

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Analisis ini mengadopsi desain acak lengkap, agar pengaruh variasi konsentrasi ekstrak daun *Begonia heracleifolia* terhadap aktivitas antimikroba terhadap *S. aureus* serta *E.coli* dapat diuji. Ekstraksi dilakukan memakai tiga jenis pelarut organik, dan uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi sumuran atau *hole plate assay*. Proses ekstraksi daun *Begonia heracleifolia* dengan metode maserasi bertingkat. Proses dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dengan pelarut etanol, etil asetat dan n-heksan. Menggunakan ragam konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% dan 3,12% untuk tiap ekstrak daun *Begonia heracleifolia* Schltdl.& Cham.

#### 3.2. Populasi dan Sampel

Bahan-bahan yang digunakan pada analisis yaitu daun *Begonia heracleifolia*. Tanaman ini berasal dari daerah Ciapus, Kampung Cijeruk, Kabupaten Bogor, Provinsi Jawa Barat. Bakteri *S.aureus* serta *E.coli* diperoleh dari Agritama Sinergi Inovasi Lab (AGAVI) di Jl.Sangkuriang No.C-2, Kelurahan Dago, Kecamatan Dago, Kota Bandung, Jawa Barat.

#### 3.3. Alat dan Bahan Penelitian

##### 3.3.1. Alat Penelitian

*Analytic Scales*, wadah maserasi, *aluminium foil*, batang pengaduk, sendok tanduk, *blender*, botol tampung hasil maserasi, cawan porselen, pelat porselen, *test tubes*, erlenmeyer, *beaker glass*, labu ukur, kaca arloji, corong gelas, pipet tetes, pipet mikro, spuit 3 cc, spuit 1 cc, spatula, botol semprot, *waterbath*, *autoclave*, inkubator, *laminar air flow*, cawan petri, Bunsen, lampu spiritus, pinset, jarum ose, pelubang sumuran 4 mm, kertas saring, batang L, rak tabung reaksi, *Fourier*

*Transform Infra Red* (FTIR), kulkas pendingin, sarung tangan, lap dan tisu, masker, jas laboratorium.

### **3.3.2. Bahan Penelitian**

Bahan uji adalah daun *Begonia heracleifolia*, bakteri *S.aureus* dan *E.coli*. pelarut etanol, etil asetat dan n-heksan, aquadest steril, media tanam bakteri MSA (*Mannitol Salt Agar*), NaCl 0,9%, EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*), etanol 70%, bahan penapisan fitokimia adalah gelatin 1%, serbuk magnesium, *NaOH*, *H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*, Pereaksi Meyer, HCl, *FeCl<sub>2</sub>*, *HNO<sub>3</sub>*, Pereaksi Dragendorf.

### 3.4. Variabel Penelitian

Terdapat tiga jenis variabel penelitian:

- Variabel bebas: Konsentrasi ekstrak daun *Begonia heracleifolia*
- Variabel terikat: Diameter zona hambat, yang merupakan respon terhadap perubahan variabel bebas.
- Variabel terkendali: Penyebab lain yang bisa mempengaruhi hasil analisis, seperti jenis pelarut, metode ekstraksi, dan jenis bakteri uji, dijaga konstan.

**Tabel 3.1.** Keterangan Variabel Penelitian

| Jenis Variabel   | Definisi                                                                                                                                              | Alat Ukur                                                                                                                                      | Skala                         | Hasil Ukur                                |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------|
| Variabel Bebas   | Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun <i>Begonia Tapak Hitam</i> terhadap bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> | Penelitian dengan metode difusi sumuran                                                                                                        | Rasio Daya Hambat             | %                                         |
| Variabel Terikat | 1. Skrining Fitokimia ekstrak daun <i>Begonia Tapak Hitam</i><br>2. Konsentrasi Hambat Minimum                                                        | 1. Identifikasi metabolit sekunder : Alkaloid, flavonoid, fenolik, steroid, terpenoid, saponin, dan tannin<br>2. Pengukuran dengan jangka ukur | 1. Panca indera<br>2. Nominal | 1. Positif/Negatif<br>2. Zona Hambat (mm) |

### **3.5. Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1. Determinasi Tanaman**

Dengan melakukan determinasi tanaman, kita dapat memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah spesies yang benar dan bukan spesies lain yang serupa. Hal ini sangat penting untuk menghindari kesalahan interpretasi hasil penelitian. Identifikasi tanaman *Begonia heracleifolia* dilakukan di Departemen Biologi Universitas Padjajaran Bandung.

#### **3.5.2. Preparasi Simplisia**

Daun *Begonia heracleifolia* segar dikumpulkan dan dibersihkan dari semua kotoran yang melekat, kemudian keringkan dengan di simpan dibawah terik matahari dengan ditutup kain hitam selama satu hari. Diambil sebanyak  $\pm 500$  gram simplisia kering.

Simplisia kering dihaluskan dengan blender untuk memperbesar luas permukaan, sehingga senyawa aktif di dalamnya lebih mudah terekstraksi. Serbuk hasil halusan kemudian diayak untuk memperoleh ukuran partikel yang seragam, yaitu 40 mesh. Serbuk yang telah diperoleh diletakkan pada wadah tertutup rapat dengan suhu kamar supaya mencegah terjadinya kontaminasi dan kerusakan senyawa aktif.

#### **3.5.3. Pembuatan Ekstrak**

Metode yang digunakan menurut Hartutiningsih *et al.*, (2009) dan Widyawati *et al.*, (2010) metode maserasi berulang dilakukan pada proses ekstraksi daun *Begonia* dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol. Serbuk daun direndam pada pelarut dengan waktu  $\pm 24$  jam, kemudian disaring. Teknik ini diulang sebanyak tiga kali untuk setiap pelarut. Filtrat hasil penyaringan dikumpulkan dan untuk memperoleh ekstrak kental dilakukan penguapan dengan *rotary evaporator*.

#### 3.5.4. Skrining Fitokimia

Sebagai langkah awal dalam penelitian, dilakukan skrining fitokimia untuk mengidentifikasi keberadaan metabolit sekunder pada bahan alam yang akan diteliti. Skrining ini mencakup berbagai uji, seperti uji flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, polifenol, triterpenoid dan steroid (Abriyani, E., & Fikayuniar, L., 2023).

a. Uji Alkaloid

Analisis alkaloid dengan ditambahkan amonia encer ke dalam mortar, kemudian menambahkan beberapa milliliter kloroform sambil terus digerus. Selanjutnya filtrat dikocok dan disaring dengan HCl 2N. Lapisan asam terbagi menjadi tiga lapisan. Bagian yang kosong adalah bagian pertama dan bagian kedua adalah air yang menetes. Reagen yang digunakan pada bagian kedua adalah Mayer, dan reagen yang digunakan pada bagian ketiga adalah Dragendorf. Pereaksi Mayer menghasilkan residu berwarna putih, sedangkan pereaksi Dragendorf menghasilkan residu berwarna oranye kecoklatan, tanda bahwa adanya alkaloid.

b. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan simplisia dalam mortar yang telah dipanaskan dihaluskan. Kemudian lakukan penyaringan untuk menghasilkan ekstrak. Tempatkan ekstrak dalam *test tube* dan tambahkan bubuk magnesium, larutan amil alkohol. Kemudian dikocok kuat. Filtrat tampak berwarna merah, kuning, atau oranye, menunjukkan adanya flavonoid yang tertarik pada *amyl alcohol*.

c. Uji Saponin

Dengan memanaskan ekstrak simplisia kedalam air, lalu disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian dikocok kuat-kuat. Tanda adanya saponin yaitu terbentuk busa stabil dan tidak hilang saat ditambahkan asam encer.

d. Uji Tannin serta Polifenol

Pengujian tannin dilakukan dengan cara menggerus tannin dalam mortar kemudian memanaskan air diatas penangas. Dilakukan filtrasi hingga didapat filtrat. Kemudian filtrate dibagi menjadi dua bagian. Teteskan reagen  $FeCl_3$  pada bagian pertama sehingga timbul warna biru yang berarti mengandung

tannin dan polifenol. Pada saat yang sama, larutan gelatin 1% ditambahkan ke bagian kedua, dan muncul endapan putih, menunjukkan bahwa mengandung tannin.

e. Uji Steroid dan Triterpenoid

Unsur-unsur tersebut diekstraksi menggunakan dietil eter, kemudian dievaporasi hingga kering. Teteskan reagen *Liebermann-Burchard* pada residunya. Warna ungu yang dihasilkan menunjukkan adanya triterpenoid pada unsur tersebut, warna hijau-biru untuk senyawa steroid.

### 3.5.5. Sterilisasi Alat dan Bahan

Untuk mencegah kontaminasi oleh mikroorganisme, alat-alat yang digunakan disterilkan. Media tanam disterilkan dengan autoklaf (metode panas lembab), agar semua mikroorganisme yang ada di dalamnya mati. Limbah sisa percobaan juga disterilkan sebelum dibuang untuk mencegah penyebaran mikroorganisme.

### 3.5.6. Pembuatan Stok Variabel Konsentrasi

Proses dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dengan pelarut etanol, etil asetat dan n-heksan. Menggunakan variasi konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% dan 3,12% untuk tiap ekstrak daun *Begonia heracleifolia*, digunakan kloramfenikol 10% untuk kontrol positif yang merupakan antibiotik *broad spectrum* yang efektif terhadap bakteri Gram positif serta Gram negatif.

### 3.5.7. Peremajaan Kultur Murni Bakteri Uji

Satu koloni murni bakteri uji dipindahkan ke media NB (*Nutrient Broth*) menggunakan jarum ose steril. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan waktu  $\pm 24$  jam. Setelah inkubasi, dilakukan pengamatan morfologi koloni dan pewarnaan Gram untuk identifikasi bakteri. (Kristanti, M.K., 2014).

### 3.5.8. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri uji berdasarkan Clinical and Laboratory Standard Institute (2017). Kultur murni bakteri yang telah tumbuh pada media NB

selama  $\pm 24$  jam dipindahkan ke dalam larutan NaCl 0,9% dan disuspensikan. Densitas sel bakteri dalam suspensi kemudian diatur hingga setara dengan larutan McFarland 0,5, yang setara dengan sekitar  $0,5 \times 10^8$  CFU/mL.

### 3.5.9. Pembuatan Media

Menurut Rahmawati (2013), media MSA dibuat dengan mencampurkan 10 gram pepton, 10 gram manitol, 15 gram agar, 75 gram natrium klorida, 0,25 gram *phenol red*, dan 500 ml aquadest..

Media EMBA (*Eosine Methylene Blue Agar*) dalam satu liter aquadest memiliki komposisi pepton 10 g, eosin 0,4 g, biru metilen 0,065 g, laktosa 10 g, dipotassium hydrogen phospat 2 g, dan agar 15 g (Rahayu, Nurjanah, dan Komalasari, 2018).

### 3.5.10. Pengujian Antibakteri

Uji daya hambat ekstrak daun *Begonia heracleifolia* Schltdl.& Cham. dilakukan menggunakan difusi sumuran. Media tanam bakteri yang digunakan adalah MSA (*Mannitol Agar Salt*) untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan EMBA (*Eosine Methylene Blue Agar*) untuk bakteri *Escherichia coli*. Daya hambat bakteri diukur memakai jangka sorong, dengan rumus (Kristanti, M.K., 2014) :

$$R (\%) = \frac{d_1 + d_2}{2} \times 100\%$$

Keterangan :

R (%) = Daya Hambat (mm)

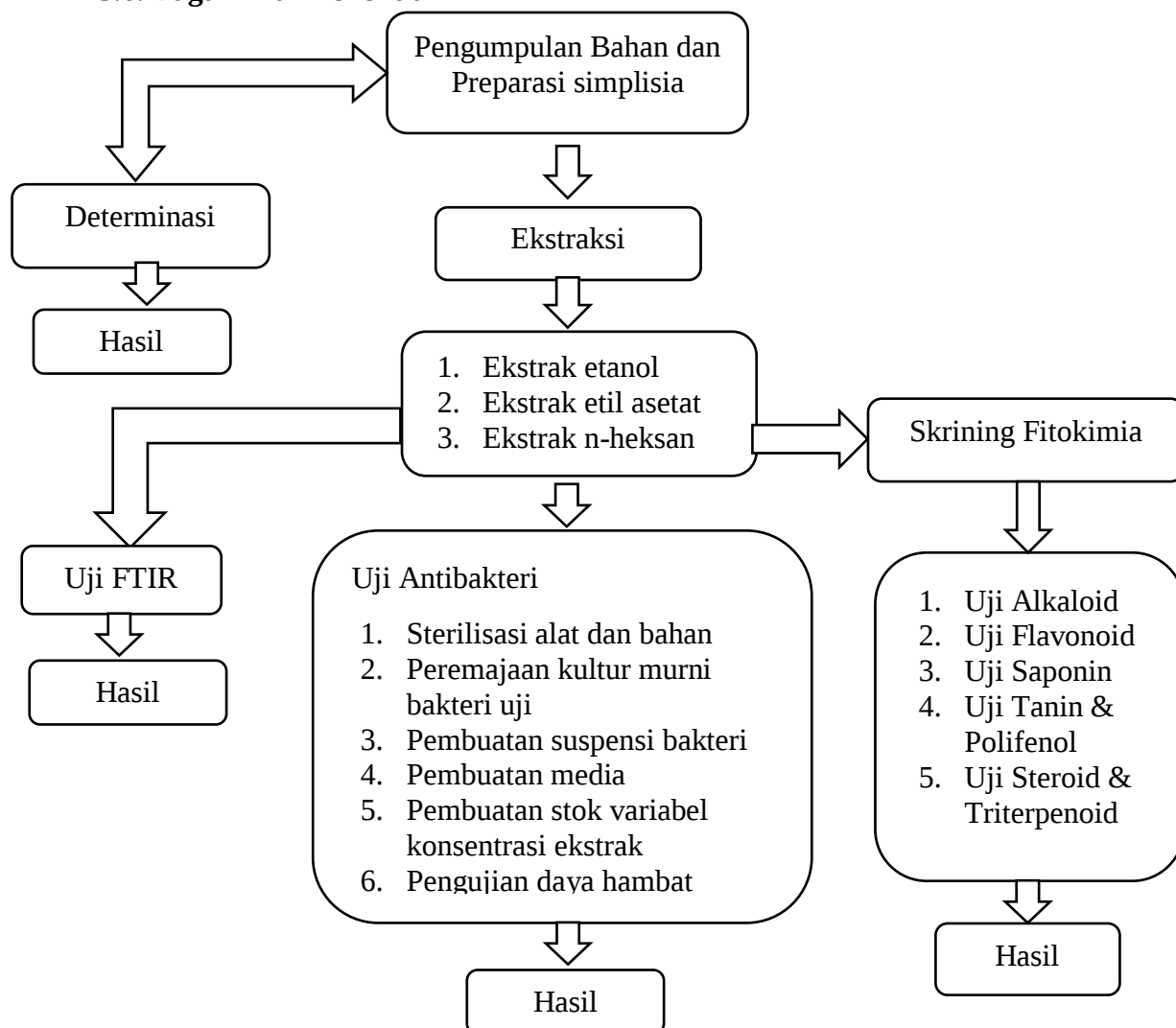
d1 = Diameter Zona Hambat Terpanjang (mm)

d2 = Diameter Zona Hambat Terpendek (mm)

### 3.5.11. Pengujian *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Radiasi inframerah dari sumber cahaya seperti globar atau laser dipisahkan menjadi dua berkas oleh *Interferometer Fourier Transform*. Setelah berinteraksi dengan sampel, kedua berkas digabungkan kembali dan sinyal interferogram yang dihasilkan dideteksi. Transformasi *Fourier* diterapkan pada interferogram untuk menghasilkan spektrum inframerah, yang merepresentasikan vibrasi molekul dalam sampel. (Huda, Nuril., dan Sulistyani, Martin., 2018).

### 3.6. Bagan Alur Penelitian



**Gambar 3.1.** Bagan Alur Penelitian

### 3.7. Analisis Data

Analisa aktivitas antibakteri ekstrak daun Begonia Tapak Hitam (*Begonia heracleifolia*) diolah dengan menggunakan analisa statistik *Two Way ANNOVA* menggunakan program GraphPad PRISM 10. Tujuan dari analisis untuk mengetahui perbedaan signifikan dari rata-rata kelompok.