

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimental di laboratorium untuk mengetahui aktivitas senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak daun telang sebagai antibakteri terhadap bakteri *staphylococcus aureus*.

Ekstrak daun telang digunakan sebagai rancangan penelitian. Metode ekstraksi yang digunakan ialah metode maserasi bertingkat dengan tiga jenis pelarut yang berbeda. Pelarut tersebut terdiri atas metanol, etil asetat, dan n-heksan. Uji skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder. Ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol dibuat dalam konsentrasi 40%, 60%, 80%, dan 100%. Metode yang digunakan sebagai uji bakteri pada bakteri *staphylococcus aureus* ialah metode difusi sumuran.

#### **3.2 Bahan dan Alat yang Digunakan**

##### **3.2.1 Bahan**

Penelitian ini menggunakan beberapa bahan berupa daun telang, TSA (*Tryptone Soya Agar*), n-heksan, etil asetat, metanol, pereaksi mayer, pereaksi Lieberman-Burchard,  $\text{FeCl}_3$  5%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N, NaOH 1%, HCl 2N, aquadest, ciprofloxacin, kapas steril, DMSO (Dimetil sulfoksida), bakteri *staphylococcus aureus*, pipa kapiler, aluminium foil, plat KLT, kertas saring.

##### **3.2.2 Alat**

Penelitian ini menggunakan berbagai alat yang terdiri atas blender, seperangkat alat maserasi, rotary evaporator, neraca analitik, oven, penjepit, spatula, mortir dan stamper, cawan petri, batang pengaduk, erlenmeyer, gelas ukur, jangka sorong, water bath, kompor listrik, Laminar Air Flow (LAF), kapas steril, jarum ose, bunsen, pipet tetes, mikropipet, beaker glass, tabung reaksi, botol coklat, chamber, lampu UV, Autoklaf, inkubator, sarung tangan, masker, hot plate, cawan porselen, kaca arloji, batang sumuran, dan petri disk.

### 3.3 Variabel Penelitian

#### 3.3.1 Variabel Independen

Dalam penelitian ini ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol daun telang berperan sebagai variabel independen atau variabel bebas.

#### 3.3.2 Variabel Dependen

Organoleptik, skrining fitokimia, rendemen, nilai Rf, dan aktivitas antibakteri menjadi variabel dependen atau variabel terikat dalam penelitian ini.

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

Tabel 1. Definisi Operasional Variabel

| No | Variabel              | Definisi                                                                                               | Hasil ukur                                                 | Skala   |
|----|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------|
| 1  | Organoleptik Warna    | Pengujian secara visual untuk menentukan warna ekstrak daun telang.                                    | 1. Bening<br>2. Agak kecokelatan<br>3. Cokelat<br>4. Gelap | Ordinal |
| 2  | Organoleptik Aroma    | Pengujian secara indra penciuman untuk menentukan aroma ekstrak daun telang.                           | 1. Khas<br>2. Tidak khas                                   | Ordinal |
| 3  | Organoleptik Bentuk   | Pengujian secara objektif pada ekstrak daun telang                                                     | 1. Cair<br>2. Sedikit kental<br>3. Kental                  | Ordinal |
| 4  | Skrining Fitokimia    | Memberikan gambaran mengenai kandungan senyawa metabolit sekunder dalam bahan alam yang akan diteliti. | 1. Perubahan warna<br>2. Endapan<br>3. Berbusa             | Ordinal |
| 5  | Rendemen              | Perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal.                                      | %                                                          | Rasio   |
| 6  | Nilai Rf              | Jarak yang ditempuh senyawa dibagi jarak yang ditempuh pelarut.                                        | cm                                                         | Rasio   |
| 7  | Aktivitas antibakteri | Pengujian dihitung zona bening dengan menggunakan jangka sorong.                                       | mm                                                         | Rasio   |

### 3.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Lokasi penelitian ini bertempat di Laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang, dilaksanakan pada bulan Maret - Juni 2021.

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Proses Ekstraksi

Ekstraksi daun telang dilakukan dengan metode maserasi, yaitu 1 kg sampel kemudian diekstraksi dengan 3 pelarut berbeda, yaitu metanol, etil asetat, dan n-heksan. Proses maserasi diawali dengan pelarut n-heksan yang dilakukan selama 3 sampai 4 hari serta pengadukan sekali-kali. Selanjutnya, dilakukan penyaringan secara berulang hingga tidak berwarna keruh. Rotary evaporator digunakan untuk menggabungkan dan menguapkan hasil maserasi sehingga didapat ekstrak kental n-heksana. Residu yang didapat dari n-heksana selanjutnya dimaserasi lagi menggunakan pelarut etil asetat selama 3 – 4 hari. Langkah berikutnya ialah maserasi pelarut etil asetat. Proses ini dilakukan secara berulang seperti halnya proses ekstraksi dengan pelarut n-heksan. Rotary evaporator juga digunakan untuk menggabungkan serta menguapkan hasil maserasi sehingga tercapainya ekstrak kental etil asetat. Residu yang diperoleh dari maserasi kedua atau etil asetat dimaserasi lagi menggunakan pelarut metanol selama 3 – 4 hari. Proses maserasi pelarut metanol serupa dengan pelarut n-heksana dan etil asetat. Kemudian dihitung rendemen ekstrak yang diperoleh.

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak total}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

#### 3.6.2 Skrining Fitokimia

Kandungan senyawa metabolit sekunder pada bahan alam yang akan diteliti dilakukan dengan cara skrining fitokimia yang merupakan tahap pendahuluan. Uji skrining fitokimia terbagi atas uji alkaloid, uji flavonoid, uji saponin, uji tanin, uji steroid dan triterpenoid. Dijelaskan sebagai berikut:

##### 1. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan amonia encer yang digerus pada mortir lalu ditambahkan beberapa mililiter klorofom sambil terus digerus. Selanjutnya, dilakukan pengocokan dan penyaringan filtrat bersama HCL 2N. Lapisan asam dibagi menjadi tiga. Blanko sebagai bagian pertama, sedangkan bagian kedua dilakukan penetesan. Pereaksi yang digunakan untuk menetes bagian kedua ialah mayer, sedangkan pereaksi dragendorff digunakan

pada bagian ketiga. Pereaksi mayer menciptakan endapan putih, sedangkan pereaksi dragendrof menciptakan endapan jingga coklat yang menunjukkan reaksi positif atau adanya alkaloid (Farnsworth, 1966).

## 2. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan menggerus simplisia pada mortir yang dipanaskan dengan air di atas penangas. Selanjutnya dilakukan penyaringan hingga menghasilkan filtrat. Filtrat tersebut dimasukkan pada tabung reaksi yang ditambahkan logam magnesium, larutan alkohol:HCL dengan perbandingan 1:1 dan amil alkohol. Sintesis tersebut lalu dikocok dengan kuat. Warna merah, kuning, atau jingga pada filtrat menunjukkan bahwa terdapat flavonoid yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Farnsworth, 1966).

## 3. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan memanaskan air yang terdapat gerusan simplisia pada penangas. Dilakukan penyaringan hingga menghasilkan filtrat. Filtrat yang sudah dingin pada tabung reaksi dikocok dengan kuat selama beberapa menit. Busa yang ditimbulkan minimal setinggi 1 cm. Kemudian, didiamkan dalam beberapa menit tetapi busa tidak boleh hilang ketika ditambahkan setetes HCl encer yang membuktikan bahwa saponin terkandung dalam simplisia (Farnsworth, 1966).

## 4. Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan menggerus simplisia pada mortir lalu memanaskan air di atas penangas. Penyaringan dikerjakan hingga menghasilkan filtrat. Pengujian ini membagi filtrat menjadi dua bagian. Pereaksi  $\text{FeCl}_3$  ditetaskan pada bagaian pertama, sehingga membentuk warna biru yang berarti terkandung tanin dan polifenolat di dalamnya. Sedangkan, larutan gelatin dengan persentasi sebesar 1% ditambahkan pada bagian kedua, sehingga terdapat endapan putih yang berarti adanya tanin di dalam simplisia (Farnsworth, 1966).

## 5. Uji Steroid dan Triterpenoid

Pada uji steroid dan triterpenoid, penyarian dilakukan pada simplisia menggunakan eter. Eter selanjutnya dievaporasi sampai kering. Pereaksi

*lieberman-Burchard* ditetaskan pada residu. Warna ungu yang dihasilkan memperlihatkan bahwa senyawa triterpenoid terkandung dalam simplisia, sedangkan kandungan senyawa steroid ditunjukkan oleh warna hijau – biru (Farnsworth, 1966).

### 3.6.3 Kromatografi Lapis Tipis

Hasil dari senyawa selanjutnya dilarutkan menggunakan pelarut dengan memperhatikan kesesuaian atau kecocokan, lalu ditotolkan pada plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan tindakan elusi dengan beberapa perbandingan eluen. Bercak noda pada lampu UV 254 nm dan 366 nm digunakan untuk melacak hasil elusi. Bercak noda tunggal tampak pada senyawa murni meskipun eluen dengan kepolaran berbeda digunakan. Nilai Rf dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

### 3.6.4 Penyiapan Media Agar

Media agar TSA ditimbang dengan bobot 10 gr dalam 250 mL aquades yang selanjutnya dipanaskan di atas *hotplate* sehingga homogen. Sterilisasi dilakukan melalui *autoclave* dengan suhu 121 °C dan durasi selama 1 jam sebagai bentuk menghindari tumbuhnya mikroorganisme. Selanjutnya, dilakukan penuangan secara aseptik pada cawan petri steril (Juriah & Sari, 2018).

### 3.6.5 Penyiapan Biakan Bakteri Uji

Proses inokulasi bakteri *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 – 2 ose terjadi pada media agar miring secara aseptis. Selanjutnya, dilakukan inkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18 hingga 24 jam.

### 3.6.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak daun telang digunakan metode sumuran dan *staphylococcus aureus* sebagai bakteri uji. Tahap yang dilakukan yaitu, buat lubang sumuran 5 mm pada permukaan cawan petri. Ekstrak yang telah disiapkan diambil kemudian ditetaskan pada lubang sumuran yang dibuat dengan konsentrasi 40%, 60%, 80%, dan 100%. Sebagai pembanding, ciproflaxacin difungsikan sebagai kontrol positif, sebaliknya DMSO difungsikan sebagai kontrol negatif. Berikutnya, pada suhu 37°C dilakukan inkubasi selama

kurun waktu 24 jam. Pembentukan zona hambat di sekeliling sumuran diamati, karena pembentukan tersebut menjadi indikator munculnya aktivitas antibakteri. Kemudian, dilakukan pengukuran menggunakan jangka sorong pada zona hambat yang terlihat.

### 3.6.7 Analisis Data

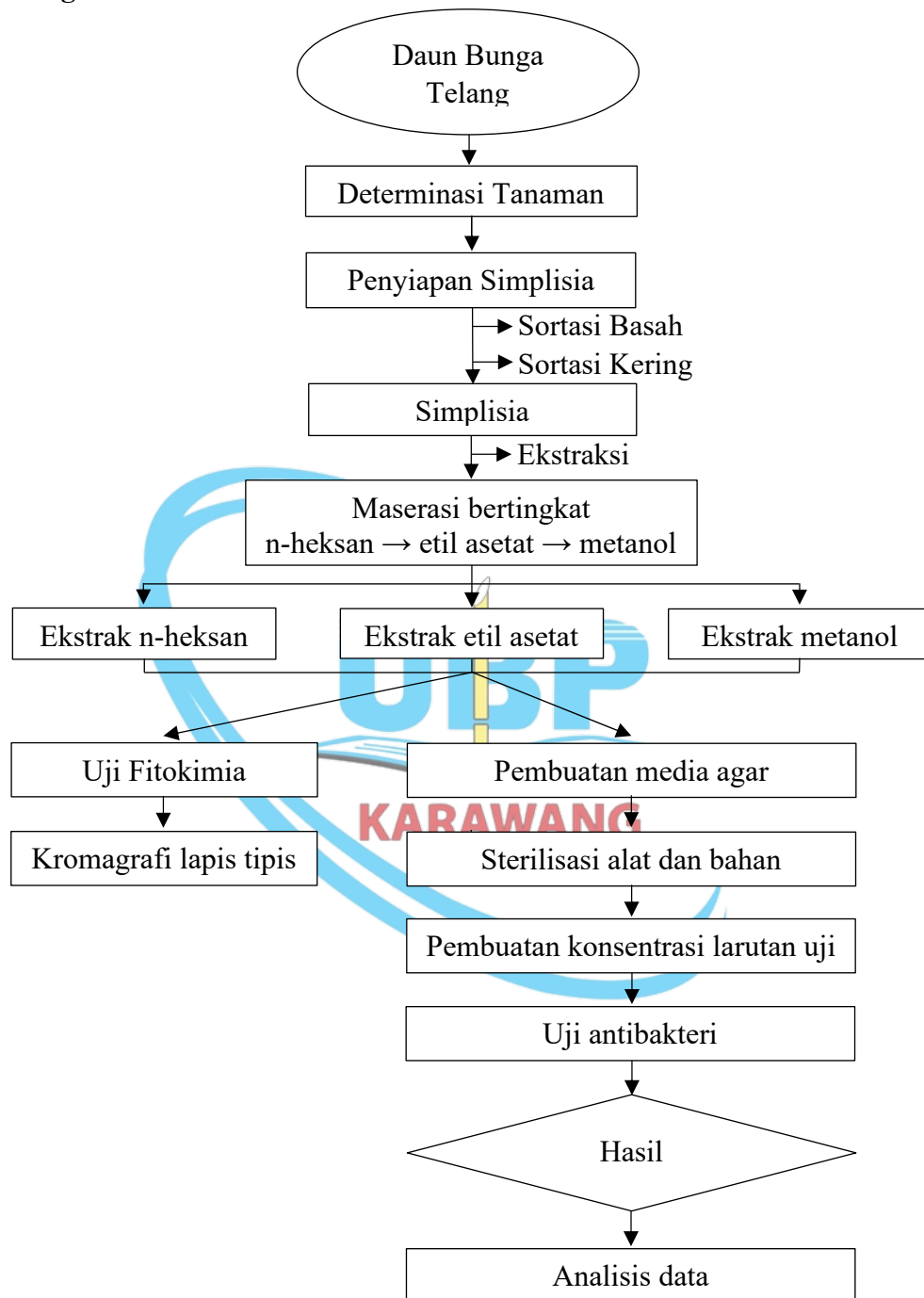
SPSS digunakan sebagai analisis statistika data yang didapat dari hasil penelitian. Uji normalitas dan homogenitas diamati karena menjadi syarat uji *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan  $\alpha=95\%$  dengan tiga kali pengulangan uji antibakteri pada masing-masing ekstrak. Analisis data ini bertujuan untuk melihat adanya perbedaan bermakna pada setiap konsentrasi ekstrak.  $H_0$  diterima ketika nilai  $\text{sig} > 0.05$ , artinya masing-masing konsentrasi ekstrak tidak mengalami perbedaan. Sementara itu,  $H_0$  ditolak ketika nilai  $\text{sig} < 0.05$  dan menerima  $H_1$  yang berarti adanya perbedaan nyata. Dalam rangka mengamati perbedaan yang terjadi pada setiap konsentrasi ekstrak, dilakukan uji *post hoc* tukey HSD.

### 3.6.8 Cara Penafsiran dan Penyimpulan Data

$H_0$ : Diameter zona hambat pada ekstrak daun telang tidak mengalami perbedaan signifikan.

$H_1$ : Diameter zona hambat pada ekstrak daun telang mengalami perbedaan signifikan.

### 3.7 Diagram Alir



Gambar 1. Prosedur Penelitian