

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan bulan Agustus 2013.

2. Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Patologi, Entomologi dan Mikrobiologi Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas, corong saring, maserator, cawan porselen, cawan petri, perangkat destilasi, inkubator, autoklaf, laminar air flow, pipet mikro, pipet tip, pipet volume, *ball pipetor*, pembakar bunsen, hot plate, magnetik stirer, vorteks, kaki tiga, kawat kasa, penjepit tabung, spatula, oven, lemari pendingin, kawat ose, rak tabung reaksi, neraca analitik, kaca arloji, pisau, penggaris dan blender.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kecambah kayu kapur, etanol, n-heksana, etil asetat, kloroform, kalium iodida, merkuri (II) klorida, natrium klorida, asam asetat anhidrat, asam klorida pekat, besi (III) klorida, logam Mg, asam sulfat pekat, amoniak, aquades, *Nutrient Agar*,

aluminium foil, kertas saring, tetrasiklin, bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

C. Cara Kerja

1. Pengambilan dan Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan adalah kecambah kayu kapur yang didapatkan dari pasar Danau Bingkuang dan Air Tiris Kabupaten Kampar. Kecambah kayu kapur dibersihkan dan dikeringkan pada suhu kamar yang sirkulasi udaranya bagus, kemudian dihaluskan sampai menjadi serbuk.

2. Uji Fitokimia Sampel

a. Identifikasi Flavonoid

Sampel halus sebanyak 200 mg diekstrak dengan 5 ml etanol dan dipanaskan selama 5 menit di dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah beberapa tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 g bubuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua selama 3 menit.⁵⁶

b. Identifikasi Alkaloid

Sampel halus sebanyak 4 g ditambahkan kloroform secukupnya, selanjutnya ditambahkan 10 ml amoniak dan 10 ml kloroform. Kemudian larutan disaring ke dalam tabung reaksi dan filtrat ditambahkan 10 tetes H₂SO₄ 2N. Campuran dikocok dengan teratur, dibiarkan beberapa menit sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas dipindahkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 1 ml. Kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi Meyer.

⁵⁶Mira Marlinda, "Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.)", FMIPA UNSRAT, Manado, 2012, hal. 25.

Apabila terbentuk endapan putih menunjukkan bahwa sampel mengandung alkaloid.⁵⁷

c. Identifikasi Terpenoid dan Steroid

Sampel halus sebanyak 50-100 mg ditambahkan asam asetat glasial sampai semua sampel terendam, dibiarkan selama 15 menit kemudian 6 tetes larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah, jingga atau ungu, sedang steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru.⁵⁸

d. Identifikasi Saponin

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 0,5 g dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin.⁵⁹

e. Identifikasi Tanin

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 1 g, disari dengan 10 ml air suling lalu disaring. Filtrat diencerkan dengan air sampai tidak berwarna. Larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan dengan 1-2 tetes pereaksi

⁵⁷*Ibid*, hal. 25.

⁵⁸*Ibid*, hal. 25.

⁵⁹Juliati Br Tarigan, Cut Fatimah Zuhra dan Herlince Sitohang, "Skrining Fitokimia Tumbuhan yang Digunakan oleh Pedagang Jamu Gendong untuk Merawat Kulit Wajah di Kecamatan Medan Baru", Volume 3, No. 8, 2008, hal. 3.

besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.⁶⁰

3. Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 200 g serbuk kering kecambah kayu kapur dimaserasi dengan menggunakan pelarut n-heksana sampai serbuk terendam, setelah pelarut terlihat jernih, filtrat ditampung dan ampasnya dimaserasi lagi dengan menggunakan pelarut etil asetat, jika pelarut etil asetat telah jernih, maka filtratnya ditampung dan ampasnya dimaserasi lagi dengan pelarut etanol sampai pelarutnya terlihat jernih. Filtrat yang diperoleh dari masing-masing pelarut diuapkan dengan alat destilasi. Sehingga diperoleh ekstrak kental dari n-heksana, etil asetat dan etanol. Masing-masing hasil ekstrak kental tersebut dibuat dengan berbagai konsentrasi dan dilakukan uji aktivitas antibakterinya.

4. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian aktivitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan dalam oven pada suhu 170⁰C selama \pm 2 jam, jarum ose dan pinset dibakar dengan pembakaran di atas api langsung dan media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.⁶¹

5. Pembuatan Media

a. Media Agar Miring

Nutrient Agar (NA) sebanyak 0,46 gram dilarutkan dalam 20 ml aquades (23 g/1000 ml) menggunakan erlenmeyer. Setelah itu

⁶⁰*Ibid*, hal. 3.

⁶¹Deby A. Mpila, Fatimawali dan Weny I. Wiyono, *op.cit*, hal. 15.

dihomogenkan dengan *stirer* di atas penangas air sampai mendidih. Sebanyak 5 ml dituangkan masing-masing pada 2 tabung reaksi steril dan ditutup dengan *aluminium foil*. Media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama ± 30 menit sampai media memadat pada kemiringan 30°. Media agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri.⁶²

b. Media Pembenuhan

Nutrient Agar (NA) sebanyak 2,3 gram dilarutkan dalam 100 ml aquades (23 g/1000 ml) menggunakan erlenmeyer. Media dihomogenkan dengan *stirer* di atas penangas air sampai mendidih. Media yang sudah homogen ini disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didinginkan sampai suhu $\pm 45-50^{\circ}\text{C}$.⁶³

6. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri ditanam pada media pertumbuhan *nutrient agar* (NA) miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian bakteri yang akan diuji disuspensikan dengan cara menumbuhkan bakteri dalam media cair yaitu NaCl 0,9 %, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.⁶⁴

7. Uji Aktivitas Antibakteri

Sebanyak 0,1 ml inokulum *Staphylococcus aureus* dimasukkan ke dalam cawan petri steril, setelah itu dituang media *Nutrien Agar* sebanyak 20

⁶²*Ibid*, hal. 15.

⁶³*Ibid*, hal. 15.

⁶⁴Tina Rostinawati, *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosela (Hibiscus Sabdariffa L.) terhadap Escherichia coli, Salmonella typhi dan Staphylococcus aureus dengan Metode Difusi Agar*, Penelitian mandiri, Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Jatinangor, 2009, hal. 15.

ml dengan suhu 45-50⁰C. Selanjutnya cawan digoyang di atas permukaan meja, agar media dan suspensi bakteri tercampur rata. Pada media yang telah padat dilubangi dengan pencetak lubang (*punch hole*) kemudian diteteskan ekstrak kecambah kayu kapur, masing-masing sebanyak 0,1 ml dengan konsentrasi 40, 80, 160 dan 320 mg/ml. Dibiarkan selama 15 menit kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 36⁰C selama 18-24 jam, setelah itu diukur diameter daerah hambatan (zona bening) pertumbuhan disekitar pencadang dengan menggunakan jangka sorong. Untuk pengujian ekstrak kecambah kayu kapur terhadap *Escherichia coli* dilakukan dengan cara yang sama seperti pada bakteri *Staphylococcus aureus*.⁶⁵ Sebagai kontrol negatif digunakan pelarut dari masing-masing ekstrak kecambah kayu kapur yaitu n-heksana, etil asetat dan etanol dan tetrasiklin sebagai kontrol positif.

D. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini dengan menentukan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam kecambah kayu kapur dengan uji fitokimia dan uji aktivitas antibakteri dari ekstrak n-heksana, etil asetat dan etanol kecambah kayu kapur dengan berbagai konsentrasi terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Data hasil perolehan seluruhnya kemudian disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut :

Tabel III. 1 Uji Fitokimia Serbuk Simplisia Kecambah Kayu Kapur

No.	Golongan senyawa	Hasil	Keterangan
1.	Flavonoid		
2.	Alkaloid		
3.	Steroid & Terpenoid		

⁶⁵Lowysa Wanti Silaban, *op.cit*, hal. 27.

4.	Saponin		
5.	Tanin		

Tabel III. 2 Zona Hambat Ekstrak n-heksana Kecambah Kayu Kapur

No.	Ekstrak mg/ml	Diameter hambat (mm)							
		<i>S. aureus</i>				<i>E. coli</i>			
		I	II	III	D*	I	II	III	D*
1	40								
2	80								
3	160								
4	320								

Tabel III. 3 Zona Hambat Ekstrak Etil Asetat Kecambah Kayu Kapur

No.	Ekstrak mg/ml	Diameter hambat (mm)							
		<i>S. aureus</i>				<i>E. coli</i>			
		I	II	III	D*	I	II	III	D*
1	40								
2	80								
3	160								
4	320								

Tabel III. 4 Zona Hambat Ekstrak Etanol Kecambah Kayu Kapur

No.	Ekstrak mg/ml	Diameter hambat (mm)							
		<i>S. aureus</i>				<i>E. coli</i>			
		I	II	III	D*	I	II	III	D*
1	40								
2	80								
3	160								
4	320								

Tabel IV. 5 Zona Hambat Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

No.	Kontrol	Diameter hambat (mm)							
		<i>S. aureus</i>				<i>E. coli</i>			
		I	II	III	D*	I	II	III	D*
1	n-heksana								
2	Etil asetat								
3	Etanol								
4	Tetrasiklin (2500 ppm)								

Keterangan:

I : Uji ke-1

II : Uji ke-2

III : Uji ke-3

D* : Diameter rata-rata tiga kali pengamatan

E. Teknik Analisa Data

Penelitian ini bersifat deskriptif kualitatif. Diameter hambat yang berupa zona bening yang diperlihatkan dari masing-masing hasil ekstrak n-heksana, etil asetat dan etanol kecambah kayu kapur dengan berbagai konsentrasi terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* diukur sebagai aktivitas antibakterinya.