

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan menggunakan metode studi literatur sebagai landasan teoritis dalam penyelesaian suatu masalah secara ilmiah. Studi literatur dilakukan dengan cara mengkaji dan meneliti hasil penelitian pada sumber pustaka yang dapat menunjang hasil pengerjaan penelitian dan relevan. Sumber materi untuk studi literatur yang digunakan diperoleh dari jurnal-jurnal penelitian internasional (53,68%), jurnal nasional (5,26%), buku-buku (31,57%), serta disertasi dan skripsi (3,15%) yang dapat menunjang materi penelitian dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan. Pada penelitian ini berisi kajian literatur dari beberapa jurnal yang berkaitan dengan aktivitas antimikroba ekstrak etanol daun *Rosmarinus officinalis* L. terhadap mikroorganisme pembusukan makanan. Penelitian ini menggunakan data sekunder sebagai sumber data. Data sekunder adalah data yang telah tersedia dalam berbagai bentuk dan sudah diolah sedemikian rupa sehingga siap digunakan. Sumber literatur utama yang digunakan peneliti, yaitu:

- a. *Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms* (Gonelimali, dkk., 2018).
- b. *Evaluation of Antibacterial Activity of Alcoholic Extract of Rosemary Leaves against Pathogenic Strains* (Golshani, dkk., 2014).
- c. *Antifungal effects of the aqueous and ethanolic leaf extracts of Echinophora platyloba and Rosmarinus officinalis* (Sepehri, dkk., 2016).
- d. *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Extracts from Thyme and Rosemary Against Staphylococcus aureus and Candida albicans* (Sabzikar, dkk., 2020).
- e. *Protective effects of ethanolic extract of rosemary against lead-induced hepatorenal damage in rabbits* (Mohamed, dkk., 2016)

3.2 Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah tanaman *Rosmarinus officinalis* L. bagian tumbuhan yang digunakan adalah daun *Rosmarinus officinalis* L.

3.3 Waktu Penelitian

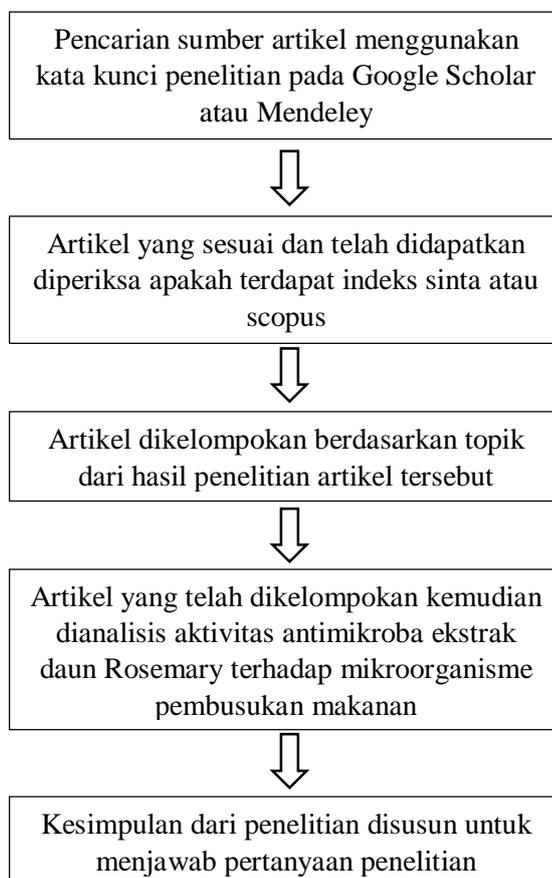
Waktu penelitian dilakukan pada bulan April hingga Agustus 2021.

3.4 Prosedur Penelitian Pustaka

Pengumpulan data menggunakan hasil studi literatur dari jurnal-jurnal penelitian nasional maupun internasional yang berkaitan dengan aktivitas antimikroba ekstrak etanol daun *Rosmarinus officinalis* L. terhadap mikroorganisme pembusukan makanan. Tahapan penelitian dilaksanakan seperti pada Gambar 3.1, tahap pertama atau tahap awal dilakukan pencarian literatur atau sumber data menggunakan *search engine* *Google Scholar*, *PubMed*, dan *Researchgate*, dengan kata kunci “*Rosmarinus officinalis*”, “*Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of Rosemary Leaves*”, “*Antimicrobial*”, “*Antibacterial*”, “*Antifungal*”. Sumber data ditentukan berdasarkan dengan judul, abstrak, prosedur, hasil dan simpulan dari sumber yang sesuai dengan penelitian yang dilakukan. Kemudian sumber artikel tersebut diperiksa apakah sudah terindeks *sinta* atau *scopus*. Setelah itu dilakukan pengelompokan data berdasarkan jenis uji antimikroba dan jenis mikroba.

Tahap berikutnya dilakukan analisis dari data yang telah terkumpul untuk mengetahui bagaimana aktivitas antimikroba dari ekstrak daun Rosemary terhadap mikroorganisme-mikroorganisme pembusukan makanan. Analisis data sekunder dilakukan dengan mengkaji hasil penelitian yang terdapat pada sumber artikel yaitu hasil uji *Agar Well Diffusion Assay* (AWDA), *Disk Diffusion Assay* (DDA), hasil *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal/Fungicidal Concentration* (MBC/MFC) dari ekstrak daun Rosemary terhadap mikroorganisme uji. Hasil dari analisis data sekunder ini dapat digunakan untuk memprediksi adanya aktivitas antimikroba dari ekstrak daun Rosemary yang diuji.

Pada tahap akhir, dilakukan penyusunan kesimpulan berdasarkan hasil temuan. Kesimpulan tersebut dapat menjawab pertanyaan penelitian mengenai aktivitas antimikroba ekstrak daun Rosemary.



Gambar 3.1. Tahapan Kerja

3. 4. 1. Pelaksanaan Penelitian Berdasarkan Literatur

Tahap pelaksanaan penelitian diawali dengan melakukan proses ekstraksi dari tanaman Rosemary kemudian dilakukan identifikasi senyawa bioaktif pada ekstrak tanaman rosemary tersebut. Kemudian uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol daun Rosemary dilakukan dengan metode difusi yaitu *Agar Well Diffusion Assay* (AWDA) dan *Disk Diffusion Assay* (DDA), dan metode dilusi yaitu *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal/Fungicidal Concentration* (MBC/MFC). Berikut ini adalah tahap-tahap penelitian uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol daun Rosemary berdasarkan studi literatur.

3.4.1.1 Ekstraksi Daun Rosemary Menggunakan Pelarut Etanol (Golshani, dkk., 2014)

Untuk memulai proses ekstraksi, daun segar Rosemary dikumpulkan hingga mencapai berat yang dibutuhkan, kemudian daun dikeringkan di tempat yang aman dari paparan sinar matahari langsung. Kemudian daun kering dihaluskan hingga menjadi bubuk. Sebanyak 50 gram daun ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer yang telah disterilkan. Tahap selanjutnya 250 ml etanol (98%) ditambahkan pada labu Erlenmeyer agar senyawa tumbuhan larut. Labu Erlenmeyer yang berisi etanol 98% dan bubuk tumbuhan ditempatkan ke dalam shaker selama 48 jam pada suhu 40°C. Selanjutnya, *rotary evaporator* digunakan untuk menghilangkan pelarut etanol. Terakhir, ekstrak Rosemary disimpan dalam piring steril dan disimpan pada lemari es. Untuk mencegah efek cahaya, piring tersebut dibungkus dengan *aluminium foil*.

3.4.1.2 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Tanaman Rosemary Menggunakan Metode *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) (Mohamed, dkk., 2016)

Analisis GC-MS digunakan terhadap sampel ekstrak etanol daun rosemary menggunakan mesin *1310 TRACE GC Ultra Gas Chromatographs* yang ditambah dengan detektor spektrometer massa THERMO (*ISQ Single Quadrupole Mass Spectrometer*). Sistem GC-MS dilengkapi dengan kolom DB5 MS (ketebalan film 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Helium digunakan sebagai gas pembawa pada laju aliran 1,5 mL/menit pada rasio split 1:10 dan suhu digunakan adalah: 50°C selama 1 menit, kemudian meningkat secara bertahap dari 10°C/menit ke 150°C dan ditahan selama 2 menit, diikuti dengan peningkatan dari 5°C/menit ke 250°C dan ditahan selama 1 menit. Injektor dan detector masing-masing ditahan pada suhu 250°C dan 300°C. Sampel encer (1:10 heksana, v/v) dari 0,2 mL campuran disuntikkan. Spektrum massa diperoleh dengan ionisasi elektron (EI) pada 70 eV, menggunakan rentang spektral m/z 40-450. Kemudian, sebagian besar senyawa yang diisolasi diidentifikasi menggunakan *mass spectra library of authentic chemicals of Wiley*

spectral library collection and National Institute of Standards and Technology [NIST] library. Senyawa yang terisolasi dari ekstrak diidentifikasi dengan mencocokkan spektrum massanya dengan data yang diterbitkan NIST.

3.4.1.3 Pembuatan Kurva Tumbuhan Mikroba (Gonelimali, dkk., 2016)

Bakteri Gram positif dan Gram negatif yang sebelumnya telah dikultur kemudian akan di uji aktivitas antibakterinya dengan disubkultur dalam *Mueller Hinton Broth* (MHB) kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam *rotary shaker* pada suhu 37°C. Setelah itu, masing-masing strain disesuaikan pada konsentrasi 10^8 sel/ml menggunakan standar 0,5 McFarland. Sedangkan, untuk inokulum khamir setelah dibuat kultur selama 48 jam, isolat jamur disubkultur pada *Potato Dextrose Broth* (PDB) kemudian diinkubasi pada *rotary shaker* dengan temperature suhu 37°C. Setelah itu, Spektrofotometer (A595 nm) digunakan untuk mengatur kepadatan khamir pada konsentrasi akhir 10^6 sel/ml.

3.4.1.4 Uji Aktivitas Antimikroba secara Difusi

- a. Uji Aktivitas Antimikroba secara Difusi menggunakan metode *Agar Well Diffussion Assay* (AWDA) (Gonelimali, dkk., 2016)

Agar Well Diffussion Assay (AWDA) digunakan pada penelitian Gonelimali dkk. terhadap mikroba yang di uji diantaranya yaitu bakteri Gram positif *Bacillus cereus* dan khamir *Candida albicans*. Tahap uji AWDA dimulai dengan memasukan sebanyak masing-masing 1 ml kultur bakteri atau jamur dengan menggunakan pipet ke tengah cawan petri steril. *Muller Hinton Agar* (MHA) dingin cair untuk strain bakteri atau *Potato Dextrose Agar* (PDA) untuk jamur kemudian dituangkan ke dalam cawan petri yang berisi inokulum dan diaduk rata. Setelah agar memadat, sumur dibuat menggunakan *cork borer* steril (berdiameter 6 mm) ke dalam agar yang berisi inokulum. Kemudian, sebanyak 100 μ l ekstrak rosemary (20% b/v) ditambahkan ke masing-masing sumur. Konsentrasi ekstrak (20% b/v) telah dipilih berdasarkan pra-eksperimen pada penelitian dan literatur sebelumnya. Cawan petri kemudian ditempatkan di lemari es selama 30

menit untuk membiarkan ekstrak berdifusi dengan baik ke dalam agar-agar. Kemudian cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Aktivitas antimikroba dideteksi dengan mengukur zona hambat (termasuk diameter sumur) yang muncul setelah masa inkubasi. Pada penelitian ini, DMSO pada konsentrasi 10% digunakan sebagai kontrol negatif.

- b. Uji Aktivitas Antimikroba secara Difusi menggunakan metode *Disk Diffusion Assay* (DDA) (Bonila, dkk., 2017)

Disk Diffusion Assay (DDA) digunakan dalam penelitian Bonila dkk. terhadap bakteri yang di uji diantaranya yaitu bakteri Gram negatif *Escherichia coli*. Tahap uji DDA dimulai dengan menyiapkan cawan petri berisi Muller Hinton Agar. Bakteri diinokulasi dengan menggunakan jarum ose ke atas permukaan Mueller Hinton Agar dan swab steril digunakan untuk menyebarkan suspensi bakteri ke seluruh permukaan agar, tanpa meninggalkan area yang tidak tertutup. Cakram kertas saring yang telah ditetesi ekstrak Rosemary diletakkan di atas permukaan agar yang diinokulasi dan cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Zona hambat sebagai area bening kemudian diamati dan diukur diameternya, yang dianggap sebagai pengukuran aktivitas antimikroba. Pada penelitian ini, kloramfenikol (2,5%) digunakan sebagai antibiotik kontrol dan semua analisis dilakukan dalam tiga kali pengulangan.

- 3.4.1.5 Uji Aktivitas Antimikroba dengan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) (Golshani, dkk., 2014)

Pada penelitian Golshani dkk. uji digunakan untuk menentukan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) dari ekstrak daun Rosemary dengan konsentrasi yang berbeda. Tahap uji MIC dimulai dari kultur strain mikroba selama 24 jam dalam media *Mueller Hinton Broth* (MHB) untuk strain bakteri dan media *Potato Dextrose Broth* (PDB) untuk khamir pada suhu 37°C. Seri dilusi 6.25, 25.2, 50, 100, 200 dan 400 mg/ml disiapkan dari ekstrak dan

sebanyak 70 μ l dari ekstrak tersebut ditambahkan ke dalam 96-well plate yang berisi 70 μ l suspensi mikroba. Kemudian dilakukan pengujian serupa untuk kontrol positif (medium dengan mikroba dan tanpa ekstrak) dan kontrol negatif (medium tanpa bakteri). Setelah itu, *microplate* diinkubasi dengan suhu 37°C. Dilusi minimum tanpa kekeruhan yang terlihat dianggap sebagai MIC. Semua uji dilakukan dalam tiga kali pengulangan dan nilai MIC rata-rata disajikan.

Hasil dari uji MIC digunakan dalam uji MBC, dari semua campuran ekstrak dan inokulum pada *microplate* MIC dibiakkan pada cawan petri berisi Mueller Hinton Agar (MHA) untuk bakteri atau Potato Dextrose Agar untuk khamir dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Konsentrasi tanpa pertumbuhan bakteri dilaporkan sebagai nilai MBC. Semua uji dilakukan dalam tiga kali pengulangan dan hasilnya dirata-ratakan.