**BAB III**

**METODE PENELITUAN**

**3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian yang dilakukan secara eksperimental. Data yang dikumpulkan berupa data kualitatif dan kuantitatif. Urutan tahapan pelaksanaan penelitian meliputi pengumpulan dan pengolahan sampel, pembuatan ekstrak, pembuatan fraksi, skrining fitokimia, uji totoksitas metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap larva udang *Artemia Salina* Leach dan uji antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

1. **Variabel Penelitian**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sampel ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting dan variasi konsentrasi dari ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting. Variabel terikat yang digunakan adalah karakteristik simplisia, metabolit sekunder , uji toksisitas dan uji antibakteri ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting.

1. **Parameter Penelitian**

 Parameter dalam penelitian ini adalah makroskopik, mikroskipik, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, alkaloid, flavonoid, triterpenoid atau steroid, tanin, saponin, glikosida, nilai LC50 dan diameter zona hambat (mm)..

**3.2 Jadwal Dan Lokasi Penelitian**

1. **Jadwal Penelitian**

Penelitian ini di mulai pada bulan Januari 2024 sapai dengan bulan Juni 2024.

1. **Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan dilaboratorium Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan, yaitu laboratorium botani, mikrobiologi, farmakologi dan toksikologi.

**3.3 Bahan Dan Peralatan**

1. **Bahan Penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun karamunting, larva udang *artemia saina leach*, aquadest, etanol 96%, n-heksan, etil asetat, DMSO 5%, nutrient agar (NA), MHA, garam (NaCl), kertas cakram, bakteri *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan antibiotik kloramfenikol.

1. **Peralatan Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah rotary evaporatr, timbangan digital, blender, kertas saring, wadah uji, toples kaca, beker glas, glas ukur, lampu, tabung reaksi, rak tabung, vortex, Bunsen, jarum ose, cawan petri, autoklaf, kapas swab, inkubator, dan jangka sorong.

**3.4 Persiapan Bahan**

1. **Determinasi Sampel**

Determinasi atau identifikasi pada tumbuhan dilakukan di Herbarium Medanense (MEDA) Universitas Sumatera Utara. Determinasi dilakukan bertujuan untuk memastikan kebenaran tumbuhan yang akan digunakan sebagai sampel penelitian.

1. **Pengambilan Sampel**

Pengamilan sampel daun karamunting(*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) di ambil di dusun IV Meranti Kecamatan Meranti Kabupaten Asahan Provinsi Sumatera Utara.

1. **Pengumpulan Sampel**

 Proses pengumpulan sampel daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) dilakukan secara purposive sampling, yaitu tanpa membandingkan dengan tanaman yang sama dari daerah lain.

1. **Pengolahan Sampel**

 Sampel daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) yang telah dikumpulkan disortasi basah dengan tujuan untuk memisahan kotoran-kotoran atau bahan asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dari kotoran lain yang masih tertinggal. Selanjutnya sampel dicuci dengan air mengalir yang bertujuan untuk memisahkan sampel dari sisa-sisa tanah atau kotoran yang masih melekat. Kemudan ditiriskan dan ditimbang sebagai berat basah lalu dirajang. Selanjutnya sampel yang telah dirajang dikeringkan. Sampel dikeringkan dengan suhu 40-50ºC terlindung dari sinar matahari. Proses pengeringan dilakukan sampai sampel bahan baku benar benar kering. Selanjutnya sampel disortasi kering untuk memisahkan bahan-bahan asing yang melekat pada sampel. Setelah itu sampel yang sudah kering diserbukkan dengan menggunakan blender, kemudian diayak dan ditimbang. Serbuk simplisia yang diperoleh disimpan pada suhu kamar dalam wadah tertutup rapi.

**3.5 Pembuatan Pereaksi**

**3.5.1 Larutan Pereaksi Mayer**

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

**3.5.2 Larutan Preaksi Dragendorff**

 Sebanyak 0,8 g bismuth (III) nitrat dilarutkan dalam asam nitrat pekat 20 mL lalu dicampurkan dengan kalium iodida sebanyak 27,2 g dalam 50 mL air suling. Campuran didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan dienceran dengan air secukupnya hingga 100 mL (Depked RI,1995).

**3.5.3 Larutan Preaksi Bouchardat**

 Kalium iodida ditimbang sebanyak 4 g, kemudian dilarutkan dalam air suling, lalu ditambahkan iodium sebanyak 2 g dan ditambahkan dengan air suling sehingga mencapai volume 100 mL (depkes RI,1995).

**3.5.4 Larutan Preaksi Besi (III) Klorida 1%**

 Besi (III) klorida diambil sebanyak 1 g dan dilarutkan dalam 100 mL akuadest (Depkes RI,1995).

**3.5.5 Larutan Preaksi Asam Klorida 2N**

 Sebanyak 17 mL asam klorida pekat diencerkan dengan air suling hingga 100 mL (Depkes RI,1995).

**3.5.6 Larutan Preaksi Lieberman Bouchard**

 Sebanyak 5 mL asam, asetat anhidrida dicampurkan dengan 5 mL asam sulfat pekat kemudian ditambahkan etanol hingga 50 mL (Depkes RI,1995).

**3.5.7 Larutan Pereaksi Molish**

 Sebanyak 3 g α-naftol dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga 100 mL (Depkes RI,1995).

**3.5.8 Larutan Pereaksi Asam Nitrat 0,5 N**

 Asam nitrat pekat sebanyak 3,4 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu diencerkan dengan aquadest sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

**3.5.9 Larutan Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 N**

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

**3.5.10 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2N**

 Asam sulfat pekat sebanya 5,5 mL dipipet lalu dimasukkkan ke dalam gelas kimia 100 mL lalu diencerkan dengan aquaest samai garis tanda ( Depkes RI,1995).

**3.5.11 Larutan Preaksi Natrium Hidroksida 2N**

 Sebanyak 8,002 g kristal natrium hidroksida dilarutkan dalam air suling hingga 100 ml (Deokes RI,1995)

**3.5.12 Larutan Pereaksi Kloral Hidrat**

 Sebanyak 70 g kloralhidrat dilarutkan dalam 100 ml air (Depkes RI,1995)

**3.6 Krakterisasi Simplisia**

 Pemeriksaan karakterisasi simplisia meliputi parameter spesifik (pemeriksaan makroskopik, pemeriksaan mikroskopik srbuk simplisia, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol) dan parameter non spesifik (penetapan susut pengeringan, kadar air, penetapan kadar abu total, dan penetapan kadar abu tidak larut asam).

**3.6.1 Parameter Spesifik**

**3.6.1.1 Pemeriksaan Makroskopik**

 Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan cara memperhatikan bentuk, warna, rasa dan bau terhadap simplisia daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.). Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan pengenalan awal yang sederhana dan seobjektif mungkin.

**3.6.1.2 Pemeriksaan Mikroskopik**

 Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) dengan cara serbuk simplisia ditaburkan di atas objek glass dan ditetesi dengan kloral hidrat sebanyak 1 tetes kemudian ditutup dengan deck glass dan difiksasi kemudian diamati dibawah mikroskop.

**3.6.1.3 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air**

 Maserasi selama 24 jam 5g serbuk dengan campuran air kloroform P ad 100 mL menggunakan labu bersumbat sambil sekali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan selanjutnya dibiarkan selama 18 jam. Di saring, uapkan 20 ml filtrate hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105ºC hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam air, dihihtung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI,1995).

**3.6.1.4 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol**

 Maserasi selama 24 jam 5 g sebuk dengan 100 ml etanol, menggunakan labu bersumbat sambil seklai-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Disaring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol, uapkan 20 ml filtrate hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105ºC hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI.1995).

**3.6.2 Parameter Nonspesifik**

**3.6.2.1 Penetapan Kadar Air**

 Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotrope. Alatnya terdiri dari labu alas bulat 500 ml, alat penampung dan pendingin, tabung penyambung dan penerima 10 ml.

a. Penjenuhan Toluene

 sebanyak 200 ml toluen dan 2 ml air suling dimasukkan ke dalam labu alas bulat dipasang alat penampung dan pendingin, selanjutnya didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan selama 30 menit, lalu volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 ml.

b. Penetapan Kadar Air Simplisia

 sebanyak 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu yang telah berisi toluene jenuh, selanjutnya labu dipanaskan secara hati-hati selama 15 menit. Setelah toluene mulai mendidih atur penyulingan dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes per detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersulig bagian dalam pendingain dicuci dengan toluene jenuh air, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi degan toluene jenuh air. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dinginkan tabung penerima hingga suhu ruang. Jika ada tetes air yang melekat, gosok tabung pendingin dan tabung penerima dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluene jenuh air hingga air turun. Baca volume air setelah air dan toluene memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % (DepkesRI,1995).

**3.6.2.2 Penetapan Kadar Abu Total**

 Ditimbang seksama 2 g zat yang telah digerus dan ditimbang seksama bahan uji yang telah dihalusan dan masukkan kedalam krus silika yang telah dipijarkan dan ditara, pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang. Pijaran pada tanur dilakukan dengan suhu 600ºC kenudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang dikeringkan di udara. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas diadik kemudian disaring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan kertas saring beserta sisa penyarian dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan dan pijarkan hingga bobot tetap pada suhu 800±25 ºC. kadar abu total dihihtung berat bahan uji, dinyatakan dalam %b/b (Depkes RI,1995).

**3.6.2.3 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam**

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, didihkan dengan 25 ml asam klorida encer P selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut asam, kemudian disaring melaui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas dan dipijarkan hingga bobot tetap kemudian ditimbang. Perbedaan bobot sesuai dengan jumlah abu yang larut dalam air. Hitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI,1995).

**3.7 Ekstraksi Sampel**

**3.7.1 Maserasi**

 Sebanyak 700 gram serbuk simplisia daun karamunting *(rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)dimasukkan kedalam bejana maserasi, kemudian ditambahkan 75 bagian etanol 96%, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambal berulang ulang diaduk. Setelah 5 hari, diserkai, ampas diperas sehingga diperoleh hasil maserat I. selanjutnya ampas dibilas dengan cairan penyari 25 bagian segingga deperoleh maserat II. Kemudian maserat I dan maserat II digabungkan selanjutnya dipindahkan ke dalam bejana tertutup dan dibiarkan ditempat sejuk terindung dari pengaruh langsung cahaya selama 2 hari. Setelah itu, di enap tuangkan sehingga diperoleh hasil ekstrak cair. Selanjutnya hasil ekstrak dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator dengan suhu tidak lebih ari 50ºC hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1979).

**3.7.2 Fraksinasi ekstrak etanol daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

40 gram ekstrak pekat daun karamunting di larutkan dengan 80 ml etanol 96% hingga larut. Selanjutnya ditambahkan 80 ml aquades, dan campuran ini dimasukkan ke dalam corong pisah. Kemudian tambahkan 200 ml n-heksan lalu campuran ini dikocok dan diamkan hingga terbentuk dua lapisan terpisah. Lapisan n-heksan, yang merupakan lapisan bagian atas. Proses fraksinasi dilakukan berulang hingga lapisan n-heksan memberikan hasil yang netral atau tidak berwarna. Lapisan n-heksan ini dikumpulkan untuk mendapatkan fraksi n-heksan. selanjutnya, lapisan bawah (residu) diambahan 200 ml etil asetat, dikocok, dan dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan terpisah. Lapisan etil asetat, yang berada di lapisan atas. proses fraksinasi dilakukan berulang hingga lapisan etil asetat memberikan hasil yang negatif atau tidak berwarna. Lapisan n-heksana dan lapisan etil asetat yang telah dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, dan selanjutnya diuapkan di atas waterbath pada suhu yang sama hingga diperoleh fraksi pekat n-heksan dan etil asetat (Nasution.A.W. *et al*.2023).

**3.8 Skrining Fitokimia**

 Skrining fitokimia meliputi pemeriksaan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid atau steroid, tannin, saponin dan glikosida

**3.8.1 Pemeriksaan Alkaloid**

 Ekstra etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) ditimbang masing-masing sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air suling , dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, lalu didinginkan dan disaring. Filtrate dipakai untuk tes alkaloid sebagai berikut:

a. filtrate sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning

b. filtrate sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam

c. filtrate sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pakai Dragondorff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

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

**3.8.2 Pemeriksaan Flavonoid**

 Sebanyak 10 g ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) ditimbang, kemudian masing-masing ditambahkan 100 mL air panas, didihkan selama 5 menit dan diaring dalam keadaan panas. Filtrate 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 selanjutnya dibiarkan memisah. Flavonoid positif juka terbentuk warna merah, kuning, jingga pada lapisan alkohol (Depkes RI,1995)

**3.8.3 Pemeriksaan Triterpenoid Atau Steroid**

 Sebanyak 1 g ekstrak etanol , fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) di maserasi dengan 20 mL eter selama 2 Jam, lalu disaring. Filtrate diuapkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (pereaksi liberman burchard). Terbentuknya warna unggu sampai merah ungu menunjukkan adanya riterpenoid da terbentuknya warna biru hijau menunjukkan adanya steroid.

**3.8.4 Pemeriksaan Tanin**

 0,5 g ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) di masukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL auadest, dikocok dan disaring filtrate diencerkan dengan akuades sampai tidak berwarna. Larutan diambil 2 mL ditambahkan 1 samapi 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Depkes RI,1995).

**3.8.5 Pemeriksaan Saponin**

 0,5 g ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan kocok selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil tidak berkurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI,1995).

**3.8.6 Pemeriksaan Glikosida**

 Sampel ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) ditimbang sebanyak 3g lalu disaring dengan 30 ml campuran etanol 96% da akuades (7:3) dan 10 ml asam klorida 2N, direfluks selama 10 menit, kemudian ditimbang dan disaring. Ambil 20 ml filtrate ditambahkan 25 ml akuadest dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 M dikocok, kemudian diamkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrate disari dengan 20 ml campuran isopropanol : kloroform (2:3) sebanyak 3 kali. Kumpulan sari air diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50ºC. residu dilarutkan dalam 2 ml methanol, diambil filtrate sebanyak 0,1 ml di dalam tabung reaksi diuapkan diatas penangas air, ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes preaksi molish. Kemudian ditambahkan asam sulfat pekat 2 ml perlahan- lahan melalui dinding tabung, jika terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida ( Depkes RI, 1995).

**3.9. Pengujian Toksisitas Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**

**3.9.1 Pembuatan Air Laut Buatan**

 Air laut buatan dibuat dengan cara melarutkan 38 gram garam tanpa iodium, dimsukkan ke dalam labu 1000 mL, lalu volume dicukupkan dengan air hingga tanda batas lalu diaduk sampai homogeny. Kemudian disaring dengan kertas whatman (Saragih *et al*., 2022).

**3.9.2 Penetasan Telur *Artemia Salina Leach***

 Penetasan telur dilakukan dalam wadah bening dengan menggunakan media air laut. Wadah yang digunakan dibagi menjadi dua bagian oleh sekat berlubang yaitu bagian gelap dan bagian terang. Sekat berlubang menjadi jalan untuk larva yang telah menetas umtuk bergerak secara alamiah kearah terang, wadah diisi dengan saru liter air laut buatan. Kemudian pada bagian gelap dimasukkan satu sendok (sendok teh) telur yang sebelumnya telah dicuci dengan cara direndam dengan aquadest selama 1 jam. Pada wadah bagian gelap ditutup dengan aluminium foil atau lakban hitam. Pada wadah bagian terang diberi penerangan dengan cahaya lampr neon 40 watt agar suhu penetasan 25-30 ºC tetap terjaga. Telur udang dibiarkan terendam selama 48 jam smpai telur menetas. Telur akan menetas dalam waktu 24-36 jam dan bergerak secara alamiah menuju daerah terang sehingga larva udang terpisahkan dari bagian telur atau kulit telur. Larva yang telah aktif bergerak siap digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian (Fadli *et al*., 2019).

**3.9.3 Pembuatan Konsentrasi Larutan Ekstrak**

 Ekstrak etnol, fraksinasi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) dibuat arutan induknya 2000 /mL dengan menimbang 0,2 g ektrak lalu dicukupkan dengan air laut hingga 100 mL. larutan ekstrak etanl, fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) dibuat menjadi 10 konsentrasi untuk terlebih dahulu digunakan sebagai orientasi yaitu konsentrasi 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL, 600 µg/mL, 700 µg/mL, 800 µg/mL, µg/mL dan 1000 µg/mL, dan 1 tabung digunakan untuk kontrol negative, masing-masing dengan tiga kali pengulangan (Putri & Nasution, 2022). untuk membuat konsentrasi 100 µg/mL dipipet 0,5 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL. untuk membuat konsentrasi 200 µg/mL dipipet 1 ml larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL untuk konsentrasi 300 µg/mL dipipet 1,5 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL. untuk membuat konsentrasi 400 µg/mL dipipet 2 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL untuk. 500 µg/ml dipipet 2,5 mL larutan induk baku dicukupkan volumenya 10 mL. untuk membuat konsentrasi 600 µg/mL dipipet 3 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL untuk 700 µg/mL dipipet 3,5 mL larutan induk baku dicukupkan volumenya 10 mL. untuk membuat konsentrasi 800 µg/mL dipipet 4ml larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL untuk 900 µg/mL dipipet 4,5 mL larutan induk baku dicukupkan volumenya 10 mL dan untuk 1000 µg/mL dipipet 5 mL larutan inuk baku dicukupkan volumenya 10 mL.

**3.9.4 Uji Toksisitas Ekstrak Daun Karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) Menggunakan Metode BSLT**

 Uji toksisitas dilakukan dengan cara masing-masing konsentrasi dilakukan 3 duplikasi dimana tiap kelompok terdapat sebanyak 10 ekor larva artemia salina leach. Disiapkan wadah untuk pengujian, yang mana masing-masing konsentrasi ekstrak sampel membutuhan 3 wadah dan 3 wadah sebagai kontrol untuk masing-masing duplikasi, kemudian pada masing-masing konsentrasi larutan dimasukkan 10 ekor larva *artemia slina leach*. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva *artemia salina leach* dimana, setiap konsentrasi dilakukan 3 duplikasi dan dibandingkan dengan kontrol. Kriteria standar untuk menilai kematian *artemia salina leach* yaitu jika larva *artemia salina leach* tidak menunjukka adanya pergerakan selama beberapa detik observasi. Selanjutnya dihitung persentasi kematian dan dianalisiss menggunakan analisis probit (Arianta & Datu, 2022).

**3.10 Pengujian Antibakteri Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli***

**3.10.1 Sterilisasi Alat Dan Bahan**

Alat-alat gelas yang berskala dan tidak tahan pemanasan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121ºC selama 15 menit dan untuk alat-alat yang tidak berskla dan tahan pemanasan disterilkan pada oven dengan suhu 170ºC selama 2 jam (Arina *et al.*, 2023).

**3.10.2 Pesiapan Media Nutrient Agar (NA)**

 Media Nutrient Agar (NA) digunakan untuk peremajaan bakteri, sebanyak 23 gr NA dilarutkan dalam 1000 mL air suling dalam erlenmeyer lalu dipanaskan menggunakan hotplate sampai larut sempurna. Media disterilkan kedalam autoklaf dengan suhu 121 ̊C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. kemudian dituangkan sebanyak 5 ml kedalam tabung reaksi steril dan ditutup. setelah itu dibiarkan selama kurang lebih 30 menit pada suhu ruang sampai media memadat pada kemiringan 30 ̊ (Safitri, L. N., Ulfa, A. M., & Marcellia, S.2023).

**3.10.3 Media Mueller Hinton Agar (MHA)**

Ditimbang sebanyak 3,8 gram MHA dimasukkan kedalam Erlenmeyer 250 mL, dilarutkan dengan aquadest sebanyak 100 mL, kemudian dipanaskan sampai mendidih diatas api bunsen, diangkat kemudian ditutup dengan kapas, dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah media steril dikeluarkan dari autoklaf dan dibirkan dingin, kemudian tuangkan media sebanyak 10 mL kedalam tiga buah cawan petri steril dan biarkan membeku (Dewi.A.P, dkk2023).

**3.10.4 Pembuatan Larutan Nacl Fisiologis 0,9%**

 Sebanyak 0,9 g Natrium klorida dilarutkan dalam aquadest sedikit demi sedikit dalam labu takar 100 mL sampai terlarut sempurna. Kemudian ditambhakan kembali aquadest sampai garis tanda, larutan tersebut dimasukkan dalam labu Erlenmeyer steril yag tertutup dan larutan di sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121ºC selama 15 menit (Depkes RI,1979).

**3.10.5 Pembuatan Larutan Standar Mc.Farland 0,5**

Larutan BaCl₂ 1% w/v sebanyak 0,054 mL dicampur dengan H₂SO 1% v/v sebanyak 9,946 mL di dalam tabung reaksi, kemudian divortex sampai campuran tersuspensi secara homogen. Setelah itu, hasil suspensi dimasukkan ke dalam screw cap tube dan ditutup menggunakan alumunium foil untuk mencegah penguapan. Larutan Mc Farland disimpan pada suhu 2-4°C dengan posisi tegak (Khafipah, N., Saula, L. S., & Kasasiah, A.2022).

**3.10.6 Pembuatan Inokulasi Bakteri (Peremajaan)**

Inokulasi bakteri adalah penumbuhan bakteri dilakukan dalam tabung reaksi agar yang telah dibuat. Cara yang dilakukan adalah diambil 1 ose bakteri *staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* digoreskan dimedia agar miring lalu diinkubasi selama 24 jam (Marliza *et al*.,2023).

**3.10.7 Pembuatan Suspensi Bakteri**

 Biakan bakteri *staphylococcus aureus* dan *esccherichia coli* diambil menggunakan jarum ose dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCl 0,9%. Selanjutnya dibandingkan kekeruhannya dengan larutan Mc.Farland (Sukadiasa *et al*., 2023).

**3.10.8 Pembuatan Larutan Kontrol Dan Larutan Uji**

a. Kontrol Positif

Kontrol positif dibuat dari sediaan obat kapsul kloramfenikol 250 mg. kapsul kloramfenikol dibuka cangkang kapsulnya lalu ditimbang serbuk dalam kapsul tersebut sebanyak 30 µg. Kemudian serbuk dilarutkan dalam etanol 5 ml untuk memperoleh larutan stok kloramfenikol 30 µg/50 µL (Putu Saraswati Kristina *et al*., 2023)

b Kontrol Negatif

 kontrol negatif menggunakan DMSO 5% dibuat dengan cara ambil 5 ml DMSO masukkan kedalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan aquadest sampai tanda batas.

c. Larutan Uji

 Larutan uji dibuat 10%; 20%; 30%; b/v dengan cara:

1. Konsentrasi 10 %

Ditimbang sebanyak 0,5 g ekstrak, fraksi n heksan dan etil asetat daun karamunting kemudian dilarutkan dengan DMSO 5% hingga 5 ml.

1. Konsentrasi 20 %

Ditimbang sebanyak 1 g ekstrak, fraksi n heksan dan etil asetat daun karamunting kemudian dilarutkan dengan DMSO 5% hingga 5 ml.

1. Konsentrasi 30 %

Ditimbang sebanyak 1,5 g ekstrak, fraksi n heksan dan etil asetat daun karamunting kemudian dilarutkan dengan DMSO 5% hingga 5 ml. (Norhaliza.S,dkk,2022).

**3.10.9 Pembuatan Cakram Atau Diks**

 Pembuatan cakram atau diks dilakukan dengangan menggunakan kertas cakram steril yang kemudian dijenuhkan dengan larutan konsentrasi ekstrak dan fraksi daun karamunting dengan konsentrasi 30%; 20%; dan 10% cakram dengan DMSO sebagai kontrol negatife dan cakram kloramfenikol sebagai kontrol positif (Sukadiasa *et al.*, 2023).

**3.10.10 Uji Antibakteri Ekstrak Dan Fraksi Daun Karamunting *(Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi menggunakan kertas cakram yang melibatkan sejumlah kondisi eksperimen. Ini melibatka ekstrak etanol, fraksi n- heksan dan etil asetat dengan variasi konsentrasi (30%, 20%, 10%) serta kontrol positif dan negatif. Alat-alat yang digunakan telah di sterilkan terlebih dahulu dalam oven. Langkah selanjutnya menuangkan 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 etanol, Fraksi n-heksan dan etil asetat daun karamunting dengan konsentrasi (30%, 20%, 10%) 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.kemudian, media yang telah siap 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 (Nasition.A.W,dkk,2023).

**3.11 Analisis Data**

**3.11.1 Uji Toksisitas**

Data hasil penelitian uji toksisitas diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan kurva. Data dari uji toksisitas akan dianalisis dengan analisis probit serta menggunakan Microsoft office excel utuk mencari regresi linier dengan hubugan antara nilai probit dengan log konsentrasi. Nilai LC50 dapat dihitung dengan memasukkan nilai 5 (probit 50% kematian hewan uji) sebagai y sehingga dihasilkan x sebagai nilai log konsentrasi. Antilog nilai x tersebut merupakan nilai LC50 (Putri & Nasution, 2022).

**3.11.2 Uji Antibakteri**

 Data yang diperoleh pada penelitian ini yaitu dari diameter zona hambat , pengukuran zona hambat dilakukan dengan menggunakan jangka sorong dan data yang diperoleh dari hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan diagram batang (Azlin *et al.*, 2023).