**BAB III
METODE PENELITIAN**

**3.1 Pemilihan Metode Penelitian**

Penelitian ini terdiri dari pengumpulan dan pengolahan sampel, karakterisasi sampel, pembuatan ekstrak, skrining fitokimia dengan pemeriksaan terhadap golongan senyawa kimia pada ekstrak etanol dedak padi, uji aktivitas antibakteri dan konsentrasi hambat minimun (KHM) ekstrak etanol dedak padi dengan metode difusi cakram terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* serta pengujian kebocoran membran sel bakteri yang meliputi pemeriksaan kebocoran DNA dan protein dengan spektrofotometer UV-Vis dan pemeriksaan logam kalium dan kalsium dengan spektrofotometer AAS.

**3.2 Lokasi dan jadwal penelitian**

**3.2.1 Lokasi penelitian**

 Penelitian Ini diilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu UMN Al – Washliyah Medan dan Laboratorium Kesehatan Daerah (Lab Kesda)

**3.2.2 Jadwal penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-April 2024

**3.3**  **Alat-alat yang digunakan**

Alat alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat alat gelas laboratorium, aluminium foil, *beaker glass* (Pyrex), bejana atau toples, cawam petri, *centrifuge* *conical* (Hettich zenrifugen -EBA 20), *centrifuge tube*, Erlenmeyer (Pyrex), *Hotplate* (Maspion S-302), inkubator, jarum ose, jarum suntik 1ml, kertas saring, lemari pengering, lumpang dan stamfer, mikropipet, penangas air, pH meter (Thermo scientific), pipet tetes, *rotary evaporator* (B-one), tabung reaksi, timbangan analitik, spektrofotometer AAS, spektrofotometer UV-VIS (Spectroquant®Pharo300), vial.

**3.3.1**  **Bahan-bahan yang digunakan**

Bahan bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Akuades, Akuades steril, Amil alkohol, Asam asetat anhidrida, Asam klorida (p), Asam nitrat, asam sulfat (p), Besi (III) klorida, Etanol 96%, Iodium, Kalium iodida, Kloroform, Media agar *Nutrient Agar* (Oxoid CM0003), Media agar *Mueller-Hinton Agar* (Oxoid CM0337), Raksa (II) klorida, Serbuk magnesium, Timbal (II) asetat.

## 3.4 Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan di laboratorium *Herbarium Medanense* (MEDA)Universitas Sumatra Utara.

**3.5**  **Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan adalah dedak padi (*Oryza sativa. L)* yang diambil dari kilang padi sunggal

**3.6**  **Pemeriksaan Karakterisasi Simplisia**

 Pemeriksaan karakterisasi simplisia meliputi pemeriksaan makroskopik, mikroskopik penetapan kadar air, penetapan kadar sari yang larut dalam air, penetapan kadar sari yang larut dalam etanol, peentapan kadar abu total dan penetapan kadar abu yang tidak larut dalam asam (Ditjen POM, 1995).

**3.6.1**  **Pemeriksaan makroskopik**

Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan mengamati morfologi luar tumbuhan. Dengan mengamati bentuk luar, ukuran, warna, bau dan rasa dedak padi.

* + 1. **Pemeriksaan mikroskopik**

 Serbuk simplisia dedak padi diambil secukupnya, ditambahkan air, kemudian disaring, filtrat yang didapat diendapkan. Endapan tersebut diambil sebagian setelah dikeringkan lalu diletakkan diatas objek gelas, ditutup dengan *deck glass* dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40 × 10 (Ditjen POM, 1995).

**3.6.3 Penetapan kadar air**

 Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotropi (destilasi toluen). Alat meliputi labu alas 500 ml, alat penampung, pendingin, tabung penerima, tabung penyambung dan alat pemanas.

 Cara penetapan: ke dalam labu alas bulat dimasukkan 200 ml toluen dan 2 ml air suling, didestilasi selama 2 jam. Dibiarkan mendingin selama 30 menit, dibaca volume air pada tabung penerima. Selanjutnya ke dalam labu dimasukkan 5 gram serbuk simplisia, lalu dipanaskan hati – hati selama 15 menit, setelah toluene mulai mendidih, kecepatan tetes diatur menjadi 2 tetes tiap detik, hingga sebagian air tersuling, kemudian dinaikkan kecepatan tetes menjadi 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling bagian dalam pendingin dibilas dengan toluene. Dilanjutkan penyulingan selama 5 menit, kemudian dibiarkan mendingin pada suhu kamar setelah air dan toluene memisah. Volume dibaca dengan ketelitian 0,1 ml, selisih kedua volume air yang dibaca sesuai kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (Ditjen POM, 1995).

 **3.6.4 Penetapan kadar sari larut dalam air**

 Sebanyak 5 gram serbuk dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml air – kloroform (2,5 ml kloroform dan air suling sampai 1 liter) dalam labu bersumbat sambil berkali – kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam, kemudian disaring. 20 ml filtrate diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang berdasar rata yang telah dipanaskan pada suhu 105oC hingga bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Ditjen POM, 1995).

 **3.6.5** **Penetapan kadar sari larut dalam etanol**

 Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol (96%) dalam labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemuidian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudian diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan penguap berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105oC hingga bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 96% dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 1995).

 **3.6.6** **Penetapan kadar abu total**

 Sebanyak 5 gram serbuk yang telah digerus dan ditimbang seksama, dimasukkan kedalam krus porselen yang telah dipijar dan ditara, kemudian diratakan. Krus dipijar perlahan – lahan sampai arang habis, pijaran dilakukan pada suhu 600oC selama 3 jam, kemudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 1995).

**3.6.7 Penetapan kadar abu yang tidak larut asam**

 Abu yang telah diperoleh dalam penrtapan kadar abu total dididihkan dalam 25 ml asam klorida 2N selama 5 menit, bagian yang tidak larut asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring, dipijar hingga bobot tetap kemudian didinginkan dan ditimbamg. Kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 1995).

**3.7**  **Pembuatan Ekstrak**

Ekstraksi dedak padi (*Oryza sativa. L)* dilakukan dengan cara maserasi. Serbuk simplisia 10 bagian (500g) dimasukkan kedalam bejana kemudian dituangkan 75 bagian (3750ml) cairan penyari etanol lalu ditutup dan dibiarkan pada suhu kamar selama 5 hari dan terlindung dari cahaya matahari sambil sesekali diaduk kemisdian diserkai, diperas dan disaring (maserat I). Maserat dipisahkan dengan ampas. Ampas dibilas dengan 1250 ml etanol 96% kemudian disaring dan dipindahkan dalam bejana tertutup (maserat II), maserat digabungkan dan diamkan selama 2 hari lalu di enap tuangkan Ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan diperoleh ekstrak etanol, dan diuapkan kembali diatas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental dan dimasukkan kedalam wadah tertutup (Depkes RI, 1979).

* 1. **Skrining Fitokimia**

 Skrining fitokimia untuk mengetahui ada tidaknya komponen- komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak. Ekstrak dilarutkan dengan sedikit pelarutnya kemudian dilakukan uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid.

* + 1. **Uji Flavanoid**

 Sebanyak 1 g ekstrak ditambahkan 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, kedalam 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoida positif jika terjadi warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Uji Alkaloid**

 Ekstrak ditimbang 0,5 gram kemudian ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL aquadest, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat digunakan untuk pengujian berikut ini:

* Pereaksi Mayer

Tiga tetes ekstrak ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih atau kuning menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

* Pereaksi Bouchardat

Tiga tetes ekstrak ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat. Terbentuknya endapan coklat sampai hitam menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

* Pereaksi Dragendrof

Tiga tetes ekstrak ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendrof. Terbentuknya endapan jingga sampai merah coklat atau merah bata menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

Bila sedikitnya 2 dari 3 pereaksi di atas positif, ekstrak dinyatakan mengandung senyawa alkaloid (Harborne, 1987).

**3.8.3 Uji Saponin**

 Sampel uji ditimbang sebanyak 0,5 g dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas, dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil dan tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Uji Tannin**

 Ekstrak sebanyak ± 1 mg ekstrak dedak padi dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2-3 tetes pereaksi FeCl3 1%, Jika warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan terdapat tannin (Harborne, 1987).

* + 1. **Uji Triterpenoid dan Steroid**

 sampel ekstrak etanol dedak padi sebanyak 1 g dimasukan kedalam erlenmeyer ditambahkan n heksan sampai terendam direfluks minimal 2 jam, disaring. Filtrat 10 ml dimasukan kedalam cawan porselin diuapkan sampai kering, sisanya ditambahkan pereaksi Liebermann-Bauchard (asam asetat anhidrida 3 tetes dan asam sulfat pekat 3 tetes). Bila terbentuk warna ungu/ungu kemerahan menunjukan adanya triterpenoid sedangkan bila terbentuk warna biru/biru hijau menunjukan adanya steroid (Harborne, 1987).

* + 1. **Uji Glikosida**

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 2 mL ekstrak yang telah diekstraksi dengan pelarut air dan etanol, kemudian dipanaskan kurang lebih 5 menit. Kemudian tambahkan 5 ml asam asetat anhidrat dan 10 tetes H2SO4 pekat. Amati perubahan warna yang terjadi jika terbentuk warna biru/hijau menandakan adanya senyawa glikosida (Depkes RI, 1989).

**3.9 Sterilisasi Alat Dan Bahan**

Alat-alat dan bahan untuk pengujian mikrobiologi harus disterilkan terlebih dahulu seperti beaker glass, erlenmayer, tabung reaksi dan cawan petri, disterilkan dioven pada suhu 170°C selama 1-2 jam, alat atau bahan gelas dan tidak tahan terhadap pemanasaan tinggi dalam jangka waktu lama seperti gelas ukur, media, pipet tetes di sterilkan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan jarum ose dengan cara dibakar pada lampu spiritus sampai pijar (Depkes RI, 1995).

**3.10 Pembuatan Media**

1. Media Nutrient Agar (NA)

Sebanyak 20 g media nutrien Agar dilarutkan dalam air suling steril kemudian volumenya dicukupkan hingga 1 L dengan bantuan pemanasan sampai semua bahan terlarut. Disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121oC selama 15 menit (Depkes RI, 1995).

1. Media Mueller-Hinton Agar (MHA)

Dibuat dengan mengambil serbuk media sebanyak 28 gram, dilarutkan kedalam 1 liter aquades dan didihkan selama satu menit. Media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, selanjutnya dimasukkan dalam cawan petri sebanyak 20 ml dan dibiarkan hingga mengeras (Depkes RI, 1995).

1. Pembuatan Larutan NaCl 0,9%

Ditimbang sebanyak 0,9 g Natrium Klorida dilarutkan dalam air suling steril sedikit demi sedikit dalam labu takar 100 ml sampai larut sempurna. Ditambahkan air suling steril yang bertutup lalu disterilkan pada autoklaf pada suhu 121oC selama 15 menit (Depkes RI, 1995).

### **3.11 Pembuatan Agar Miring**

Sebanyak 3 ml media Nutrient Agar (NA) dimasukkan kedalam tabung reaksi steril, didiamkan pada temperatur kamar sampai media memadat pada posisi miring kira-kira kemiringan 45oC. Media yang telah padat disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 5oC (Depkes RI, 1995).

### **3.12 Peremajaan Bakteri**

Koloni bakteri diambil dari hasil identifikasi bakteri dengan menggunakan jarum ose steril, lalu ditanam pada media Nutrient Agar (NA) miring dengan cara menggoresnya dengan bentuk zig-zag. Media tersebut selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 36-37oC selama 18-24 jam (Depkes RI, 1995).

**3.13 Pembuatan Suspensi Bakteri**

Dari stok kultur bakteri yang telah diremajakan pada media NA diambil bakteri dengan menggunakan jarum ose steril kemudian disuspensikan dalam tabung yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9% steril, dihomogenkan hingga diperoleh kekeruhan suspense diperoleh dibandingkan dengan kekeruhan Mc. Farland (Depkes RI, 1995).

**3.14 Pengenceran Ekstrak Dedak Padi**

Ekstrak dedak padi yang diperoleh diencerkan menggunakan DMSO menjadi 6 tingkat konsentrasi yaitu konsentrasi 10, 12.5, 25, 50, 70 dan 80%. Konsentrasi tersebut didapatkan melalui pengenceran menggunakan rumus sebagai berikut :

V1 × C1 = V2 × C2

Keterangan:

V1 = Volume awal

C1 = Konsentrasi awal

V2 = Volume akhir (V1 + pelarut)

C2 = Konsentrasi akhir

1. Pengenceran konsentrasi 80%

V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 100% = 1 mL x 80%

V1 = $\frac{1 mL × 80\%}{100\%}$

V1 = 0,8 mL

Dalam 1 mL, terdapat 0,8 mL ekstrak dedak padi dan 0,2 mL DMSO.

1. Pengenceran konsentrasi 70%

V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 100% = 1 mL x 70%

V1 = $\frac{1 mL × 70\%}{100\%}$

V1 = 0,7 mL

Dalam 1 mL, terdapat 0,7 mL ekstrak dedak padi dan 0,3 mL DMSO.

1. Pengenceran konsentrasi 50%

 V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 100% = 1 mL x 50%

V1 = $\frac{1 mL × 50\%}{100\%}$

V1 = 0,5 mL

Dalam 1 mL, terdapat 0,5 mL ekstrak dedak padi dan 0,5 mL DMSO.

1. Pengenceran konsentrasi 25%

V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 100% = 1 mL x 25%

V1 = $\frac{1 mL × 25\%}{100\%}$

V1 = 0,25 mL

Dalam 1 mL, terdapat 0,25 mL ekstrak dedak padi dan 0,75 mL DMSO.

1. Pengenceran konsentrasi 12,5%

V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 100% = 1 mL x 12,5%

V1 = $\frac{1 mL × 12,5\%}{100\%}$

V1 = 0,125 mL

Dalam 1 mL, terdapat 0,125 mL ekstrak dedak padi dan 0,875 mL DMSO.

1. Pengenceran konsentrasi 10%

V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 100% = 1 mL x 10%

V1 = $\frac{1 mL × 10\%}{100\%}$

V1 = 0,125 mL

Dalam 1 mL, terdapat 0,1 mL ekstrak dedak padi dan 0,9 mL DMSO.

**3.12 Uji Aktivitas Antibakteri**

Pengujian dilakukan terhadap ekstrak etanol dedak padi dengan metode difusi agar yaitu dengan menggunakan metode difusi cakram (Kirby & Bauer). Media Mueller Hinton Agar (MHA) yang telah steril dimasukkan sebanyak 20 ml kedalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Kemudian dicelupkan *cotton swab* steril ke suspense bakteri dan diperas di dinding tabung lalu goreskan ke media MHA dengan merata. Diambil ekstrak dedak padi dengan berbagai konsentrasi 10, 12.5, 25, 50, 70 dan 80%, sebagai pembanding digunakan amoksisilin 0,05% b/v dengan pelarut DMSO untuk kontrol positif dengan mikro pipet dan diletakkan diatas kertas cakram steril. Kertas cakram ditetesi larutan ekstrak dan pembanding sebanyak 20 μL dengan menggunakan mikropipet. Kemudian diletakkan kertas cakram kedalam cawan petri biarkan beberapa saat agar proses difusi berlangsung. Kemudian cawan diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah terinkubasi, diukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan jangka sorong. Dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dianggap sebagai konsentrasi terendah yang dapat menghasilkan zona penghambatan (Salni dan Mukti, 2011).

**3.13 Uji Kebocoran Membran**

Uji kebocoran sel membran dilakukan dengan melakukan uji kebocoran DNA dan protein dengan spektrofotometer UV-Vis dan uji kebocoran ion logam dengan Spektrofotometri Serapan Atom.

**3.13.1 Uji Kebocoran DNA**

Sepuluh mililiter suspensi bakteri yang telah ditumbuhkan selama 18 jam pada suhu 37°C disentrifugasi selama 20 menit kecepatan 3500 rpm. Filtrat dibuang, kemudian endapan bakteri dicuci dapar fosfat (pH 7,4). Setelah itu, endapan disuspensikan kembali dalam dapar fosfat dan ditambahkan dengan ekstrak sebanyak 1x dan 2x KHM, kemudian ditambahkan lagi dapar fosfat hingga volume akhir 10 ml. Suspensi diinkubasi pada inkubator selama 24 jam. Suspensi disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm, kemudian supernatan dipisahkan dan diambil untuk menentukan kandungan DNA menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm (Jamal, et al., 2013).

**3.13.2 Uji Kebocoran protein**

Sepuluh mililiter suspensi bakteri yang telah ditumbuhkan selama 18 jam pada suhu 37°C disentrifugasi selama 20 menit kecepatan 3500 rpm. Filtrat dibuang, kemudian endapan bakteri dicuci dapar fosfat (pH 7,4). Setelah itu, endapan disuspensikan kembali dalam dapar fosfat dan ditambahkan dengan ekstrak sebanyak 1x dan 2x KHM, kemudian ditambahkan lagi dapar fosfat hingga volume akhir 10 ml. Suspensi diinkubasi pada inkubator selama 24 jam. Suspensi disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm, kemudian supernatan dipisahkan dan diambil untuk menentukan kandungan protein menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm (Jamal, et al., 2013).

**3.13.3 Uji Kebocoran logam kalsium (Ca2+)**

Sepuluh mililiter suspensi bakteri yang telah ditumbuhkan selama 18 jam pada suhu 37°C disentrifugasi selama 20 menit kecepatan 3500 rpm. Filtrat dibuang, kemudian endapan bakteri dicuci dapar fosfat (pH 7,4). Setelah itu, endapan disuspensikan kembali dalam dapar fosfat dan ditambahkan dengan ekstrak sebanyak 1x dan 2x KHM, kemudian ditambahkan lagi dapar fosfat hingga volume akhir 10 ml. Suspensi diinkubasi pada inkubator selama 24 jam. Suspensi disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm, kemudian supernatan dipisahkan dan diambil untuk menentukan kandungan logam kalsium (Ca2+) menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang 422.7 nm (Jamal, et al., 2013).

**3.13.4 Uji Kebocoran logam kalsium (K+)**

Sepuluh mililiter suspensi bakteri yang telah ditumbuhkan selama 18 jam pada suhu 37°C disentrifugasi selama 20 menit kecepatan 3500 rpm. Filtrat dibuang, kemudian endapan bakteri dicuci dapar fosfat (pH 7,4). Setelah itu, endapan disuspensikan kembali dalam dapar fosfat dan ditambahkan dengan ekstrak sebanyak 1x dan 2x KHM, kemudian ditambahkan lagi dapar fosfat hingga volume akhir 10 ml. Suspensi diinkubasi pada inkubator selama 24 jam. Suspensi disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm, kemudian supernatan dipisahkan dan diambil untuk menentukan kandungan logam kalium (K+) menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang 766.5 nm (Jamal, et al., 2013).

**3.14 Analisis Data**

Data yang didapatkan dari hasil penelitian dilakukan analisis secara statistik menggunakan *Statistical Product Service Solution* (SPSS) dengan taraf kepercayaan 95% atau α=0,05. Analisis data dilakukan dengan Uji *Saphiro-wilk* untuk mengetahui normalitas data, apabila data yang diperoleh (p>0.05) maka data tersebut terdistribusi normal. Lalu dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* dan uji *post hoc* *Tukey (HSD)*, Perbedaan tersebut dikatakan signifikan bila secara statistik nilai (p<0.05), Sedangkan apabila data yang diperoleh tidak terdistribusi normal (p<0.05) maka dilakukan Uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Post Hoc*.