

## 3.5.1 Prosedur Penelitian

## 3.5.1.1 Pengumpulan Sampel

Pengumpulan sampel dilakukan secara purposif, yaitu tanpa membandingkan dengan daerah lain. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L) yang diperoleh dari Kelurahan Tanjung Permai, Bintan.

### 3.5.1.2 Identifikasi Sampel

 Identifikasi tanaman mengkudu (*Morinda Citrifolia* L) dilakukan di *Herbarium Medanese* (MEDA)*,* Laboratorium Herbarium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara .

**3.5.1.3 Pengolahan Sampel**

Daun mengkudu yang masih segar dikumpulkan sebanyak 3 kg, dibuang bagian yang tidak diperlukan (sortasi basah). Selanjutnya dicuci bersih, ditiriskan, dan ditimbang berat basahnya. Daun mengkudu selanjutnya di potong menjadi bagian kecil dan dikeringkan didalam lemari pengering pada suhu 400C. Daun mengkudu dianggap sudah kering apabila sudah rapuh (hancur bila diremas), kemudian daun mengkudu sebanyak diserbukkan dengan blender dan ditimbang berat serbuknya. Serbuk simplisia didapat 1,2 kg dan disimpan dalam wadah terlindung dari sinar matahari dan terhindar dari kelembapan.

## 3.5.1.4 Pembuatan Ekstrak

 Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 500 g serbuk simplisia dimasukkan kedalam bejana, kemudian dituangkan dengan 75 bagian etanol sebanyak 3750 ml dalam wadah tertutup rapat selama 5 hari terlindungi dari cahaya, sambil sering diaduk, lalu diperas sehingga didapat maserat I. Kemudian ampas yang diperoleh dibilas dengan 25 bagian etanol sebanyak 1250 ml, pindahkan kedalam bejana tertutup (maserat I dan maserat II) biarkan ditempat yang sejuk terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari, kemudian enap tuangkan atau disaring sehingga diperoleh hasil maserat. Kemudian dipekatkan dengan cara diuapkan pada *rotary evaporator* dengan suhu tidak lebih dari 50ºC dan di waterbath hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes, 1979)

### 3.5.1.5 Pembuatan Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Mengkudu

Ekstrak daun mengkudu ditimbang 5 gram dilarutkan dalam DMSO hingga 10 ml, maka diperoleh konsentrasi ekstrak 50%. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat yaitu di pipet dari larutan induk masing-masing sebanyak 8 ml dan 7.5 ml, dilarutkan dengan DMSO sampai 10 ml, diperoleh konsentrasi 40% dan 30%.

**3.5.1.6 Pembuatan Larutan Pereaksi**

### **Larutan Pereaksi Bouchardat**

 Sebanyak 4 g kalium iodida dilarutkan dalam 20 mL air suling, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 g iodium dan dicukupkan dengan air suling hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### Larutan Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 g raksa (II) klorida, dilarutkan dalam 60 ml air suling, kemudian pada wadah yang lain ditimbang sebanyak 5 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 10 mL air suling. Kedua larutan dicampurkan dan ditambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### Larutan Pereaksi Dragendrof

Sebanyak 8 g bismut (II) nitrat ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 20 mL asam nitrat pekat. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 27,2 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 50 mL air suling. Kemudian kedua larutan dicampurkan dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan air suling hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### Larutan Pereaksi Asam Klorida 2 N

Sebanyak 17 mL asam klorida pekat diencerkan dalam air suling hingga 100 ml (Ditjen POM, 1979).

Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%

 Sebanyak 1 g besi (III) klorida dilarutkan dengan air suling hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### Larutan Pereaksi Natrium Hidroksida 2 N

Sebanyak 8 gram kristal natrium hidroksida dilarutkan dalam air suling hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

**Larutan Pereaksi Molish**

Sebanyak 3 gram alfa-naftol dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga 100 ml (Ditjen POM, 1979)

## 3.5.1.7 Skrining Fitokimia

### Pemeriksaan Alkaloid

Sampel serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun mengkudu sebanyak 0,5 gram kemudian ke dalam masing-masing sampel ditambahkan 2 ml asam klorida 2N dan ditambah akuades sampai 9 ml, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring, filtrat yang diperoleh dipakai untuk uji alkaloida. Ke dalam 3 tabung reaksi dimasukkan 0.5 ml filtrat. Pada masing masing tabung reaksi:

1. Filtrat ditambahkan dengan 2 tetes larutan pereaksi mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.
2. Filtrat ditambahkan dengan 2 tetes larutan pereaksi bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.
3. Filtrat ditambahkan dengan 2 tetes larutan pereaksi dragendorf, reaksi positif ditandai denga terbentuknya warna merah atau jingga.

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan paling sedikit 2 dari 3 percobaan diatas (Dirjen POM, 1995).

### Pemeriksaan Flavonoid

 Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun mengkudu masing-masing ditambahkan 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 ml lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol lalu dikocok kemudian dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terbentuk warna merah, kuning, jingga pada lapisan alkohol (Dirjen POM, 1995).

### Pemeriksaan Tannin

 Sampel serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun mengkudu ditimbang sebanyak 0,5 g ditambah 10 ml akuades, dikocok dan disaring. Filtrat diencerkan dengan akuades sampai tidak berwarna. Larutan diambil 2 ml ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Dirjen POM,1995).

### Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun mengkudu masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 ml akuades panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Kemudian ditambah 1 tetes larutan HCL 2 N, apabila busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Dirjen POM, 1995).

### Pemeriksaan Glikosida

 Serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun mengkudu masing-masing ditimbang sebanyak 3 g, kemudian disari dengan 30 mL campuran 7 mL bagian etanol 96% dan 3 bagian aquades ditambah dengan 10 mL HCl 2 N. Direfluks selama 30 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 mL filtrat ditambahkan 25 mL aquades dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok, lalu didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari dengan 20 mL campuran 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol dilakukan berulang sebanyak tiga kali. Kumpulan sari air diuapkan pada temperatur tidak lebih dari 500C. Sisanya dilarutkan dalam 2 mL metanol. Kemudian diambil 0,1 mL larutan percobaan dimasukkan kedalam tabung reaksi, diuapkan di penangas air. Pada sisa ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes pereaksi molish. Kemudian secara perlahan ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung, jika terbentuk cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida (Dirjen POM, 1995).

### Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Sampel serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun mengkudu ditimbang masing-masing sebanyak 1 g dimaserasi dengan 20 ml eter selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna ungu sampai merah ungu menunjukkan adanya triterpenoida dan terbentuknya warna biru hijau menunjukkan adanya steroid (Dirjen POM, 1995).

### Penyiapan Media

Penyiapan media dilakukan terhadap media yang telah jadi, yaitu *Nutrient Agar* dan *Mueller Hilton Agar* agar sesuai dengan prosedur pembuatan dan sterilisasi yang tertera pada etiket masing-masing kemasan media.

#### Media Nutrient Agar (NA)

Komposisi : Lab – Lemco Powder 1 gram

 Yeast Extract 5 gram

 Peptone 5 gram

 Sodium Chloride 5 gram

 Agar 15 gram

 Air suling 1 liter

Ditimbang sebanyak 5,6 gram media nutrient agar (*Himedia®*) dilarutkan dalam air suling yang sudah steril. Selanjutnya volume dicukupkan hingga 200 ml. setelah itu dilakukan pemanasan hingga mendidih dan di sterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 1210C.

**Media Mueller Hinton Agar (MHA)**

Komposisi : Infusion From Meat 2 gram

 Casein Hydrolysate 17,5 gram

 Starch 1,5 gram

 Agar 17 gram

Air Suling 1 liter

Ditimbang sebanyak 9,5 gram media Mueller Hinton Agar (*Himedia®*) yang sudah steril lalu volume nya dicukupkan hingga 250 ml dengan pemanasan sampai bahan semua larut. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 1210C selama 15 menit.

#### Sumber Isolat Bakteri

Isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Farmasi, Universitas Sumatera Utara.

**3.5.1.10. Identifikasi Bakteri**

Identifikasi bakteri dilakukan dengan pewarnaan gram. Pewarnaan gram adalah teknik umum yang digunakan untuk membedakan dua kelompok besar bakteri berdasarkan konstituen dinding sel yang berbeda. Bakteri gram positif mempertahankan warna ungu kristal violet karena adanya lapisan peptidoglikan yang tebal pada dinding sel mereka. Sedangkan bakteri gram negative berwarna ungu kemerahan, yang tidak mempertahankan warna pertama (Kristal violet) dan hanyut selama proses pencucian.

 Bakteri yang sudah dikultur di media agar diambil satu koloni. Kemudian dioles pada object glass, ditetesi aquadest dan diratakan menggunakan jarum ose dengan sudut 45º kemudian dikeringkan. Selanjutnya diteteskan kristal violet pada kaca preparat yang sudah dioleskan bakteri hingga semua bakteri tergenang dan dibiarkan selama 1 menit. Lalu dilakukan pencucian dengan cara meneteskan aquadest ke preparat tersebut, disiram dengan larutan iodine dan dikeringkan selama 1 menit, selanjutnya dicuci kembali dengan aquades.

 Tahap berikutnya dilakukan penetesan alkohol dan dikeringkan, kemudian ditetesi lagi dengan alkohol dan dibilas dengan aquadest. Selanjutnya diteteskan safranin dan didiamkan selama 1 menit, kemudian cuci dengan aquadest. Setelah kering, amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Hasil untuk gram negative apabila bakteri berwarna merah muda atau kemerahan, sedangkan untuk gram positif berwarna ungu. (Effendi, 2020)

#### 3.5.1.11 Peremajaan Bakteri

Biakan bakteri murni yang digunakan adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATC*®*27853TMyang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sumatera Utara. Hal pertama yang dilakukan yaitu membuat media Nutrient Agar (NA). Media Nutrient Agar (NA) dituangkan kedalam cawan petri sekiranya sebanyak 15 ml, didiamkan hingga agar memadat. Selanjutnya diambil satu ose bakteri dan diinokulasikan dengan cara menggoreskan secara merata pada media yang sudah memadat dengan jarum ose yang sudah disterilkan dengan membakar pada lampu Bunsen dari pangkal hingga ujungnya. Setelah masing –masing petri telah dioleskan bakteri yang akan diremajakan, ditutup dengan cara menggulung tepi cawan menggunakan plastik shall, dan diinkubasi dalam incubator selama 24 jam (Aviany *et al .,* 2020).

#### 3.5.1.12 Pembuatan Larutan Standart McFarland 0.5

Larutan *McFarland* 0.5yaitu Larutan standart yang menunjukkan konsentrasi kekeruhan suspensi bakteri yang sama dengan 1.5 x 108CFU/ml.

Komposisi : Larutan asam sulfat 1% 9,95 ml

 Larutan barium klorida 0,05 ml

Cara pembuatannya yaitu larutan asam sulfat 1% sebanyak 9.95 ml dicampur dengan larutan barium klorida sebanyak 0.05 ml dalam tabung reaksi, lalu homogenkan, apabila kekeruhan suspensi bakteri uji adalah sama dengan ketentuan suspensi standart *McFarland* 0.5, maka konsentrasi suspensi bakteri adalah 1.5 x 108 koloni/ml (Vandepitte *et al*., 2011).

**3.5.1.13 Pembuatan Suspensi Bakteri**

Pembuatan suspense bakteri dilakukan dengan cara bakteri uji yang telah diregenerasikan diambil dengan jarum ose. Kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl steril 0,9%, divortex lalu disetarakan kekeruhannya dengan larutan standar *McFarland 0,5.*  (Afni *et al .,* 2015).

3.5.1.14 Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengukur diameter daerah hambat untuk masing-masing konsentrasi. Penentuan diameter daerah hambat dilakukan dengan metode difusi cakram (*Agar Disk Diffusion Method*) menggunakan kertas cakram berdiameter 6 mm, bakteri yang digunakan adalah bakteri gram negatifyaitu *Pseudomonas aeruginosa.*

Sebanyak 1 ml suspensi bakteri dimasukkan dalam cawan petri steril, kemudian dituang media Mueller Hilton Agar sebanyak 20 ml dengan suhu 40º-50ºC. Cawan petri digoyang diatas permukaan meja agar media dan suspensi bakteri tercampur rata dan dibiarkan memadat. Dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar menggunakan cakram kertas. Diletakkan cakram kertas yang telah ditetesi dengan beberapa konsentrasi larutan uji ekstrak etanol daun mengkudu dan untuk pembanding kontrol positif digunakan kertas cakram yang kloramfenikol 30 µg dan kontrol negatif yaitu larutan DMSO diatas media padat yang telah diinokulasikan bakteri dan dibiarkan 15 menit, kemudian diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 36±1ºC selama 24 jam, setelah itu diukur diameter daerah hambatan (zona jernih) pertumbuhan disekitar cakram dengan menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan dengan mengukur diameter vertikal dan horizontal dari daerah hambat yang terbentuk. Pengujian masing-masing dilakukan sebanyak 3 kali (Ditjen POM, 1995).

* + 1. **Pengumpulan Data**

Pengumpulan data penelitian ini dimulai dari tahap persiapan, tahap pelaksanaan yang terdiri dari pembuatan ekstrak daun mengkudu , pembuatan media uji untuk bakteri, sterilisasi alat dan media, penyiapan mikroorganisme bakteri, dan tahap perlakuan yang terdiri dari uji daya hambat bakteri.

* 1. **Analisa Data**

Analisis data menggunakan software program computer *IBM SPSS 25 for windows*. Data diameter hambat dari masing-masing bahan uji dianalisis dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smimov untuk melihat apakah data terdistribusi normal atau tidak normal. Selanjutnya uji dilanjutkan dengan menggunakan uji Homogenity of Varian untuk mengetahui apakah varian dari data homogen atau tidak homogen..