

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *experimental* untuk mengetahui perbandingan dengan melakukan pengujian aktivitas antibakteri daun ketapang, daun pinus, dan daun bambu kuning menggunakan bakteri *Aeromonas salmonicida* dengan metode difusi cakram yang diberi perlakuan adanya variasi konsentrasi ekstrak yang dibandingkan dengan kadar antibakteri berupa tanin (total fenol), flavonoid, dan saponin. Rancangan penelitian ini dengan rancangan acak lengkap dengan 3 unit percobaan daun ketapang, daun pinus, dan bambu kuning, didapat hasil berupa aktivitas antibakteri dan kadar polifenol (tanin), flavonoid, saponin dari masing-masing unit percobaan.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari – Maret 2021 yang bertempat di:

1. Laboratorium Kimia UPT Materia Medika Batu
2. Laboratorium Instrumentasi UPT Materia Medika Batu
3. Laboraturium Mikrobiologi UPT Materia Medika Batu

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Bahan

Daun ketapang, daun pinus, daun bambu kuning, bakteri *Aeromonas salmonicida*, *Tryptone Soya Agar (TSA)*, *Tryptone Soya Broth (TSB)*, Etanol 96%, aquades, asam galat, reagen Folin-Ciocalteu, larutan Na_2CO_3 , larutan NaNO_2 , larutan AlCl_3 , larutan NaOH , larutan HCl , larutan FeCl , reagen meyer, reagen dragendorff, reagen bouchardat.

3.3.2 Alat

Autoklaf, inkubator, laminar air flow (LAF), ose bulat, cawan petri, tabung rekasi, beaker glass, gelas ukur, neraca analitik, pinset, spatula, wadah maserasi, rotary evaporator, mikropipet, grinder, oven, batang pengaduk, kertas saring, labu ukur, botol gelap, botol timbang, pipet tetes, penangas air, kuvet, spektrofotometer UV-Visible.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas (*independent variable*): konsentrasi ekstrak daun ketapang, daun pinus, dan daun bambu kuning.

Variabel terikat (*dependent variable*): diameter zona hambat aktivitas antibakteri, kadar polifenol (tanin), flavonoid, dan saponin.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Penelitian

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Daun ketapang, daun pinus, dan daun bambu kuning	Adalah daun ketapang kering, daun pinus kering, daun bambu kuning kering yang sudah tidak menempel pada ranting pohon (gugur) karena daunnya yang sudah kering.	Mata manusia	Sejumlah sampel daun yang akan dibuat serbuk.	Kategorik
Aktivitas Antibakteri	Zona terang disekitar cakram pada media <i>Tryptone Soya Agar</i> (TSA) yang telah ditanami <i>Aeromonas salmonicida</i> .	Jangka sorong	diameter zona hambat bakteri dalam satuan mm.	Numerik
Ekstrak	Ekstrak daun	Mikropipet	Jumlah	Kategorik

dengan variasi konsentrasi	dengan konsentrasi 100%, 50%, 10%, dan 5%.		ekstrak sesuai dengan konsentrasi	
Kadar antibakteri	Adalah hasil kadar polifenol (tanin), flavonoid, dan saponin di dalam daun ketapang, daun pinus, dan daun bambu kuning.	Spektrofotometer UV-Visible	Kadar dalam satuan %.	Numerik

3.6 Metode Penelitian

1. Pembuatan Serbuk Simplisia Daun (Materia Medika, 1979)

Pembuatan serbuk simplisia daun berdasarkan metode yang digunakan pada UPT Materia Medika

a. Persiapan

1. Cuci tangan pakai sabun (CTPS).
2. Pakai APD (pakaian kerja, masker, sarung tangan).
3. Siapkan seluruh dokumentasi yang dibutuhkan.

b. Panen

Sesuaikan umur tanaman siap panen (dipilih yang sudah kering gugur).

c. Sortasi Basah

1. Pisahkan dari pengotor ataupun gulma.
2. Pilih bagian tanaman yang baik, tidak rusak, berjamur, atau terkena penyakit.
3. Pilih bagian yang dibutuhkan untuk pembuatan simplisia timbang hasil sortasi basah.

d. Pencucian

1. Cuci hasil sortasi basah dengan air mengalir, jika perlu disikat/digosok.

2. Tiriskan hasil pencucian pada rak peniris sebelum dikeringkan.
- e. Perajangan
 1. Perajangan bertujuan untuk mempercepat pengeringan.
 2. Ranjang rimpang dengan menggunakan pisau atau mesin perajang rimpang.
 3. Rajang kurang lebih ukuran 3-5 mm.
- f. Pengeringan

Dilakukan 2 jenis pengeringan yaitu pengeringan menggunakan oven dan pengeringan menggunakan panas matahari.

Pengeringan (Oven)

 1. Atur suhu oven kurang dari 60 °C.
 2. Atur bahan dalam Loyang pengeringan dan ratakan ketebalannya.
 3. Keringkan sampai kadar air maksimal 10% (cek dengan moisture balance).

Pengeringan (Gedung)

 1. Atur bahan pada rak pengeringan dan ratakan ketebalannya.
 2. Cek dengan membolak-balikkan bahan dalam rak minimal 1 kali per hari
 3. Keringkan sampai kadar air maksimal 10% (dengan moisture balance).
- g. Sortasi Kering
 1. Pilih simplisia dengan kadar air maksimal 10%
 2. Pisahkan dari simplisia lain yang mungkin tercampur.
 3. Pisahkan dari simplisia yang terlalu kering atau rusak.
- h. Penggilingan

Jika dibutuhkan bentuk serbuk, simplisia digiling menggunakan mesin penggiling kasar maupun halus.
- i. Pengemasan dan Penyimpanan
 1. Timbang simplisia ataupun serbuk.
 2. Masukkan ke dalam kemasan.
 3. Tambahkan silica gel.
 4. Beri label (nama simplisia, atau serbuk, berat)
2. Pembuatan Ekstrak dengan maserasi(Materia Medika Indonesia)

Prosedur ekstraksi maserasi berdasarkan pedoman pengujian yang digunakan pada

pengujian Laboratorium Fitokimia Materia Medika.

- a. Ditimbang 100 g serbuk daun
- b. Dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 500 ml pada suhu kamar selama 3 hari.
- c. Disaring filtrat
- d. Diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental.
- e. Rendemen ekstrak etanol daun dihitung dengan membandingkan bobot awal simplisia dengan bobot akhir ekstrak yang dihasilkan.

3. Uji aktivitas antibakteri

Prosedur yang dilakukan berdasarkan modul pembelajaran praktikum mikrobiologi Jurusan Gizi Politeknik Kemenkes Malang.

- a. Sterilisasi Alat
 1. Dibungkus alat-alat gelas yang dibutuhkan dengan menggunakan plastik.
 2. Dimasukkan alat yang telah dibungkus kedalam *Autoclave* untuk steriliasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

b. Pembuatan Media

Dilakukan pembuatan 2 jenis media yaitu TSB dan TSA.

1. Pembuatan Media TSB

- a) Ditimbang media sebanyak 2,1 gram
- b) Dilarutkan dengan pelarut aquades sebanyak 70 ml

2. Pembuatan Media TSA

- a) Ditimbang media sebanyak 2,8 gram
- b) Dilarutkan dengan pelarut aquades sebanyak 70 ml

c. Persiapan Isolat Bakteri *Aeromonas Salmonicida*

Isolat bakteri *Aeromonas Salmonicida* yang digunakan berasal dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya

d. Pembuatan Larutan Ekstrak Daun

Dibuat larutan ekstrak dengan variasi konsentrasi yaitu 100,50,10,5% dengan cara

:

1. Ditimbang 10, 5, 1, dan 0,5, gram masing-masing ekstrak
 2. Dilarutkan menggunakan pelarut aquades steril sebanyak 10 ml
 3. Dihomogenkan
- e. Uji Aktivitas Antibakteri (Affandi *et al.*, 2009)
- Prosedur berdasarkan penelitian Affandi *et al* (2009).
1. Ditumbuhkan inokulum bakteri *Aeromonas salmonicida* pada media TSB selama 24 jam
 2. Diambil sebanyak 50 μ L dengan kepadatan bakteri 10^{14} CFU/ml menggunakan mikropipet
 3. Ditumbuhkan pada media TSA dan disebarakan secara merata, Digerakan cawan memutar supaya bakteri dan agar tercampur secara homogen
 4. Diamkan sampai membeku.
 5. Dichelupkan kertas cakram kedalam larutan ekstrak
 6. Diletakkan kertas saring yang telah diberi ekstrak diatas media TSB
 7. Diinkubasi media selama 24 jam pada suhu 37 °C
 8. Diamati dan diukur diameter zona hambatnya dengan jangka sorong

4. Pengujian Senyawa Metabolit Sekunder (Materia Medika Indonesia)

Dilakukan 2 pengujian yaitu pertama uji kualitatif untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antibakteri yaitu tanin, flavonoid, dan saponin, kedua uji kuantitatif untuk menentukan kadar dari senyawa metabolit sekunder tanin, flavonoid, dan saponin berdasarkan prosedur pengujian yang digunakan pada Laboraturium Instemen Materia Medika.

Prosedur uji kualitatif adalah :

a. Preparasi sampel

1. Ditimbang sampel sebanyak 5 gram menggunakan neraca
2. Dilarutkan menggunakan pelarut air sampai 80 ml dalam beaker glass
3. Dipanaskan selama 20 menit larutan menggunakan bunsen spirtus untuk mengekstrak sampel
4. Disaring menggunakan kertas saring
5. Disiapkan tabung reaksi sebanyak 6 tabung dan diberi label blanko, uji flavonoid, tanin, dan saponin.

6. Dipipet filtrat masing-masing sebanyak 2 ml ke dalam tabung reaksi
- b. Uji Tanin
 1. Diteteskan larutan FeCl₃ sebanyak 3 tetes
 2. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi agak gelap (kehitaman/kebiruan)
 - c. Uji Flavonoid
 1. Ditambahkan serbuk magnesium ke dalam tabung
 2. Diteteskan larutan HCl sebanyak 3 tetes
 3. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi jingga, merah atau merah muda
 - d. Uji Saponin
 1. Diteteskan air panas ke dalam tabung sebanyak 3 tetes
 2. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih

Prosedur uji kuantitatif adalah :

1. Uji Kuantitatif Kadar Polifenol (tanin)
 - a. Pembuatan Pereaksi
 1. Pereaksi Folin Ciocalteu 7,5% :

Pipet larutan Folin Ciocalteu pekat sebanyak 7,5 ml dalam labu ukur 100 ml, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis, kemudian larutkan dan homogenkan. Simpan dalam wadah (botol coklat) agar tidak terkena sinar matahari.
 2. Pereaksi natrium karbonat 7%

Timbang natrium karbonat sebanyak 7 g masukkan dalam gelas piala 100 ml, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis, larutkan dan homogenkan menggunakan magnetic stirrer.
 - b. Pembuatan Deret Standar
 1. Dibuat standar induk asam galat 50 ppm dengan cara menimbang 2,5 mg standar asam galat, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 50 ml.
 2. Ditambahkan aquades sampai tanda tera, homogenkan
 3. Buat 5 variasi deret standar yaitu 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm, 3,125

ppm, dan 1,5625 ppm, masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml.

4. Dari masing-masing larutan tersebut, diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 100 μ L dan masukkan ke dalam botol coklat
 5. Tambahkan 1500 μ L natrium karbonat 7% kedalam masing-masing konsentrasi
 6. Diinkubasi selama 5 menit
 7. Tambahkan 1500 μ L ml larutan Follin Ciocalteu 10%
 8. Diinkubasi pada suhu 45°C selama 15 menit
 9. Ukur absorbansi masing-masing standar pada panjang gelombang 735 nm
 10. Buat grafik linearitas standar, konsentrasi ppm sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y
- c. Penentuan Kadar Polifenol (tanin)
1. Ditimbang masing-masing sampel sebanyak 10 mg
 2. Dilarutkan sampel dengan pelarut aquades dalam labu ukur 10 ml
 3. Dipipet larutan sampel masing-masing sebanyak 100 μ L tempatkan pada botol coklat
 4. Ditambahkan 0,75 ml natrium karbonat 7% kedalam masing-masing sampel
 5. Diinkubasi selama 5 menit
 6. Ditambahkan 0,75 ml larutan Foliin Ciocalteu 7,5% kedalam masing-masing sampel
 7. Diinkubasi pada suhu 45°C selama 15 menit
 8. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 735 nm
 9. Hitung kadar polifenol (tanin) dalam contoh berdasarkan kurva kalibrasi
2. Uji Kuantitatif Kadar Flavonoid
- a. Pembuatan Pereaksi
1. Pereaksi NaNO_3 0,5M
Ditimbang padatan NaNO_3 sebesar 4,25 g dan dilarutkan

menggunakan pelarut aquades sebanyak 100 ml.

2. Pereaksi AlCl_3 10%

Ditimbang padatan AlCl_3 sebesar 1 g dan dilarutkan menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 10 ml.

3. Pereaksi NaOH 1M

Ditimbang padatan NaOH sebesar 4 g dan dilarutkan menggunakan pelarut aquades sebanyak 100 ml.

b. Pembuatan Deret Standar

1. Dibuat standar induk quercetin 250 ppm dengan cara menimbang 12,5 mg standar quercetin, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 50 ml.

2. Ditambahkan aquades sampai tanda tera, homogenkan

3. Buat 5 variasi deret standar yaitu 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm, 15,625 ppm, dan 7,813 ppm masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml.

4. Dari masing-masing larutan tersebut, diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 100 μL dan masukkan ke dalam botol coklat

5. Ditambahkan NaNO_3 sebanyak 60 μL pada masing-masing sampel

6. Diinkubasi selama 5 menit

7. Ditambahkan AlCl_3 sebanyak 60 μL pada masing-masing sampel

8. Diinkubasi selama 6 menit

9. Ditambahkan NaOH sebanyak 400 μL pada masing-masing sampel

10. Ditambahkan aquades sebanyak 480 μL pada masing-masing sampel

11. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 425 nm

12. Buat grafik linearitas standar, konsentrasi ppm sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y

c. Penentuan Kadar Flavonoid

1. Ditimbang masing-masing sampel sebanyak 10 mg

2. dilarutkan sampel dengan pelarut aquades dalam labu ukur 10 ml

3. Diambil masing-masing sampel sebanyak 1 ml diletakkan dalam botol coklat

4. Ditambahkan NaNO_3 sebanyak 60 μL pada masing-masing sampel

5. Diinkubasi selama 5 menit
 6. Ditambahkan AlCl_3 sebanyak 60 μL pada masing-masing sampel
 7. Diinkubasi selama 6 menit
 8. Ditambahkan NaOH sebanyak 400 μL pada masing-masing sampel
 9. Ditambahkan aquades sebanyak 480 μL pada masing-masing sampel
 10. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 425 nm
 11. Hitung kadar polifenol (tanin) dalam contoh berdasarkan kurva kalibrasi
3. Uji Kuantitatif Saponin
- a. Pembuatan Deret Standar
 1. Dibuat standar induk saponin 1000 ppm dengan cara menimbang 50 mg standar saponin, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 50 ml.
 2. Ditambahkan aquades sampai tanda tera, homogenkan
 3. Buat 6 variasi deret standar yaitu 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 625 ppm, dan 31,25 ppm, dan 15,625 ppm masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml.
 4. Dari masing-masing larutan tersebut, diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 2 mL dan masukkan ke dalam botol coklat
 5. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 275 nm
 6. Buat grafik linearitas standar, konsentrasi ppm sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y
 - b. Penentuan Kadar Saponin
 1. Ditimbang masing-masing sampel sebanyak 10 mg
 2. Dilarutkan sampel dengan pelarut aquades dalam labu ukur 10 ml
 3. Dipipet masing-masing sampel sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam botol coklat
 4. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 275 nm
 5. Hitung kadar saponin dalam contoh berdasarkan kurva kalibrasi

3.7 Metode Analisis

Hasil yang diperoleh berupa hasil diameter daya hambat antibakteri terhadap bakteri

Aeromonas salmonicida dan kadar polifenol (tanin), flavonoid, dan saponin di dalam daun ketapang kering, daun bambu kuning kering, dan daun pinus kering.

3.8 Pengolahan, penyajian, dan analisis data

3.8.1 Pengolahan Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat antibakteri dan kadar polifenol (tanin), flavonoid, dan saponin yang terkandung dalam daun ketapang, daun pinus, dan daun bambu kuning. Data pada penelitian berupa dua variabel atau lebih kelompok yang tidak berpasangan sehingga dianalisis secara statistik inferensial menggunakan statistik *One-Way ANOVA (Analysis of Variance)* dengan taraf signifikan $<0,05$ yang berarti data terdistribusi normal maka konsentrasi berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas salmonicida* yang menunjukkan antibakteri yang paling efektif.

3.8.2 Penyajian Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut:

Tabel 3. 2 Contoh Tabel Penyajian Data Hasil Penelitian

No	Sampel	Diameter Zona Hambat (mm)	Kadar Polifenol (tanin) (%)	Kadar Flavonoid (%)	Kadar Saponin (%)
1	Daun Ketapang				
2	Daun Pinus				
3	Daun bambu Kuning				

3.8.3 Analisis Data

Analisis yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan melakukan uji normalitas dan homogenitas menggunakan program *Statistical Product and Service Solution (SPSS)* untuk melihat

apakah ada efektivitas yang bermakna dari ekstrak daun dengan berbagai konsentrasi. Jika data yang dihasilkan menghasilkan taraf signifikan $>0,05$ maka akan dilanjutkan dengan menggunakan analisis *One-Way ANOVA (Analysis of Variance)*.