

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 Tempat Penelitian

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

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, seprangkat alat soxhlet, botol, pinset, jangka sorong, corong, kaca arloji, cawan penguap, spatula, jarum ose, cawan petri, batang pengaduk, kompor listrik, pipet tetes, inkubator, timbangan analitik, tabung reaksi, lampu bunsen, vial, rak tabung reaksi, kapas steril, *waterbath*, *rotary evaporator*, *erlenmayer*, *beaker glass*, *autoclave*, *laminar air flow*.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb.) yang didapatkan dari perkebunan Manoko Bandung dengan dibuat simplisia basah sebanyak 4,5 kg daun pegagan segar dan didapatkan hasil simplisia kering sebanyak 1 kg. *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, pelarut etanol 96%, *n*-Heksana, media nutrient agar (Na), Aquades, NaCl 0,9%, DMSO (Dimetil Sulfoksida), antibiotik tetracycline 500 mg.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Ekstrak Etanol dan *n*-Heksana Daun Pegagan

300 gram daun pegagan yang sudah di keringkan dibungkus menggunakan kertas saring kemudian diikat dengan benang di masukan ke dalam alat soxhlet dan pelarut dimasukan dalam labu soxhlet. Soxhlet dilakukan pada suhu 70°C sampai tetesan tidak berwarna. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian di pekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental etanol dari daun pegagan.

3.3.2 Skrining Fitokimia

Analisis fitokimia merupakan uji kualitatif untuk mengetahui kebenaran golongan senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman pegagan. Analisis fitokimia dilakukan berdasarkan metode Harbone (1987). Identifikasi dilakukan adalah uji tanin, uji flavonoid, uji alkaloid, uji saponin, uji triterpenoid, uji fenolik dan uji steroid. Sampel yang digunakan adalah simpilisa dan ekstrak kental dari daun pegagan. Berikut ini langkah-langkah untuk melakukan skrining fitokimia.

a. Simplisia

1. Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan cara menambahkan lima gram sampel ditambahkan air kemudian dididihkan selama beberapa menit. Disaring dan filtrat ditambahkan dengan 3 tetes FeCl_3 . Warna biru tua atau hitam kehijauan terbentuk menunjukkan adanya tanin.

2. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan 0,5 gram sampel dengan metanol sampai terendam lalu dipanaskan. Filtrat ditambahkan dengan 5 tetes H_2SO_4 terbentuknya warna merah karena penambahan H_2SO_4 menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

3. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara menggerus satu gram sampel dan ditambahkan 1,5 mL kloroform dan 3 tetes amoniak. fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan 5 tetes H_2SO_4 2M Fraksi asam dibagi menjadi 3 tabung kemudian masing-masing ditambahkan pereaksi Dragendorf, Mayer dan Wagner. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada peraksi Mayer, endapan merah pada pereaksi Dragendorf.

4. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara mencampurkan 0,5 gram sampel dengan air secukupnya dan dipanaskan selama lima menit. Larutan tersebut didinginkan kemudian selama dikocok timbulnya busa selama ± 10 menit menunjukkan adanya saponin.

5. Uji Fenolik

Uji fenolik dilakukan dengan cara mengambil 1ml ekstrak dilarutkan dalam etanol dan ditambahkan beberapa tetes $FeCl_3$ 1%. Hasil positif ditandai dengan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam (Wardana *et al.*, 2016).

6. Uji Triterpenoid dan Uji Steroid

Uji triterpenoid dan steroid dilakukan dengan cara ekstrak ditambahkan kloroform kemudian dipanaskan selama 10 menit, setelah panas sampel diletakkan pada plat tetes kemudian ditambahkan pereaksi LB (Asam anhidrat asetat dan H_2SO_4 pekat). Apabila terjadi perubahan warna merah, pink atau violet menandakan ekstrak positif mengandung terpenoid dan apabila warnanya berubah menjadi hijau atau ungu maka sampel dinyatakan positif mengandung steroid (Santoso *et al.*, 2012).

b. Ekstrak

1. Uji Flavonoid

Uji Flavonoid dilakukan dengan cara menimbang ekstrak sampel sebanyak 0,5 g ekstrak daun pegagan kemudian ditambahkan dengan etanol 96% sebanyak 5 ml kemudian disaring dan dipanaskan ± 3 menit. Filtrat ditambahkan dengan 5 tetes H_2SO_4 . Terbentuknya warna merah atau kuning karena penambahan H_2SO_4 menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Harborne, 1987).

2. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara menimbang 0,5 g ekstrak daun pegagan kemudian ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan selama ± 3 menit. Larutan tersebut didinginkan kemudian dikocok selama 10 menit dan bila menimbulkan busa menunjukkan adanya saponin (Harborne, 1987).

3. Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan cara menimbang 0,5 g ekstrak daun pegagan diekstrak menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 5 ml kemudian di saring. Filtrat yang didapat kemudian ditambahkan

beberapa tets FeCl_3 1%. Adanya senyawa tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau, biru atau ungu (Harborne, 1987).

4. Uji fenolik

Uji fenolik dilakukan dengan cara mengambil 1ml ekstrak dilarutkan dalam etanol dan ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Hasil positif ditandai dengan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam (Wardana *et al.*, 2016).

5. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara ekstrak ditambahkan 1,5 ml HCL 2% dan larutan dibagi dalam 2 tabung. Tabung 1 ditambah 2-3 tetes Dragendorf, dan tabung 2 ditambah 2-3 tetes pereaksi mayer. Jika tabung 1 terbentuk endapan jingga atau merah dan pada tabung 2 terbentuk endapan kekuning – kuning menunjukkan adanya alkaloid (Indriyani *et al.*, 2006).

6. Uji Triterpenoid dan Uji Steroid

Uji triterpenoid dan steroid dilakukan dengan cara ekstrak di tambahkan klorofom kemudian dipanaskan selama 10 menit, setelah panas sampel diletakkan pada plat tetes kemudian ditambahkan pereaksi LB (Asam anhidrat asetat dan H_2SO_4 pekat). Apabila terjadi perubahan warna merah, pink atau violet menandakan ekstrak positif mengandung terpenoid dan apabila warnanya berubah menjadi hijau atau ungu maka sampel dinyatakan positif mengandung steroid (Santoso *et al.*, 2012).

3.3.3 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat yang akan digunakan di cuci bersih terlebih dahulu, lalu di keringkan dan bungkus menggunakan kertas berwarna coklat, kemudian lakukan sterilisasi dengan menggunakan *autoclave* selama 15 sampai 30 menit pada suhu 121°C dan untuk alat yang terbuat dari bahan karet disterilkan dengan cara direndam dalam etanol 70%. Simpan alat yang telah di sterilisasi pada *laminar air flow*.

3.3.4 Pembuatan Stok Bakteri

Bakteri dilakukan dengan metode goresan, dengan cara menginokulasikan masing-masing 1 ose biakan murni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* dalam masing – masing tabung reaksi yang berisi agar miring, kemudian di inkubasikan di dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C.

3.3.5 Pembuatan Media Agar

Media ditimbang dan dimasukkan ke dalam *erlenmayer*, larutkan dengan aquades, lalu dipanaskan di atas hot plate hingga mendidih sambil diaduk hingga homogen sampai berwarna kuning jernih. Kemudian media disterilisasi dengan di tutup menggunakan aluminium foil, larutan media kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C. Media yang telah di steril di dinginkan selanjutnya di tuang sebanyak 15 ml ke dalam cawan petri secara aseptis.

3.3.6 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Masukan 5 ml Natrium Chlorida 0,9% (NaCl) ke dalam masing-masing tabung reaksi, ambil bakteri uji yang telah diinokulasikan dengan menggunakan jarum ose steril lalu suspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl 0,9% hingga memperoleh kekeruhan yang sama dengan standar *Mc. Farland* 0,5%.

3.3.7 Pembuatan Stok Konsentrasi

Stok ekstrak daun Pegagan yang di uji untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* di buat dalam beberapa konsentrasi yaitu 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15%, Dimetil Sulfoksida (DMSO) sebagai kontrol negatif dan antibiotik tetracycline sebagai kontrol positif. Untuk konsentrasi 7,5 % di timbang 0,075 g dilarutkan dalam 1 ml DMSO, konsentrasi 10% di timbang 0,1 g dilarutkan dalam 1 ml DMSO, konsentrasi 12,5% di timbang 0,0125 g dilarutkan

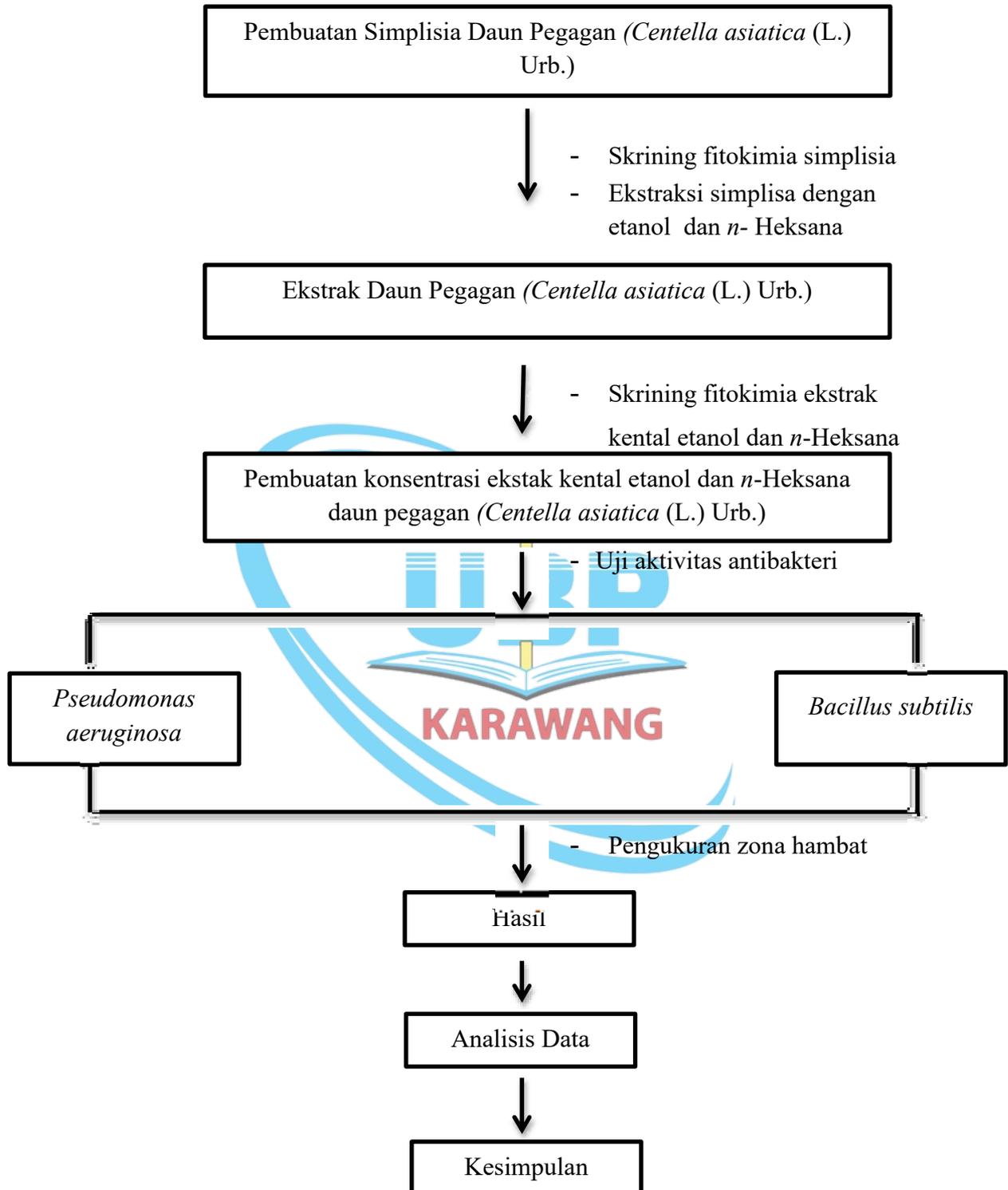
dalam 1 ml DMSO dan untuk konsentrasi 15% di timbang 0,15 g dilarutkan dalam 1 ml DMSO.

3.3.8 Tahap Uji Aktivitas Antimikroba

Metode uji bakteri pada penelitian menggunakan cara metode cakram. Masukkan suspensi bakteri ke dalam media agar yang telah memadat, konsentrasi ekstrak daun Pegagan 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15%, celupkan paper disk ke dalam konsentrasi ekstrak etanol dan n heksan letakan paper disk pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroba uji dengan menggunakan pinset dilakukan dalam *laminar air flow*, lalu media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat jangka sorong.



3.4 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian