# BAB III

# METODE PERCOBAAN

* 1. **Rancangan Penelitian**

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

# Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak batang karamunting, fraksi batang karamunting dan variasi konsentrasi larutan ekstrak dan fraksi batang karamunting. Variabel terikat yaitu karakteristik simplisia, skrining fitokimia, uji toksisitas dan uji antibakteri.

# Parameter Penelitian

Parameter dalam penelitian ini adalah makroskopik, mikroskopik, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, alkaloid, flavonoid, steroid atau triterpenoid, tanin, saponin, glikosida, LC50 dan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri.

# Jadwal dan Lokasi Penelitian

* + 1. **Jadwal Penelitian**

Penelitian ini dimulai pada bulan januari 2024 sampai bulan mei 2024

**3.2.2 Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan, yaitu di laboratoium penelitian, laboratoium farmakologi dan toksikologi, laboratorium mikrobiologi dan laboratoium botani.

# Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) yang dilarutkan dengan pelarut etanol 96% kemudian difraksinasi dengan pelarut n-heksan dan etil asetat.

# Alat dan Bahan

* + 1. **Alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan adalah timbangan analitik (Mettler Toledo), kertas perkamen, blender (Philips), *rotary evaporator* (R-3 Buchi), *water bath* dan *hot plate* (Thermo), mikroskop, *object glass* dan *deck glass* (Onelab), perkolator, aluminium foil, erlenmeyer, *beaker glass*, corong, gelas ukur, tabung reaksi, batang pengaduk, labu tentukur, tanur, cawan penguap, krus porselen, desikator, vial dan bejana penetasan telur *Artemia salina* Leach, lampu dengan intensitas cahaya rendah, corong pisah, bunsen, autoklaf, inkubator, cawan petri, LAF (laminar air flow), kaca arloji, rak tabung reaksi, pipet tetes, jarum ose, jangka sorong, penjepit tabung, kapas steril, kertas cakram steril.

# Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.), telur *Artemia Salina* Leach, garam tanpa iodium, aquadest, bahan-bahan kimia seperti etanol, asam klorida, pereaksi mayer, pereaksi dragendroff , asam sulfat pekat, kloroform, isopropanol, pereaksi molish, kloral hidrat. Media Nutrient Agar (NA), Media Mueller Hinton Agar (MHA), bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli,* Tween 80, spiritus.

# Pengumpulan, Determinasi dan Pengolahan Sampel

* + 1. **Pengumpulan Sampel**

Pengumpulan sampel batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) di daerah Percut Sei Tuan, JL. Williem Iskandar, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara. Proses pengambilan batang karamunting dilakukan secara *purposive sampling*, yaitu tanpa membandingkan dengan tanaman yang sama dari daerah lain.

# Determinasi Sampel

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

# Pengolahan Sampel

Sampel batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) yang terkumpul disortasi basah dengan tujuan untuk memisahkan benda asing seperti bagian tanaman yang tidak diinginkan dan sisa kotoran lainnya. Sampel kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel pada sampel. Kemudian tiriskan dan timbang sebagai berat basah lalu rajang. Sampel yang lembab sangat rentan terhadap pertumbuhan mikroba. Untuk mencegahnya, diperlukan langkah selanjutnya yaitu langkah pengeringan. Sampel dikeringkan di bawah sinar matahari. Proses pengeringan dilakukan hingga bahan baku menjadi rapuh. Penyortiran kering kemudian dilakukan untuk memisahkan benda asing dan komponen yang tidak dikeringkan dengan benar. Kemudian timbang kembali, haluskan dengan blender, ayak dan timbang kembali. Serbuk simplisia yang diperoleh disimpan dalam wadah tertutup pada suhu kamar.

# Pembuatan Pereaksi

* + 1. **Larutan Pereaksi Mayer**

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

# Larutan Pereaksi Dragendorff

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

# Larutan Pereaksi Bouchardat

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

# Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1 %

#  Besi (III) Klorida Ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dengan 100 mL aquades (Ditjen POM, 1995)

# Larutan Pereaksi Asam Klorida 2 N

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

# Larutan Pereaksi Lieberman-Bouchard

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

# Larutan Pereaksi Molish

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

# Larutan Pereaksi Asam Nitrat 0,5 N

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

# 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 akuades bebas CO2 sampai garis tanda (Ditjen POM, 1995).

# Larutan Pereaksi Kloral Hidrat

Sebanyak 70 g kloralhidrat dilarutkan dalam 100 mL air (Ditjen POM, 1995).

# Larutan Pereaksi Natrium Hidroksida 2 N

Sebanyak 8,002 g kristal natrium hidroksida dilarutkan dalam air suling hingga 100 mL (Ditjen POM, 1995).

**3.6.12 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2 N**

Asam sulfat pekat sebanyak 5,5 mL dipipet lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL lalu diencerkan dengan akudes sampai garis tanda (Ditjen POM, 1995).

# Karakterisasi Simplisia

Kajian karakterisasi simplisia meliputi parameter spesifik (pemeriksaan makroskopis, pemeriksaan mikroskopis serbuk simplisia, penentuan kadar sari larut dalam air, penentuan kadar sari larut dalam etanol) dan parameter non spesifik (pengukuran kadar air, dan pengukuran volume abu total, Penentuan kadar abu tidak larut asam).

# Parameter Spesifik

* + - 1. **Pemeriksaan Makroskopik**

Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan cara memperhatikan bentuk, warna, rasa dan bau terhadap simplisia batang karamunting. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan pengenalan awal yang sederhana dan subjektif mungkin.

# Pemeriksaan Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) dengan cara serbuk simplisia ditaburkan di atas object glass dan ditetesi dengan larutan fluroglucinol sebanyak 1 tetes kemudian ditutup dengan deck glass dan difiksasi. Diamati di bawah mikroskop.

# Penetapan Kadar Sari Larut dalam Air

Keringkan bubuk sampel di udara terbuka dan maserasi 5 g bubuk dalam 100 mL air kloroform (2,5 mL kloroform dalam 97,5 mL air) selama 24 jam menggunakan labu tertutup sambil dikocok berulang kali selama 6 jam pertama, lalu biarkan selama 18 jam. Saring 20 mL filtrat ke dalam wadah beralas datar yang telah ditara, uapkan hingga kering, dan panaskan sisanya pada suhu 105°C hingga berat konstan. Perhitungan kandungan sari yang larut dalam air dihitung pada bahan yang dikeringkan di udara (Ditjen POM, 1995).

# Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol

Keringkan serbuk di udara, maserasi selama 24 jam 5 g serbuk dengan 100 mL etanol, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring cepat dengan menghindari penguapan etanol, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan beralas datar yang telah ditara, panaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 1995).

# Parameter Nonspesifik

* + - 1. **Penetapan Kadar Air**

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotropi. Alat terdiri dari labu alas bulat 500 mL, alat penampung dan pendingin, tabung penyambung dan penerima 10 mL.

# Penjenuhan toluene

Sebanyak 200 mL toluene dan 2 mL air suling dimasukkan ke dalam labu alas bulat dipasang alat penampung dan pendingin, kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan 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 panaskan labu dengan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mulai mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen jenuh air, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluen 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 toluen jenuh air hingga tetesan air turun. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % (Ditjen POM, 1995).

# Penetapan Kadar Abu Total

Ditimbang saksama 2 g zat yang telah digerus, bahan uji yang telah dihaluskan dan masukkan ke dalam krus platina atau krus silikat yang telah dipijar dan ditara, ratakan. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang, pijaran dilakukan pada tanur dengan suhu 600°C kemudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang dikeringkan diudara. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, aduk, saring melalui kertas saring 800±25º. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Ditjen POM, 1995).

# Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, didihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas dan pijarkan hingga bobot tetap, lalu timbang. 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 (Ditjen POM, 1995).

# Ekstraksi Sampel

Simplisia batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)disediakan sebanyak 1 kg lalu dimasukkan ke dalam perkolator, kemudian ditambahkan etanol 96% sampai simplisia terendam, ditutup dan dibiarkan sekurang-kurangnya selama 3 jam terlindung dari cahaya. Setelah itu, larutan penyari di alirkan dengan melihat tetesan perkolat 1 ml per menit. Tambahkan berulang-ulang sehingga selalu terdapat selapis cairan penyari di atas simplisia. Hentikan perkolasi jika cairan perkolat sudah berwarna jernih. Setelah itu, diperoleh hasil ekstrak cair. Kemudian ekstrak cair dipekatkan pada rotary evaporator dengan suhu tidak lebih dari 50°C dan dilanjutkan pemekatan ekstrak di water bath hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes, 1979).

# Fraksinasi

Metode fraksinasi yang digunakan adalah ekstraksi cair-cair terhadap ekstrak etanol batang karamunting. Ekstrak etanol batang karamunting sebanyak 40 gram, dilarutkan dengan 80 mL etanol 96% hingga larut. Setelah itu, ditambahkan 80 mL aquades dan campuran ini dimasukkan ke dalam corong pisah. Dilanjutkan dengan menambahkan 200 mL n-heksana, kemudian campuran tersebuk digojrok sebelum didiamkan hingga terbentuk dua lapisan terpisah. Lapisan n-heksana, yang merupakan lapisan bagian atas, dipisahkan dengan bagian yang bawah. Proses fraksinasi dilakukan berulang hingga lapisan n-heksana memberikan hasil yang netral atau tidak berwarna. Lapisan n-heksana ini dikumpulkan untuk mendapatkan fraksi n-heksana. Kemudian, lapisan bawah (residu) diberi tambahan 200 mL etil asetat, digojrok dan dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan terpisah. Lapisan etil asetat, berada di lapisan atas, yang mengandung senyawa yang diinginkan, diambil. Seperti sebelumnya, 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 masing-masing diuapkan dengan rotary evaporator dan dilanjutkan pemekatan di water bath untuk mendapatkan ekstrak kental (Misfadhila *et al.*, 2023).

**3.10 Skrining Fitokimia**

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

# Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak etanol, serbuk simplisia, fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) ditimbang masing- masing sebanyak 0,5 g, untuk fraksi n-heksan dan etil asetat ditambah tween 80. Kemudian masing-masing ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, lalu 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 posistif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

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

# Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 10 g masing-masing ekstrak etanol dan serbuk simplisia batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) kemudian masing-masing ditambahkan 100 mL air panas, didihkan selama 5 menit dan di saring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 mL lalu ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium (Mg) dan 1 mL asam klorida pekat dan 2 mL amil alkohol lalu dikocok kemudian dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terbentuk salah satu warna yaitu warna merah, kuning, jingga pada lapisan alkohol (Ditjen POM, 1995).

 Sebanyak 0,5 gram masing-masing fraksi n-heksan dan etil asetat dilarutkan dengan tween 80 lalu ditambahkan 5 mL aquadest lalu panaskan 5 menit, saring. Filtrat ditambah 0,1 gram serbuk magnesium (Mg) dan 1 mL HCl pekat kemudian digojrok. Uji positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya salah satu warna yaitu warna merah, kuning atau jingga (Dewi *et al.,* 2021).

# Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 0,5 g masing-masing ekstrak etanol, serbuk simplisia, fraksi etil asetat dan n-heksana batang karamunting, untuk fraksi n-heksan dan etil asetat di larutkan terlebih dahulu dengan tween 80, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, gojrok 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 (Ditjen POM, 1995).

* + 1. **Pemeriksaan Tanin**

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol, serbuk simplisia, fraksi etil asetat dan n-heksana batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.). Untuk fraksi n-heksan dan etil asetat dilarutkan terlebih dahulu dengan tween 80. Masing-masing di masukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL aquadest, digojrok dan disaring filtrat diencerkan dengan aquadest sampai tidak berwarna. Larutan di ambil 2 mL ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Ditjen POM, 1995).

# Pemeriksaan Triterpenoid atau Steroid

Sebanyak 1 g masing-masing ekstrak etanol, serbuk simplisia, fraksi etil asetat dan n-heksana batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.). Untuk fraksi n-heksan dan etil asetat terlebih dahulu dilarutkan dengan tween 80. Masing-masing dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat di uapkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Liebermann-burchard). Terbentuknya warna ungu sampai merah ungu menunjukkan adanya triterpenoid dan terbentuknya warna biru hijau menunjukkan adanya steroid (Ditjen POM, 1995).

# Pemeriksaan Glikosida

Simplisia, ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan n-heksana batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) masing-masing ditimbang sebanyak 3 g, untuk fraksi n-heksan dan etil asetat dilarutkan terlebih dahulu dengan tween 80. Masing-masing lalu dilarutkan dengan 30 mL campuran etanol 96% dan aquadest (7:3) dan 10 mL asam klorida 2 N, direfluks selama 10 menit, didinginkan dan disaring. Ambil 20 mL filtrat ditambahkan 25 mL akuades dan 25 timbal (II) asetat 0,4 M lalu dikocok, diamkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat diambil sebanyak 0,1 mL masukkan dalam tabung reaksi diuapkan diatas penangas air, ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes pereaksi molish. Ditambahkan asam sulfat pekat 2 mL perlahan-lahan melalui dinding tabung, terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida (Ditjen POM, 1995).

#  Pengujian Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

* + 1. **Pembuatan Air Laut Buatan**

Air laut buatan dibuat dengan cara melarutkan 38 gram garam tanpa iodium, dimasukkan ke dalam labu 1000 mL, lalu volume dicukupkan dengan air hingga tanda batas lalu diaduk sampai homogen. Kemudian disaring dengan kertas Whatman (Djamil & Tria, 2009).

# Penetasan Telur Artemia salina Leach

Penetasan telur dilakukan dalam suatu wadah dengan media air laut buatan. 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 untuk bergerak secara alamiah ke arah terang. Wadah diisi 1 liter air laut buatan. Kemudian pada bagian gelap dimasukkan satu sendok teh telur artemia. Pada bagian terang diberi penerangan dengan cahaya lampu agar suhu tetap terjaga. Telur dibiarkan selama 48 jam sampai menetas. Telur akan menetas dalam waktu 24-36 jam dan akan bergerak secara alamiah menuju daerah terang sehingga larva udang terpisah dari bagian telur atau kulit telur (Fadli *et al.*, 2019).

# Pembuatan Larutan Ekstrak dan fraksi

Ekstrak dan fraksi batang karamunting masing-masing 0,2 g ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan n-heksana lalu dicukupkan dengan air laut buatan hingga 100 mL. Larutan ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan n-heksana batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) dibuat menjadi beberapa 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, 900 µg/mL, 1000 µg/mL, dan 1 tabung digunakan untuk kontrol negatif, 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 konsentrasi 200 μg/mL, dipipet 1 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya hingga 10 mL. untuk konsentrasi 300 μg/mL, dipipet 1,5 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL. Untuk konsentrasi 400 μg/mL, dipipet 2 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya 10 mL. Untuk konsentrasi 500 μg/mL, dipipet 2,5 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya hingga 10 mL. Untuk konsentrasi 600 μg/mL, dipipet 3 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya hingga 10 mL. Untuk 700 μg/mL, dipipet 3,5 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya hingga 10 mL. Untuk konsentrasi 800 μg/mL, dipipet 4 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya hingga 10 mL. Untuk konsentrasi 900 μg/mL, dipipet 4,5 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya hingga 10 mL. Untuk konsentrasi 1000 μg/mL, dipipet 5 mL larutan induk baku lalu dicukupkan volumenya hingga 10 mL.

* + 1. **Uji Toksisitas Ekstrak dan Fraksi N-Heksan, Etil Asetat Batang Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Vial disiapkan untuk masing-masing tingkat konsentrasi, tiap konsentrasi disediakan 3 vial untuk replikasi sebanyak 3 kali. Vial diisi dengan sampel yang telah dilarutkan dengan air laut buatan sebanyak 10 mL. Sebanyak 10 ekor larva *Artemia salina* Leach dimasukkan ke dalam masing-masing vial yang telah berisi senyawa uji. Kontrol negatif diberi perlakuan yang sama seperti larutan uji tetapi tidak ditambahkan dengan ekstrak atau fraksi batang karamunting. Jumlah larva udang yang mati dalam tiap vial dihitung selama 24 jam. Tingkat toksisitas ditentukan dengan menghitung jumlah larva yang mati. Kriteria standar untuk menilai kematian larva udang adalah bila larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik (Supriningrum *et al.*, 2019).

* 1. **Uji Aktivitas Antibakteri**

**3.12.1 Sterilisasi Alat dan Bahan**

Sterilisasi pada alat laboratorium yang tidak akan meleleh, terbakar ataupun berubah bentuk jika terkena suhu tinggi.

1. Peralatan yang terbuat dari kaca (*Glassware*) seperti cawan petri (petridish), pipet tetes, tabung reaksi dan erlemeyer.
2. Pelaratan yang terbuat dari logam seperti spatel logam, gunting, pinset, mata pisau (blades), spatula.

Sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 115oC atau suhu dengan tekanan sebesar 121oC. Pengaturan waktu yang biasa digunakan adalah 10-15 menit (Wulandari *et al*., 2021).

* + 1. **Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)**

Nutrient agar (NA) ditimbang sebanyak 1 gram dilarutkan dengan 17 mL aquadest lalu dipanaskan dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121oC (Haryati *et al.*, 2023).

# Pembuatan Media Agar Miring

*Nutrient agar* (NA) sebanyak 5 ml dituang dalam masing-masing tabung reaksi yang sudah steril dan ditutup dengan kapas ditunggu sampai memadat dengan kemiringan 45o (Haryati *et al*., 2023).

**3.12.4 Inokulasi Bakteri (Peremajaan)**

Inokulasi bakteri adalah menumbuhkan bakteri dalam media *nutrient agar* miring di tabung reaksi yang telah dibuat. Cara yang dilakukan dalam inokulasi bakteri adalah dengan mengambil masing-masing 1 ose bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan masing-masing digoreskan dimedia agar miring, lalu di inkubasi selama 24 jam (Marliza *et al.*, 2023).

# 3.12.5 Pembuatan Larutan Standar Mc. Farland

Suspensi standar yang menunjukkan konsentrasi kekeruhan suspensi bakteri sama dengan 108 CFU/ml.

Komposisi :

Larutan Asam Sulfat 99,5 ml

Larutan Barium Klorida 0,5 ml

Cara pembuatan :

Kedua larutan dicampurkan ke dalam erlenmeyer, dikocok sampai homogen dan ditutup. Apabila kekeruhan hasil suspensi bakteri sama dengan kekeruhan suspensi standar berarti konsentrasi 108 CFU/ml (Munthe & Ridwanto, 2022).

# 3.12.6 Suspensi Bakteri

Bakteri yang telah tumbuh selama 24 jam pada media NA diambil dengan menggunakan kawat ose steril, lalu disuspensikan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl 0,9% sedikit demi sedikit, sambil didapatkan kekeruhan yang sama dengan larutan standart Mc. Farland hingga homogen, sampai didapatkan konsentrasi suspensi bakteri Mc. Farland 0,5 (Ditjen POM, 1995).

**3.12.7 Pembuatan Media MHA (*Muller Hinton* Agar) Uji Antibakteri**

Pembuatan media MHA (Mueller Hinton Agar) dilakukan dengan cara menimbang media sebanyak 3,8 gram kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer 250 ml yang telah disterilkan dilarutkan dengan aquades 100 mL, kemudian dipanaskan sampai mendidih, setelah mendidih tutup permukaan erlenmeyer dengan kain kasa yang berisi kapas. Kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi, media dikeluarkan dari autoklaf setelah itu media didiamkan hingga suhunya 50°C (hangat), setelah itu media dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri sebanyak 10 mL lalu didiamkan hingga membeku, setelah media didalam cawan petri membeku media dapat digunakan untuk pengujian (Sidoretno, 2022).

**3.12.8 Pembuatan Kontrol Positif, Kontrol Negatif dan Larutan Uji**

Pada kontrol positif digunakam antibiotik Kloramfenikol untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli.* Kloramfenikol sebagai antibiotik yang mempunyai spektrum luas yaitu dapat menghambat bakteri gram positif dan negatif. Mekanisme kerjanya dengan menghambat sintesis protein pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli.* Kapsul kloramfenikol 250 mg, satu kapsul dibuka dan ditimbang serbuk dalam kapsul sebanyak 0,03 g kemudian serbuk dilarutkan dengan aquades 5 mL aduk hingga homogen dan digunakan sebagai kontrol positif. Pada kontrol negatif digunakan campuran tween 80 dengan aquades (Rahayu *et al*., 2021).

Larutan uji dibuat 30%, 20%, 10% b/v dengan cara menimbang masing- masing 1,5 gr, 1 gr dan 0,5 gr estrak etanol dan fraksi etil asetat, n-heksana batang karamunting, untuk fraksi n-heksan dan etil asetat dilarutkan terlebih dahulu dengan tween 80 sebanyak 1 mL lalu masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml dan ditambahkan aquades sampai tanda batas (Rahayu *et al.*, 2021).

* + 1. **Pembuatan Kertas Cakram (*Piper Disk*)**

Kertas cakram diletakkan didalam cawan petri, disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121℃ selama 15 menit. Kemudian dijenuhkan dalam konsentrasi yang sudah dibuat.

* + 1. **Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Dan Fraksi Batang Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.**

Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode disc diffusion (metode cakram). Cotton buds steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi suspensi bakteri kemudian dioleskan pada media MHA. Setelah olesan bakteri mengering, paper disk (diameter 6 mm) yang telah direndam masing-masing ekstrak dan fraksi etil asetat, n-heksana selama 15 menit ditiriskan dan diletakkan masing-masing di atas media yang berisi olesan bakteri dengan sedikit ditekan agar paper disk menempel pada permukaan media. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24-48 jam. Aktivitas antibakteri dinyatakan positif apabila terbentuk zona hambat berupa zona bening disekeliling paper disk (Kaseng *et al*., 2016).

# 3.13 Analisis Data

# Data hasil penelitian uji toksisitas diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan kurva. Data dari uji tokisisitas akan dianalisis dengan analisis probit serta menggunakan Microsoft office Excel untuk mencari regresi linier dengan hubungan 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 (Fadli *et al*., 2019).

Data hasil penelitian uji antibakteri diambil dari hasil pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat pada tiap-tiap konsentrasi antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Analisis diolah dengan microsoft Excel dan disajikan dalam diagram batang untuk melihat potensi antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan berbagai kosentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Magani *et al.*, 2020)*.*