

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan Juli 2013 di Laboratorium Pertanian Universitas Sultan Syarif Kasim Riau.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Laminar Air Flow (LAF), hot plate magnetic stirrer, mikropipet, vortex, penjepit tabung, ball pipetor, spatula, oven, lemari pendingin, rak tabung reaksi, blender, cawan petri diameter 120 mm, inkubator, autoklaf, seperangkat alat destilasi, jarum ose, neraca analitik, pipet tetes, gunting, sarung tangan, penggaris, pembakar bunsen, lemari pendingin, *rotary vacuum evaporator* dan alat-alat gelas.

2. Bahan

Daun cincau, metanol, nutrien agar (NA), etanol, aquades, serbuk Mg, HgCl₂, HCl pekat, amoniak, kloroform, asam sulfat 2 N, FeCl₃, asam sulfat, asam asetat, kalium iodida, NaCl fisiologis, tetrasiklin, alumunium foil, kertas saring, kapas berlemak.

3. Bakteri yang digunakan

Bakteri yang digunakan adalah bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari koleksi laboratorium pertanian UIN SUSKA RIAU

C. Prosedur Penelitian

1. Preparasi Sampel

Daun cincau hijau spesies (*Premna oblongifolia Mers*) diambil dari kabupaten kampar sebanyak 4 kg. Sampel yang akan diuji dibersihkan dari pengotornya. Kemudian dilakukan proses perajangan dan dikering anginkan selama ± 1 minggu. Setelah kering, sampel dihaluskan sampai menjadi bubuk. Proses ini dilakukan untuk memperbesar luas permukaan sampel sehingga proses penetrasi pelarut ke dalam sampel dapat berlangsung dengan optimal.

2. Pembuatan larutan Pereaksi

a. Larutan Pereaksi Meyer

A	HgCl ₂	1,358 g
	Akuades	60 ml
B	KI	5 g
	Akuades	10 ml

Tuangkan larutan A ke dalam larutan B, encerkan dengan akuades sampai volum larutan menjadi 100 ml.

*Pereaksi untuk hampir semua alkaloida dengan membentuk endapan putih dalam suasana sedikit asam.¹

¹ Mulyono HAM, *Membuat Reagen Kimia Di Laboratorium*, Bumi Aksara, Jakarta, 2009, hlm. 71.

b. Larutan Pereaksi Liebermann-Burchard

Pereaksi Liebermann-Burchard terdiri dari anhidrida asam asetat (p.a), dan asam sulfat (p.a) dengan perbandingan 3:1.²

c. Pereaksi Besi (III) Klorida 1%

Sebanyak 1 gram besi (III) klorida dilarutkan dalam air suling hingga 100 ml, dipindahkan ke erlenmeyer.

d. Larutan Asam Sulfat 2N

Sebanyak 2,72 ml asam sulfat pekat dilarutkan dengan air suling dengan labu ukur 50 ml hingga tanda batas labu.³

3. Pembuatan Media

a. Pembuatan Media *Nutrient Agar*

Media NA dibuat sebanyak 2%. Kemudian dipanaskan hingga larut dalam labu erlenmeyer, disumbat dengan kapas berlemak dan ditutup dengan aluminium foil lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

b. Larutan Natrium Klorida 0,9%

Sebanyak 0,9 g NaCl ditimbang dan dilarutkan dengan air suling, dimasukkan dalam labu ukur 100 ml sampai larut sempurna, ditambahkan air suling sampai batas labu, dimasukkan dalam Erlenmeyer steril yang bertutup, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

²Malec dan Pomilio, 2003, dikutip dari K. Siadi, “*Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (Jatropha Curcas) Sebagai Biopestisida Yang Efektif Dengan Penambahan Larutan NaCl*”, N 0215-9945, April 2012, hlm. 78.

³Mulyono, *Op.Cit.*, hlm.31

c. Pembuatan Agar Miring

Sebanyak 3 ml media *Nutrien Agar* cair, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, diletakkan pada sudut kemiringan 30-45⁰C dan dibiarkan memadat, kemudian disimpan di dalam lemari pendingin.⁴

4. Skrining Fitokimia

Uji Flavonoid

Sebanyak 1 g ekstrak daun cincau ditambahkan etanol 95% kemudian dipanaskan. Lapisan atas dipipet dan ditambahkan dengan HCl pekat 2 N dan serbuk Mg. Flavonoid: munculnya warna merah.

Uji Alkaloid

Sebanyak 4 g sampel 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 kedalam tabung tersebut ditambahkan beberapa tetes pereaksi mayer. Apabila terbentuk endapan putih menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid.⁵

⁴ Lowysa Wanti Silaban, "Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antibakteri Kulit Buah *Sentul* Terhadap Beberapa Bakteri Secara *Invitro*" Skripsi, Universitas Sumatera Utara, Medan, 2009.

⁵ Marlinda, Meiske S. Sangi, Audy D. Wuntu. "Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana Mill.*)", Jurnal MIPA UNSRAT Online 1 (1) 24-28, 2012, hlm. 25.

Uji Steroid

Sejumlah sampel dilarutkan dalam 2 ml kloroform dalam tabung reaksi yang kering. Lalu didalamnya ditambahkan 10 tetes anhidrat asetat dan 3 tetes asam sulfat pekat. Jika terbentuk warna biru atau hijau maka sampel positif mengandung steroid..⁶

Tanin

Sampel daun cincau halus sebanyak 20 mg ditambah etanol sampai sampel terendam semuanya. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau..⁷

Saponin

Sebanyak 0,5 gram serbuk simplisia dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan kemudian dikocok selama 10 detik, jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil dan tidak berkurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin..⁸

5. Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi menggunakan pelarut metanol. Maserasi dengan pelarut metanol dilakukan pada suhu ruang selama 24 jam dengan pengadukan sesering mungkin. Sampel kering berupa bubuk halus daun cincau sebanyak 200 g dimaserasi dengan

⁶ Azwin, Apriandi. "Aktivitas Antioksidan Dan Komponen Bioaktif Keong Ipong-Ipong (*Fasciolaria Salmo*)", Skripsi. Institut Pertanian Bogor . Bogor. 2011.

⁷ Mira Marlinda, Meiske S. Sangi, Audy D. Wuntu, *Op.Cit.*, hlm. 25.

⁸ Lowysa Wanti Silaban. *Loc.Cit.*

1 liter (1 : 5) pelarut metanol. Selanjutnya filtrat metanol dipisahkan dari residunya dengan penyaringan dilanjutkan dengan maserasi ulangan hingga pelarutnya jernih. Filtrat yang didapat dicampur kemudian diuapkan pelarutnya menggunakan rotari vacum evaporator hingga diperoleh ekstrak pekat metanol serbuk daun cincau.

6. Pemiakan bakteri

a. Pembuatan Stok Kultur (Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *E.coli*)

Diambil satu koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan kawat ose steril, lalu ditanamkan pada media *Nutrien Agar* miring dengan cara menggores, setelah itu diinkubasi dalam inkubator pada suhu $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 18-24 jam. Untuk pembuatan stok kultur bakteri *Escherichia coli* dilakukan cara yang sama seperti pada bakteri *Staphylococcus aureus*.⁹

b. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Dari stok kultur bakteri yang telah tumbuh diambil dengan jarum ose steril lalu disuspensikan dalam tabung yang berisi 10 ml larutan natrium klorida 0,9%, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .

⁹ Lowysa Wanti Silaban, *Op.Cit.*, hlm. 26

7. Uji aktivitas antibakteri

Uji sumur difusi ini dilakukan untuk mengetahui apakah ada aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun cincau terhadap bakteri *E. Coli* dan *S. Aureus*. Uji ini merupakan uji kualitatif dan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Sebelum uji sumur difusi dilakukan, terlebih dahulu dibuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 1g/ml dan tetrasiklin tablet 500 mg dengan konsentrasi 10% (w/v). Kultur bakteri yang telah diremajakan diambil sebanyak 0,1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Selanjutnya media agar steril 20 ml dituangkan ke dalam cawan petri, lalu dicampur merata dan dibiarkan memadat pada suhu kamar. Setelah media memadat, dibuat lubang berdiameter 0,6 cm menggunakan pangkal pipet tetes, lalu ditetesi dengan perlakuan-perlakuan (ekstrak metanol daun cincau hijau dan tetrasiklin sebagai kontrol positif serta metanol sebagai kontrol negatif) sebanyak 0,1 ml. Kemudian dilakukan pra inkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam. Daya antibakteri masing-masing perlakuan ditunjukkan oleh diameter zona bening disekitar lubang.

8. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum

Setelah diketahui ekstrak metanol daun cincau hijau mempunyai aktivitas antibakteri, selanjutnya ekstrak metanol daun cincau hijau ditentukan Konsentrasi Hambat Minimum terhadap bakteri uji. KHM digunakan untuk mengetahui konsentrasi minimum dari suatu larutan antimikroba terhadap pertumbuhan mikroba tertentu. Variasi konsentrasi

yang digunakan untuk menentukan KHM pada penelitian ini yaitu 62,5 mg/ml, 125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml. Kultur bakteri yang telah diremajakan diambil sebanyak 0,1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Selanjutnya media agar steril 20 ml dituangkan ke dalam cawan petri, lalu dicampur merata dan dibiarkan memadat pada suhu kamar. Setelah media memadat, dibuat lubang berdiameter 0,6 cm menggunakan pangkal pipet tetes, lalu ditetesi dengan masing konsentrasi ekstrak dan metanol sebagai kontrol negatif sebanyak 0,1 ml. Kemudian dilakukan pra inkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas antibakterinya diperoleh dengan mengukur zona bening.

Zona hambat dihitung dengan mengukur diameter zona bening. Uji ini dilakukan pada kedua bakteri (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*) dengan tiga kali pengulangan. Pengujian ini dilakukan secara aseptik. Dari pengujian ini, akan diketahui pada konsentrasi berapa ekstrak memiliki aktivitas antibakteri.¹⁰

D. Teknik Analisis Data

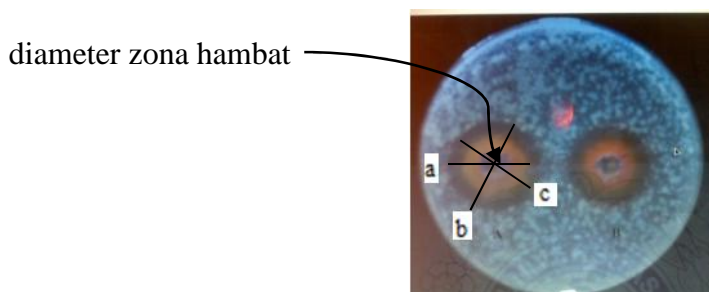
Data akan didapat setelah dilakukan analisa pada serbuk simplisia, yaitu setelah melalui proses skrining fitokimia, ekstraksi, dan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar sumur. Berikut format tabel hasil skrining fitokimia dan aktivitas antibakteri dari ekstrak daun cincau hijau (*Premna oblongifolia Merr*).

¹⁰ *Ibid.*

Tabel III.1 Skrining fitokimia ekstrak daun cincau hijau (*Premna oblongifolia Merr.*)

No.	Golongan senyawa	Hasil Ekstrak daun
1.	Flavonoid	
2.	Alkaloid	
3.	Steroid	
4.	Saponin	
5.	Tanin	

Setelah melakukan uji aktivitas antibakteri, diukur diameter zona hambat dengan penggaris atau jangka sorong seperti contoh berikut, kemudian data yang di peroleh dituangkan dalam tabel diameter hambat.



Gambar III.1 Contoh Pengukuran Diameter Hambat

Contoh pengukuran diameter hambat (gambar hasil uji aktivitas dari ekstrak etanol kulit buah sentul terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* oleh Lowsya Wanti Silaban.)

$$\text{Diameter zona hambat} = \frac{D1+D2+D3}{3} - d$$

Dimana : D1, D2, D3 adalah areal bening (mm)

d adalah diameter sumur (mm)

Tabel III.2 diameter hambat ekstrak daun cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr).

No	Konsentrasi (mg/ml)	<i>S. aureus</i>				<i>E. coli</i>			
		1	2	3	D*	1	2	3	D*
1	500								
2	250								
3	125								
4	62,5								
5	Kontrol positif								
6	Kontrol negatif								

Keterangan :

D* : diameter rata-rata zona hambat

Konsentrasi terendah yang menunjukkan adanya zona bening disebut konsentrasi hambat minimum (KHM).