

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Dalam penelitian ini memiliki beberapa tahapan, yaitu : ekstraksi daun dewa (*Gynura pseudochina* [L.] DC) dengan metode maserasi, identifikasi kualitatif kandungan flavonoid, alkaloid, tannin, fenol, dan saponin, kemudian diuji efek antibakteri ekstrak daun dewa (*Gynura pseudochina* [L.] DC) terhadap bakteri penyebab jerawat yaitu *Staphylococcus aureus*.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (FKIK UMY), Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY, Laboratorium Teknologi Farmasi FKIK UMY, dan Laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan. Penelitian ini dilakukan kurang lebih 7 bulan dimulai dari Februari 2019 – September 2019.

C. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang didapatkan melalui hasil penanaman pada media agar.

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : Ekstrak etanol daun dewa (*Gynura pseudochina* [L.] DC) dengan Konsentrasi dari 2,5%, 5%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%.
- b. Variabel tergantung : Diameter Zona Hambat
- c. Variabel terkontrol : Bakteri *Staphylococcus aureus*, suhu inkubasi 37° C, lama inkubasi selama 24 jam dan media pertumbuhan bakteri

2. Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol daun dewa (*Gynura pseudochina* [L.] DC) merupakan hasil dari proses ekstraksi dengan metode maserasi dan menggunakan pelarut etanol
- b. Diameter zona hambat adalah untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri pemberian ekstrak daun dewa (*Gynura pseudochina* [L.] DC) pada bakteri *Staphylococcus aureus*.
- c. *Staphylococcus aureus* adalah salah satu bakteri penyebab jerawat yang termasuk dalam kelompok bakteri Gram-positif dan berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2 µm

E. Instrumen Penelitian

1. Alat penelitian

- a. Alat untuk penyiapan ekstrak

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak yaitu sarung tangan (Handseol®), masker (Sesi®), timbangan analitik (Toledo®), ayakan mesh 100, toples, Erlenmeyer (Iwaki®), kertas saring (Whatman®), alumunium foil (Diamond®), gelas ukur (Iwaki®), *rotary evaporator* (Ika®), cawan porselin (Iwaki®), dan waterbath.

b. Alat untuk penyiapan bakteri

Alat yang digunakan untuk penyiapan bakteri yaitu, sarung tangan (Handseol®), masker (Sesi®), mikropipet (Socorex®), vortex, tabung reaksi (Iwaki®), dan inkubator (Memmert®).

c. Alat untuk uji aktivitas bakteri

Alat yang digunakan untuk uji aktivitas bakteri yaitu, sarung tangan (Handseol®), masker (Sesi®), cawan petri (Iwaki®), cakram kertas, mikropipet (Socorex®), pinset, bunsen, inkubator (Memmert®), cotton bud, jangka sorong, dan spidol (Snowman®).

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini yaitu, Daun Dewa (*Gynura pseudochina* [L.] DC) yang diperoleh di Merapi Farma Herbal di daerah Kaliurang Daerah Istimewa Yogyakarta, etanol 70%, koloni *Staphylococcus aureus*, NaCl fisiologis, media BHI, media MHA, DMSO, antibiotik klindamisin, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorf, larutan HCl, serbuk Mg, dan FeCl₃.

F. Cara Kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi daun dewa (*Gynura pseudochina* [L.] DC) dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan.

2. Penyiapan bahan

Daun dewa (*Gynura pseudochina* [L.] DC) yang telah dikumpulkan dibersihkan dari pengotor, kemudian dicuci hingga bersih dengan air yang mengalir, lalu ditiriskan. Selanjutnya dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam pada bagian permukaan hingga menjadi simplisia kering. Kemudian simplisia yang sudah kering dihaluskan dan diayak menggunakan mesh ukuran 100 untuk mendapatkan serbuk halus daun dewa.

3. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan dengan metode maserasi. Pertama daun dewa yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 500 gram direndam menggunakan etanol 70% sebanyak 2500 ml selama 3 kali 24 jam. Kemudian dilakukan pengadukan pada 6 jam pertama secara konstan dengan pergantian pelarut setiap 24 jam satu kali sampai filtrat yang didapat berwarna jernih. Hasil ekstraksi lalu diuapkan menggunakan *rotary evaporator* kemudian dipekatkan dengan menggunakan *waterbath* untuk mendapatkan ekstrak pekat dari tanaman daun dewa.

4. Uji fitokimia daun dewa

a). Pemeriksaan Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara ekstrak daun dewa yang telah dilarutkan ditambahkan HCl 2N kemudian beberapa tetes pereaksi *Mayer* dan *Dragendorff*. *Mayer* memberikan warna endapan putih dan *Dragendorff* memberikan endapan merah jingga.

b). Pemeriksaan Flavonoid

Pengujian flavonoid dilakukan dengan cara ekstrak daun dewa yang telah dilarutkan dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan serbuk Mg. Terbentuknya warna merah atau merah tua menunjukkan reaksi positif flavonoid.

c). Pemeriksaan Saponin

Ekstrak daun dewa diuji kandungan saponin dengan cara ekstrak daun dewa yang telah dilarutkan dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian dikocok kuat selama 10 detik. Hasil positif jika terbentuk buih yang tidak hilang selama tidak kurang dari 10 menit, pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang.

d). Pemeriksaan Tanin

Pemeriksaan kandungan tannin dilakukan dengan cara ekstrak daun dewa yang sudah dilarutkan dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah beberapa tetes FeCl_3 , reaksi positif mengandung ditandai dengan timbulnya warna hitam kehijauan

5. Pembuatan stok variabel konsentrasi

Variabel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 3 variabel yaitu, variasi konsentrasi ekstrak daun dewa 2,5%, 5%, 10%, 20%, 40%,

60%, dan 80% menggunakan pelarut DMSO, kontrol negatif berupa DMSO, serta kontrol positif berupa antibiotik klindamisin.

6. Sterilisasi alat dan bahan

Alat dan bahan yang akan dilakukan untuk uji harus disterilisasi. Alat dan bahan yang telah dibungkus menggunakan kertas payung kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1atm selama 15 menit.

7. Pembuatan Media MHA (*Mueler-Hinton Agar*)

Media yang digunakan untuk pembiakkan bakteri uji adalah medium MHA. Sebanyak 38 gram MHA. Dilarutkan dengan 1 liter aquades kemudian dipanaskan sampai seluruhnya terlarut. Setelah itu media disterilisasi dengan cara diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Setelah proses sterilisasi media dimasukkan dalam beberapa cawan petri, penuangan media ke dalam cawan petri harus didalam ruang LAF agar tetap steril.

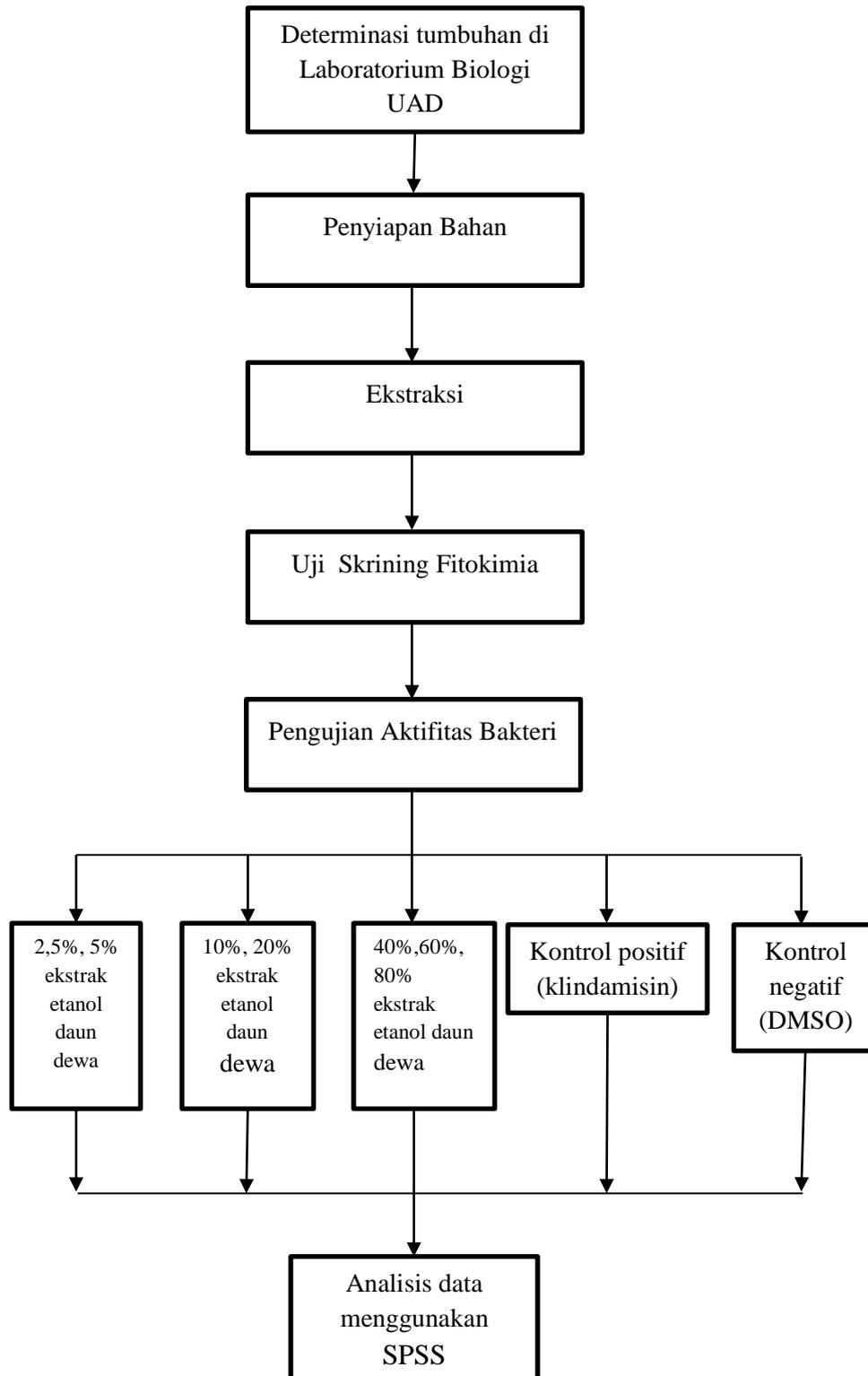
8. Pembuatan Suspensi Bakteri

Beberapa koloni bakteri diambil dan dimasukkan ke dalam larutan NaCl fisiologis lalu digojog dengan menggunakan vortex sampai tercampur merata. Kemudian diukur kekeruhanya dengan menggunakan larutan Mac Farland. Selanjutnya di inkubasi selama 2 hingga 4 jam pada suhu 37°C . Kemudian larutan suspensi bakteri tersebut diambil sebanyak 1ml ditambahkan didalam NaCl fisiologis.

9. Pengujian Aktifitas Bakteri

Pengujian aktifitas bakteri pada penelitian ini menggunakan metode difusi atau Diameter zona hambat yang bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri. Ekstrak etanol daun dewa yang telah dibuat dalam beberapa konsentrasi (2,5%, 5%, 10%, 20%, 40%, 60%, dan 80%). Suspensi bakteri diambil menggunakan cotton bud steril lalu dioleskan secara merata pada cawan petri berisi media MHA yang sudah memadat. Selanjutnya kertas cakram yang telah ditetesi oleh variasi konsentrasi daun dewa dan kontrol negatif (DMSO) diletakkan diatas media MHA, sedangkan untuk kontrol positif (klindamisin) diletakkan pada cawan petri yang berbeda. Kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama \pm 24 jam. Diamati pertumbuhan bakteri dan diukur diameter daya hambat ditandai dengan adanya zona bening.

G. Skema Langkah Kerja



H. Analisis Data

Data hasil penelitian diperoleh dengan cara mengamati diameter zona hambat yang ditandai terdapat zona bening pada daerah uji. Hasil tersebut kemudian dilakukan analisis statistik pada program SPSS untuk melihat perbedaan daya hambat dari tiap konsentrasi ekstrak. Untuk menganalisis data tersebut terdapat beberapa tahapan, seperti melihat data terdistribusi normal atau tidak dan melihat data homogen atau tidak dengan menggunakan uji normalitas dan uji homogenitas. Hal tersebut dapat dilakukan dengan uji inferensi untuk pengambilan keputusan sehingga dapat ditarik sebuah kesimpulan dan uji analisis deskriptif untuk menggambarkan hasil data yang telah didapatkan.