

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu penelitian kualitatif dengan metode pendekatan eksperimental laboratorium untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak daun petai cina dan melakukan pengujian antibakteri pada ekstrak daun petai cina terhadap *Staphylococcus aureus*.

#### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan September 2018 sampai dengan bulan Februari 2019.

#### 3.3 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, seperangkat alat sokhlet, *rotary evaporator*, neraca analitik, oven, penjepit, micro haematorit tubes, spatula, mortar 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, beaker glass, tabung reaksi, batang pengaduk, spatula, botol coklat, neraca analitik, kolom, statif, klem, gelas ukur, pipet tetes, botol coklat, vial, plat tetes, chamber, lampu UV, Autoklaf, inkubator, sarung tangan, masker, hot plate, cawan porselen, kaca arloji, petri disk, labu ukur.

#### 3.4 Bahan Penelitian

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun petai cina (1 kg), etanol 96%, aquades, NA (Nutrient Agar), etil asetat,

pereaksi  $\text{FeCl}_3$ , silica gel,  $\text{FeCl}_3$  5%, alkohol 96%, n- heksan, metanol p.a, aquadest, kertas *whatman*, kapas steril, ciprofloxacin, DMSO (Dimetil sulfoksida), bakteri *Staphylococcus aureus*, plat KLT, pipa kapiler, aluminium foil, dan kertas saring.

### 3.4.1 Pembuatan Preagen Untuk Uji Fitokimia Dan Kromatografi Lapis Tipis

#### a. Sitroborat

Ditimbang Asam borat 0,5 gram dan asam sitrat 0,5 gram dilarutkan dalam etanol 50 ml.

#### b. NaOH 1%

Ditimbang 1 gram NaOH lalu dilarutkan dalam 100 ml

#### c. $\text{FeCl}_3$ 5%

Ditimbang 5 gram  $\text{FeCl}_3$  lalu dilarutkan dalam 100 ml

#### d. Uap KI

Dimasukan sesepora KI (Kalium-Iodida) lalu dimasukan dalam botol putih dan ditutup dengan plastik.

#### e. Dragendorff

Ditimbang 8,0 bismuth (II) nitrat dilakukan dalam 20 ml asam nitrat pekat kemudian dicampurkan dengan larutan kalium iodida sebanyak 27,2 g dalam air suling. Campuran didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan diencerkan dengan air suling secukupnya hingga 100 ml (Depkes, 1995).

#### f. Mayer

Sebanyak 1,36 gram raksa (II) klorida dilarutkan dengan 60 mL akuades di dalam gelas piala. Kemudian di dalam gelas piala terpisah, 1 gram kalium iodida dilarutkan dengan 10 mL akuades. Kedua larutan tersebut dicampurkan dan disaring. Campuran ini diencerkan hingga 100 mL di dalam labu ukur dengan akuades.

**g. Pereaksi Lieberman-Burchard**

Sebanyak 5 mL anhidrida asetat dan 5 mL asam sulfat pekat dicampurkan secara perlahan di dalam gelas piala, lalu diencerkan hingga 100 mL dengan pelarut etanol.

**h. Larutan besi (III) klorida 5%**

Sebanyak 5 gram kristal besi (III) klorida dimasukkan ke dalam gelas piala. Kemudian dilarutkan dengan akuades hingga 100 mL.

### 3.5 Tahap Pelaksanaan

#### 3.5.1 Pembuatan Ekstrak Daun Petai Cina

5 kg daun petai cina dilakukan sortasi basah untuk memisahkan daun dari kotoran. kemudian di keringkan dengan oven pada suhu 45°-50°C tujuannya untuk mengurangi kadar air pada daun peta cina. Sejumlah 100 gram ekstrak daun petai cina ditimbang dibungkus dengan kertas saring kemudian diikat dengan benang di masukkan dalam alat soklet dan pelarut di masukkan dalam labu soklet. Dilakukan sokletasi dengan suhu 70°C sampai tetesan sirkulasi tidak berwarna lagi atau kurang lebih selama 5 jam. Ekstrak cair yang di peroleh kemudian di uapkan dengan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental daun petai cina.

#### 3.5.2 Penapisan Fitokimia

a) Uji Kandungan Alkaloid

Ekstrak daun peta cina di masukkan dalam 3 tabung reaksi. Tabung I ditetesi pereaksi Bouchardat, jika terbentuk endapan coklat maka positif mengandung alkaloida. Tabung II ditetesi pereaksi Mayer, jika terbentuk endapan putih, maka positif mengandung alkaloida. Tabung III ditetesi pereaksi Dragendorff, jika terbentuk endapan jingga, maka positif mengandung alkaloida (Harborne, 1987).

b) Uji Kandungan Saponin

Ekstrak daun peta cina dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml aquadest, kemudian dikocok kuat-kuat. Jika terbentuk busa maka positif mengandung saponin (Harborne, 1987).

c) Uji Kandungan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid digunakan metode sianidin test, sebanyak 5 gram sampel tanaman petai cina ditambahkan 20 ml metanol, kemudian dididihkan dan disaring selagi panas. Ambil ekstrak metanol lalu uapkan, setelah kering residu dilarutkan dengan etil asetat dan disaring. Filtratnya diuapkan dan sisanya dilarutkan dalam etanol, kemudian tambahkan asam klorida pekat dan bubuk magnesium, terbentuknya warna orange sampai merah menunjukkan adanya flavonoid (kecuali untuk flavon).

d) Uji Kandungan Tanin

Ekstrak daun petai cina dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  5%, jika terbentuk larutan berwarna hijau atau hijau kehitam maka positif mengandung tannin (Harborne, 1987).

e) Uji Steroid dan Terpenoid

Ekstrak dimaserasi dengan 25 eter selama 2 jam kemudian saring. Filtrat sebanyak 5 ml diuapkan dengan cawan penguap. Kemudian ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat lalu ditambahkan 1 tetes asam sulfat pekat. Bahan positif mengandung steroid/triterpenoid jika terbentuk warna ungu – biru/hijau.

### 3.5.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis

Setelah dilakukan uji fitokimia ekstrak daun petai cina dianalisis komponen-komponennya dengan KLT menggunakan fase diam silika gel dan pengembang n-heksan : etil asetat (4:6). Deteksi lebih lanjut menggunakan sinar UV 254 nm, sinar UV 366 nm, dengan penampak bercak  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%,  $\text{FeCl}_3$ , anisaldehyd, dan uap amoniak (Sastrohamidjojo, H, 2007).

### 3.5.4 Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Petai Cina

#### a) Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan disterilkan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan. Cawan petri, batang pengaduk, spatula, tabung reaksi, gelas ukur dibungkus dengan kertas sampul coklat dan disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Untuk alat seperti jarum ose dan batang L disterilkan dengan metode *Flamber*, yaitu direndam dengan alkohol 70% selama 5 menit kemudian dipijarkan dengan api bunsen. Alat yang terbuat dari karet seperti karet pipet, distreilkan dengan merendamnya didalam alkohol 70% selama 5 menit. Laminar air flow disterilkan dengan menyalakan lampu UV selama 2 jam, dibersihkan dari debu disemprot dengan alkohol 70% dibiarkan selama 15 menit (Raihana, 2011).

#### b) Penyiapan Media Agar

Ditimbang seberat 2,94 gram NA dan di masukkan ke dalam erlemeyer, ditambahkan dengan 105 ml aquadest, lalu dipanaskan di atas *hot plate* hingga mendidih sambil di aduk hingga homogen sampai berwarna kuning jernih. Kemudian media disterilisasi dengan dibungkus dengan sampul coklat dan ditutup menggunakan alumunium foil, Larutan media kemudian disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang telah di steril di dinginkan selanjutnya di tuang sebanyak 15 ml ke dalam cawan petri secara aseptis.

#### c) Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Staphylococcus aureus* di ambil menggunakan jarum ose, kemudian di suspensikan dengan larutan NaCl 0,9% steril sebanyak 5 ml kemudian dicampur hingga homongen ditandai dengan cairan berubah menjadi keruh sesuai standar kekeruhan McFarland 0,5 (Ngajow et al, 2013).

#### d) Pembuatan Variasi Konsentrasi

Ekstrak daun petai cina yang di uji untuk menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dibuat dalam beberapa konsentrasi 10% b/v, konsentrasi 20% b/v, konsentrasi 30% b/v, konsentrasi 40% b/v dan konsentrasi 50% b/v. Masing- masing tiap konsentrasi dilarutkan dengan pelarut yang digunakan yaitu dimetil sulfoksida (DMSO) 1 ml. DMSO sebagai kontrol negatif dan ciprofloxacin sebagai kontrol positif.

#### e) Penanaman Bakteri *Staphylococcus aureus*

Kultur murni *Staphylococcus aureus* ditanam menggunakan metode difusi dengan cara cakram. Penanaman bakteri harus dilakukan dalam keadaan aseptis (Handayani *et al.*, 2016).

#### f) Uji Aktifitas Antibakteri

Metode uji antibakteri pada penelitian ini menggunakan metode cakram. Metode cakram kertas yaitu metode dengan menggunakan cakram kertas saring yang mendukung zat antimikroba dengan kekuatan tertentu. Cakram kertas tersebut diletakkan pada permukaan agar yang telah ditanami mikroba uji, lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C, kemudian diameter hambatnya diukur.

#### g) Pembuatan Difusi

Uji mikrobiologis untuk mengetahui efektifitas ekstrak etanol daun petai cina dilakukan dengan metode difusi menggunakan blank discantibiotik (kertas cakram, Dufco). Pengujian dilakukan dengan cara meneteskan ekstrak etanol daun petai cina yang sudah dilarutkan dengan pelarut yang sesuai pada blank discmasing-masing konsentrasi. Kertas cakram kemudian diletakkan diatas media Nutrient Agar yang sudah bercampur dengan bakteri uji, dilakukan secara duplo. Inkubasi selama 24

- 48 jam. Potensi sebagai antimikroba terlihat dengan terbentuknya zona bening disekitar media.

