# BAB III

# METODE PENELITIAN

## 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al- Washliyah Medan. Metode penelitian ini adalah eksperimental. Penelitian ini meliputi uji antioksidan hasil fraksi ekstrak etanol daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) dengan menggunakan metode dpph dan uji antibakteri dengan menggunakan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus.*

### 3.1.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu serbuk daun bandotan, ekstrak daun bandotan dan hasil fraksi daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah karakteristik simplisia, skrining fitokimia, efektivitas antioksidan dan antibakteri dari hasil fraksi ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.).

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

### 3.2.1 Jadwal Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari sampai dengan Juni 2024.

### 3.2.2 Lokasi Penelitian

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

## 3.3 Alat dan Bahan

### 3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu bejana maserasi, gelasukur (Pyrex), batang pengaduk, *waterbath* (maskot),timbangan analitik (vibra,vernier), oven, ayakan,vortex (B-one),autoklaf (B-one), *rotary evaporatory* (Eyela osb-2100, ser. No. 61012144), kurs porselin, tanur, incubator (memmert no seri 4040831), aluminium foil, kertassaring,corong (Pyrex),objekglass, corong pisah(Pyrex), botol steril, jangka sorong, kaki tiga, spirtus, cawan petri, *cotton bud*, mikropipet, jarum ose, kain kasa steril, kapas steil, *handscoon*, kertas label, tabungreaksi (Pyrex),raktabungreaksi, beaker glass(Pyrex), Erlenmeyer (Pyrex), pipet tetes, belender, dan spektrofotometer UV-Vis (Thermo evolution 201).

### 3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu , ekstrak etanol daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.), etanol 96% (Merck), n-Heksan (Merck), etil asetat(Merck), methanol (Merck), DMSO (*dimethyl sulfoxide*) (Merck), *Chloramphenicol*(Merck), *Nutrient agar* (NA) (Merck), *Muller Hiton Agar* (MHA)(Merck), iodium(Merck), kalium iodida(Merck), Raksa (II) klorida(Merck), bismut nitrat(Merck), asam nitrat P(Merck), asam klorida(Merck), alfa-nafto(Merck), asam asetat anhidrida(Merck),timbal (II) asetat(Merck), besi (III) klorida(Merck), kristal murni natrium hidroksida(Merck), asam sulfat(Merck), amil alcohol (Merck), isopropanol (Merck), aquadest, etanol p.a, Vitamin C p.a dan DPPH(Merck).

## 3.4 Pengumpulan Dan Pengolahan Bahan Tumbuhan

### 3.4.1 Pengumpulan Tumbuhan

Pengambilan tumbuhan dilakukan secara purposif yaitu tanpa membandingkan dengan daerah lain. Sampel yang digunakan adalah daun bandotan yang didapatka di desa padang hasior kec. Sihapas barumun, kab. Padang lawas, Sumatera Urata.

**3.4.2 Identifikasi Tumbuhan**

Identifikasi tumbuhan dilakukan di HERBARIUM MEDANESE (MEDA) Universitas Sumatera Utara.

### 3.4.3 Pengolahan simplisia

Daun bandotan yang telah diambil, lalu pisahkan dari kotoran atau disortasi basah dan cuci dengan air mengalir. Sampel kemudian dikeringkan, ditimbang dan dijemur. Simplisia kering kemudian ditimbang dan dihaluskan dalam blender Kemudian simpan simplisia dalam wadah kedap udara dan hindari sinar matahari langsung(Depkes RI, 2000).

### 3.4.4 Pembuatan Ekstrak Daun Bandotan

Sebanyak 1000 gram sampel daun bandotan dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1: 10. Masukkan serbuk simplisia dalam bejana dan dilarutkan dengan 75 bagian etanol didiamkan 5 hari dan dilakukan pengadukan disetiap harinya. Kumpulkan maserat I, endap tuang ampas dengan 25 bagian etanol lalu gabungkan maserat I dan II, diamkan selama 2 hari. Sampel kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat setelah itu diuapkan dengan *rotary evaporatory*untuk mendapatkan ekstrak pekat. Timbang serta catat rendemen yang diperoleh. Penggunaan pelarut etanol 96% sebagai pelarut polar dikarenakan lebih aman dalam penanganan dibandingkan pelarut organik lainnya seperti aseton. Etanol terbukti memiliki aktivitas yang tinggi dalam menarik flavonoid dan fenolik, serta memiliki kandungan air yang lebih sedikit yaitu 4% sehingga memudahkan proses penguapan, dengan 5 kali pengulangan selama 1 × 24 jam(Depkes RI, 1995).

## 3.5 Fraksinasi

Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya difraksinasi dengan partisi cair-cair menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan air.

### 3.5.1 Pelarut n-Heksan

Ekstrak sebanyak 30 gram dimasukkan ke dalam gelas beaker dan dilarutkan dengan menambahkan 100 ml aquadest, dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut n-Heksan sebanyak 100 ml dan dikocok sampai merata dengan sekali-sekali membuka kran corong pisah. Selanjutnya didiamkan sampai terjadi pemisahan dari fase air dan fase n-Heksan. Fase air dan fase n-Heksan yang diperoleh kemudian ditampung dalam wadah terpisah. Fase air dimasukkan kembali ke dalam corong pemisah dan diekstrasi lagi dengan n-Heksan sebanyak 100 ml dan dilakukan hingga jernih, kemudian diuapkan sampai diperoleh ekstrak kental(Trijuliamos Manalu et al., 2022).

### 3.5.2 Pelarut Etil Asetat

Lapisan air dari hasil ekstraksi n-Heksan dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan dengan pelarut etil asetat sebanyak 100 ml dan dikocok sampai merata dengan sekali-sekali membuka kran corong pisah. Selanjutnya didiamkan sampai terjadi pemisahan dari fase air dan fase etil asetat. Fase air dan fase etil asetat yang diperoleh ditampung dalam wadah yang terpisah. Lalu lakukan hal yang sama seperti pada pelarut n- Heksan untuk memperoleh ekstrak kental (Trijuliamos Manalu et al., 2022).

## 3.6 Pembuatan Larutan Pereaksi

### 3.6.1 Larutan Pereaksi Bouchardat

 Sebanyak 2 g iodium dan 4 g kalium iodida kemudian dilarutkan dalam air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

### 3.6.2 Larutan Pereaksi Mayer

 Raksa (II) klorida sebanyak 1,35 g dilarutkan dengan 60 ml akuades di dalam gelas ukur 100 ml. pada wadah lain larutkan 5 g kalium iodida dalam 10 ml akuades. Kedua larutan dicampur dalam labu ukur 100 ml, lalu diencerkan dengan akuades sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

### 3.6.3 Larutan Pereaksi Dragendorff

 Sebanyak 20 ml larutan bismut nitrat 40% b/v dalam asam nitrat P dicampur dengan 50 ml larutan kalium iodida P 54,4% b/v, diamkan sampai memisah sempurna. Ambil larutan jernih dan encerkan dengan air secukupnya hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

### 3.6.4 Larutan Pereaksi Molish

 Sebanyak 3 g alfa-naftol dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

### 3.6.5 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2 N

 Asam klorida pekat sebanyak 19,71 ml dipipet lalu dimasukkan ke dalam gelas kima 100 ml lalu diencerkan dengan akuades sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

### 3.6.6 Larutan Pereaksi Liebermann-Burchard

 Asam asetat anhidrida sebanyak 20 ml dipipet lalu dicampurkan dengan 1 ml asam sulfat pekat dalam gelas ukur (Depkes RI, 1995).

### 3.6.7 Larutan Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 M

 Timbal (II) asetat sebanyak 15,17 g dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu dilarutkan dalam akuades bebas CO2 sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

### 3.6.8 Larutan Peraksi Besi (III) Klorida 1%

 Besi (III) klorida sebanyak 1 g dilarutkan dalam akuades dalam labu ukur 100 mL dan dicukupkan sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

### 3.6.9 Larutan Pereaksi Asam Nitrat 0,5 N

 Asam nitrat pekat sebanyak 44,3 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu diencerkan dengan akuades sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

### 3.6.10 Larutan Pereaksi Natrium Hidroksida 2 N

 Sebanyak 8 g kristal murni natrium hidroksida dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, lalu dilarutkan dalam akuades hingga volume 100 ml (Depkes RI, 1995).

### 3.6.11 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2 N

 Asam sulfat pekat sebanyak 10,32 ml dipipet lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 ml lalu diencerkan dengan akuades sampa garis tanda (Depkes RI, 1995).

## 3.7 Karakterisasi Simplisia

 Pemeriksaan dilakukan meliputi pemeriksaan penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu total, serta penetapan kadar abu tidak larut asam (POM, 1995).

1.
2.
3. 1.
	2.
	3.
	4.
	5.
	6.
	7.

### 3.7.1 Penetapan Kadar Air

 Penetapan kadar air dilakukan dengan metode Azeotropi. Alat terdiri dari labu alas bulat 500 ml, alat penampung dan pendinginan, tabung penyambung dan penerima 10 ml.

1. Penjenuhan toluene

 Sebanyak 200 ml toluene dan 2 ml air suling dimasukkan ke dalam labu alas bulat, dipasang alat penampung dan kondensor, kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 ml.

1. Penetapan kadar air simplisia

 Sebanyak 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu yang berisi toluen jenuh tersebut, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes tiap detik. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendinginan dibilas dengan toluene. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,05 ml. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (v/b) (Depkes RI, 1995).

### 3.7.2 Penetapan Kadar Abu Total

 Sebanyak 2 gram serbuk simplisia dimasukkan dalam kurs porselin yang telah dipijar dan ditara, kemudian diratakan. Kurs dipijar perlahan-lahan, kemudian naikkan suhu secara bertahap hingga 600°C sampai arang habis, jika arang masih tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas, saring melalui kertassaring bebas abu. Pijarkan sisa dan kertas saring dalam kurs yang sama. Masukkan filtrat kedalam kurs, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1995).

### 3.7.3 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

 Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, didihkan dengan 25 ml asam klorida encer selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui kurs kaca masir atau kertas saring bebas abu yang telah diketahui beratnya, lalu sisa dipanaskan, kemudian didinginkan dan ditimbang sampai bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995).

### 3.7.4 Penetapan Kadar Sari Larut Air

 Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 2,5 ml kloroforom dalam 100 ml aquadest selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Saring, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata (yang telah ditara) di atas penangas air hingga kering, sisa dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995).

### 3.7.5 Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

 Ditimbang 5 g serbuk simplisia yang telah dikeringkan di udara dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml etanol 96% dalam labu bersumbat sambil dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring, 20 ml filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara dan sisanya dipanaskan pada suhu 105℃ sampai bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 1995).

## 3.8 Skrining Fitokimia

### 3.8.1 Pemeriksaan Alkaloid

 Simplisia, ekstrak dan hasil fraksidaun bandotan ditimbang sebanyak 0,5 g, kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai untuk tes alkaloid sebagai berikut:

1. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.
2. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.
3. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Dragendorff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

 Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan sedikitnya 2 reaksi dari 3 percobaan di atas (Depkes RI, 1995).

### 3.8.2 Pemeriksaan Flavanoid

 Sebanyak 10 g serbuk simplisia, ekstrak dan hasil fraksi daun bandotan ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 ml lalu ditambahakan 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 (Depkes RI, 1995).

### 3.8.3. Pemeriksaan Tanin

 Sampel serbuk simplisia, ekstrak, dan hasil fraksidaun bandotan ditimbang sebanyak 0,5 g ditambah 10 ml akuades, dikocok dan disaring. Filtrat diencerkan dengan akuades sampai hampir 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 tannin (Depkes RI, 1995).

### 3.8.4 Pemeriksaan Saponin

 Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia, ekstrak dan hasil fraksidaun bandotan 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. Penambahan 1 tetes larutan HCL 2 N, apabila busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

### 3.8.5 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

 Sampel serbuk simplisia, ekstrak dan hasil fraksidaun bandotan ditimbang 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 (pereaksi liberman-burchard). Terbentuknya warna ungu sampai merah ungu menunjukkan adanya triterpenoida dan terbentuknya warna biru hijau menunjukkan adanya steroid (Depkes RI, 1995).

### 3.8.6 Pemeriksaan Glikosida

 Simplisia, ekstrak dan hasil fraksi daun bandotan masing-masing ditimbang sebanyak 3 gram, 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 50℃. 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 lubang, jika terbentuk cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI, 1995)

## 3.9 Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

### 3.9.1 Prinsip Metode Penengkapan Radikal Bebas DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (*2,2-difenil-1-picrylhidrazil*) sebagai radikal bebas, dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri sinar tampak pada Panjang gelomabang sekitar 400-800 nm. Prinsipnya adalah dengan mengukur absorbansi dari DPPH sebagai radikal bebas dalam larutan metanol sebelum dan setelah ditambah bahan uji, sehingga diperoleh angka penurunan absorbansi (% inhibisi) sebagai kemampuan sampel uji dalam meredam DPPH, dengan menghitung nilai IC50 (konsentrasi sampel uji yang menangkap radikal bebas 50%) menjadi parameter dalam menentukan aktivitas antioksidan sampel uji (Molyneux,2004).

### 3.9.2Pembuantan Larutan Induk Baku DPPH

DPPH (*2,2-difenil-1-picrylhidrazil*) ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan denganmetanol dalam labu tentukur 50 ml, dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda. (200 ppm)(Adri et al., 2023).

### 3.9.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Dipipet 2 ml larutan DPPH (konsentrasi 200 ppm)dimasukkan kedalam labu tentukur 10 ml, kemudian dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas dan dihomogenkan (40 ppm). Selanjutnya larutan DPPH konsentrasi 40 ppm diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm sehingga diperoleh absorbansi maksimum sebgai panjang gelombang maksimum DPPH(Suena & Antari, 2020).

### 3.9.4 Penentuan *Operating Time* DPPH

Dipipet 2 ml larutan induk DPPH (konsentrasi 200 ppm) dan dimasukkan dalam labu tentukur 10 ml kemudian dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda, diperoleh larutan DPPH konsentrasi 40 ppm, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (pada poin 5,6,7,8,9,10) setiap 1 menit, dimulai dari menit pertama hingga menit ke 60, diperoleh absorbansi yang stabil dalam beberapa menit, sebagai *operating time*( waktu kerja pengukuran yang baik) (Suena & Antari, 2020).

### 3.9.5Pembuatan Larutan Pembanding Vitamin C

Vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, dikarenakan vitamin C memiliki 2 gugus hidroksil yang mengakibatkan lebih mudah dalam pendonoran hidrogen. Vitamin C ditimbang sebanyak 25 mg, kemudian dilarutkan di labu ukur 25 ml dan ditambahkan metanol sampai tanda tera (1000 ppm) (larutan stok). Dilakukan pemipetan sebanyak 5 ml untuk pengenceran (200 ppm). Selanjutnya pengenceran bertingkat masing-masing konsentrasi vitamin C di pipet 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm(Adri et al., 2023).

### 3.9.6Pembuatan Larutan Ekstrak, Frkasi N-Heksan dan Fraksi Etil Asetat

Masing-masing konsentrasiekstrak, fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat ditimbang sebanyak 50 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml dan di tambahkan metanol p.a sampai tanda tera (1000 ppm). Selanjutnya buat beberapa seri pengenceran konsentrasi (100, 200,300, 400 dan 500 ppm). Dari 5 seri pengenceran tersebut kemudian dipipet sebanyak 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4ml, dan 5 ml, kemudian ditambahkan larutan DPPH masing-masing 2 ml (200 ppm)dan dimasukkan dalam labu tentukur 10 ml, lalu di cukupkan dengan metanol hingga tanda batas. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37ºC selama 30 menit dan dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 515 nm dan dihitung presentasi inhibisinya untuk mendapatkan IC50(Adri et al., 2023).

### 3.9.6Penentuan Persen Peredaman (% inhibisi)

Kemampuan antioksidan diperhitungkan dari angka penurunan serapan larutan DPPH (peredaman/penurunan warna ungu DPPH) akibat adanya penambahan larutan ekstrak sebagai bahan uji. Perbedaan nilai serapan larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan larutan uji dihitung sebagai persen peredaman dengan rumus :

 %inhibisi = $\frac{Ao-As}{Ao}$ x 100%

Keterangan:

Ao : absorbansi pada DPPH tanpa sampel

As : absorbansi mengandung sampel dan DPPH

### 3.9.7Penentuan nilai IC50

Nilai IC50 merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji (ppm) yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50% (mampu menghambat atau meredam proses oksidasi sebesar 50%). Nilai 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya.

Hasil perhitungan dimasukkan dalam persamaan linier dengan persamaan :

Y= a + bx

Keterangan : Y : % inhibisi

a : Gradien

x : konsentrasi (μg/ml)

b : konstanta

Untuk menghitung nilai IC50 persamaannya menjadi :

50 =$a+bx$

x =$\frac{50-a}{b}$

## 3.10 Uji Antibakteri

### 3.10.1 Sterilisasi Alat Dan Bahan

Alat-alat gelas disterilkan dalam oven dengan suhu 170ºC selama ± 2 jam, jarum ose dan pinset dibakar dengan pembakar diatas api langsung dan media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121ºC selama 15 menit (Fiana et al., 2020).

### 3.10.2 Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

Sebanyak 23-gram media NA serbuk dilarutkan ke dalam 1 liter aquades ke dalam erlenmeyer kemudian dihomogenkan. Tutup Erlenmeyer dengan alumunium foil dan disterilisasi dalam autoclave dengan suhu 121ºC dan tekanan 2 atm selama 15 menit(Fiana et al., 2020).

### 3.10.3 Pembuatan Larutan Standar Kekeruhan (Larutan *Mc. Farland*)

Larutan asam sulfat dengan konsentrasi 0,36 N sejumlah 99,5 ml diaduk bersama dengan larutan BaCl2.2H2O dengan konsentrasi 1,175% sejumlah 0,5 ml dalam sebuah erlenmeyer. Selanjutnya, diaduk hingga terbentuk larutan yang memiliki tingkat keruh. Kekeruhan pada larutan ini digunakan sebagai standar untuk mengukur tingkat kekeruhan pada suspensi uji bakteri(Hutahean, 2020).

### 3.10.4 Sumber isolat bakteri

Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi yang terletak di Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.

### 3.10.5 Pembuatan stok kultur bakteri Staphylococcus aureus

Satu koloni bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dari kultur murni. Bakteri tersebut kemudian dioleskan dengan hati-hati di atas permukaan media Nutrient Agar yang telah mengeras. Setelah tahap tersebut, media dibiarkan di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C(Nasution et al., 2023).

### 3.10.6 Pembuatan stok kultur bakteri Escherichia coli

Satu koloni bakteri *Escherichia coli* diambil dari kultur murni. Kemudian, bakteri ini dengan hati-hati diletakkan di atas permukaan media Nutrient Agar yang telah mengeras. Setelahnya, media tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C(Nasution et al., 2023).

### 3.10.7 Pembuatan Suspensi Bakteri

Membuat suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dilakukan dengan mengambil beberapa kelompok bakteri. Kelompok-kelompok ini dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang mengandung larutan fisiologis NaCl 0,9%. Setelah itu, kekeruhan suspensi disesuaikan dengan standar McFarland yang telah ditetapkan(Nasution et al., 2023).

### 3.10.8 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji sifat antibakteri dilakukan dengan metode difusi menggunakan kertas cakram yang melibatkan sejumlah kondisi eksperimen. Ini melibatkan ekstrak, fraksi n-heksan dan etil asetat dengan variasi konsentrasi (40%, 30%, 20%, dan 10%), serta kontrol positif dan negatif. Alat-alat yang digunakan telah di sterilkan terlebih dahulu dalam oven. Langkah selanjutnya menuangkan 20 ml media MHA steril ke dalam cawan petri dan menunggu hingga mengeras. Setelah itu, suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diambil menggunakan cotton swab steril dan ditebarkan pada permukaan media MHA. Ekstrak, fraksi n-heksan dan etil asetat dari daun bandotan dengan berbagai konsentrasi (40%, 30%, 20%, dan 10%) kemudian dijatuhkan di atas kertas cakram. Sebagai kontrol, DMSO digunakan sebagai kontrol negatif dan antibiotik kloramfenikol sebagai kontrol positif. Kertas cakram tersebut dengan hati-hati ditempelkan pada permukaan media MHA yang sudah diinokulasi dengan bakteri, menggunakan pinset. Percobaan ini diulang tiga kali untuk memastikan konsistensi hasil. Setelah itu, media yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C dan dibiarkan menginkubasi selama 18-24 jam. Setelah periode inkubasi selesai, zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong, yang diindikasikan oleh area tanpa pertumbuhan bakteri di sekitar kertas cakram(Nasution et al., 2023).

### 3.10.9 Analisa Data

Pengukuran dimeter zona seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1 dapat dihitung dengan rumus = $\frac{\left(DV-DC\right)+(DH-DC)}{2}$

Keterangan:

DV: Diameter Vertikal

DH: Diameter Horizontal

DC: Diameter Cakram



Gambar 3. 1Pengukuran diameter zona hambat Daya

Daya antibakteri terbagi menjadi 4 kategori (Davis and Stout, 1971) seperti yang ditunjukkan Tabel 3.1

Tabel 3. 1 Kriteria Daya Antibakteri (Davis & Stout, 1971)

|  |  |
| --- | --- |
| Kategori Daya Hambat | Diameter Zona Hambat |
| Lemah | ˂ 5 mm |
| Sedang | 5-10 mm |
| Kuat | 10-20 mm |
| Sangat kuat | ˃ 20 mm |