

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Bahan Penelitian**

Bahan yang di gunakan dalam penelitian ini adalah daun Singkong madinah/Gedi (*Abelmoschus manihot* L.), etanol 96% (BRATACO), etil asetat (BRATACO), n-heksan (BRATACO), aquades, NaCl 0,9%, *Mueller Hinton Agar* (MHA) (OXOID™), klindamisin, Dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck), larutan *Mc Farland* (REMEL), biakan bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 yang diperoleh dari Universitas Indonesia, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, anaerogen (OXOID™).

#### **3.2. Peralatan Penelitian**

Timbangan analitik (ADAM EQUIPMENT™) , toples kaca, autoklaf, inkubator (GEMMYCO), *rotary evaporator* (EYELA), *waterbath* (memmert) *laminar air flow*, *anaerobic jar* (BD BBL™ GasPak™), tabung reaksi (IWAKI), erlenmeyer (PYREX), gelas ukur (PYREX), gelas kimia (IWAKI), batang pengaduk, jarum ose, batang L, pinset, cawan petri, alumunium foil, lampu spiritus, kaca arloji, kompor listrik (MASPION), blender, ayakan mesh 65, corong, pelubang sumuran, mikropipet (*FisherBrand*), jangka sorong (VERNIER CALIPER 6), gunting, sarung tangan, masker.

#### **3.3. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di laboratorium bahan alam, Universitas Buana Perjuangan Karawang dan waktu penelitian terhitung dari bulan Maret 2020.

#### **3.4. Prosedur Percobaan**

##### **3.4.1. Determinasi tanaman**

Tanaman yang di gunakan dalam penelitian ini adalah *Abelmoschus manihot* L., familia *Malvaceae*, yang diambil dari desa Pulo Jaya, kecamatan Lemah Abang, kabupaten Karawang dan telah dideterminasi oleh Institut Teknologi Bandung, agar mendapatkan suatu spesies yang spesifik dan tepat

sasaran. Determinasi merupakan upaya untuk membandingkan suatu tanaman dengan satu tanaman lain yang sudah dikenal sebelumnya (dicocokkan).

### 3.4.2. Pembuatan simplisia

Pembuatan simplisia dilakukan dengan beberapa tahapan sebagai berikut :

#### A. Disortasi basah

Disortasi basah bertujuan untuk memisahkan kotoran atau bahan asing serta bagian tanaman lain yang tidak diinginkan dari bahan simplisia (Ningsih, 2016). Disortasi basah dilakukan dengan memilih daun Gedi yang masih segar dan tidak rusak, serta memisahkannya dari bahan asing yang menempel pada daun.

#### B. Pencucian

Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan kotoran lain yang melekat pada bahan simplisia. Proses ini dilakukan dengan menggunakan air bersih (standar air minum), air dari sumber mata air, air sumur, atau air PDAM (Ningsih, 2016). Pencucian daun Gedi dilakukan dengan mencucinya di bawah air mengalir agar kotoran yang menempel ikut terbawa oleh air.

#### C. Penirisan

Setelah bahan dicuci bersih, dilakukan penirisan pada wadah yang telah diatur sedemikian rupa untuk mencegah pembusukan atau bertambahnya kandungan air. Proses penirisan bertujuan untuk mengurangi atau menghilangkan kandungan air di permukaan bahan dan dilakukan sesegera mungkin setelah pencucian (Ningsih, 2016).

#### D. Perajangan

Perajangan bertujuan untuk memperbaiki penampilan fisik dan memenuhi standar kualitas (terutama keseragaman ukuran) serta meningkatkan kepraktisan dan ketahanan dalam penyimpanan (Ningsih, 2016). Perajangan dilakukan dengan mengiris daun singkong madinah menjadi bagian yang kecil agar memudahkan untuk proses pengeringan dan penggilingan.

#### E. Pengeringan

Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air agar bahan simplisia tidak rusak dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama, menghentikan reaksi enzimatik, dan mencegah pertumbuhan kapang, jamur, dan jasad renik

lain (Ningsih, 2016). Pengeringan dilakukan dengan menjemur daun Gedi dibawah sinar matahari dan dengan cara di angin-anginkan.

### 3.4.3. Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia daun Gedi ditimbang sesuai kebutuhan kemudian dimasukkan ke dalam maserator untuk setiap ekstraksi. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan tiga pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya, yaitu heksana, etil asetat dan etanol 96%. Perbandingan antara bahan dan pelarut adalah 1:5 (w/v) dan masing-masing ekstrak dibiarkan selama 5 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari, masing-masing ekstrak yang dimaserasi tersebut disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 1 dan residu 1. Residu yang ada kemudian ditambahkan pelarut dengan perbandingan 1:3 (w/v) dan dibiarkan selama 2 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 2 hari, masing-masing ekstrak disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 2 dan ampas 2. Filtrat 1 dan 2 dicampur menjadi satu, kemudian filtrat yang diperoleh dari masing-masing ekstrak diuapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental dari masing-masing pelarut. Ekstrak kental yang dihasilkan dibiarkan pada suhu ruangan hingga seluruh pelarut menguap. Ekstrak ditimbang masing-masing 1 gram di buat kosentrasi 100% dengan cara 1 gram ekstrak etanol, etil asetat dan heksana kemudian di tambahkan 1 ml larutan DMSO (Alusinsing, *et al.*, 2017).

### 3.4.4. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian aktivitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, jarum ose dan pinset dibakar dengan pembakaran diatas api langsung dan media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Alusinsing, *et al.*, 2017).

#### 3.4.5. Pembuatan Larutan Uji Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Kontrol positif menggunakan klindamisin dibuat dengan cara menimbang 1 gram klindamisin kemudian dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 1 ml (Hapsari,2018). Sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO.

#### 3.4.6. Pembuatan Media

*Mueller Hinton Agar* ( MHA ) ditimbang sebanyak yang dibutuhkan di larutkan dalam aquadest kemudian dipanaskan di atas kompor listrik sampai mendidih dan diperoleh larutan jernih. Disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Pembuatan media agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri dilakukan melalui tahap berikut : Sebanyak 5 mL media agar dimasukkan kedalam tabung reaksi, dibiarkan dingin dan mengeras pada kemiringan 30°. Bakteri uji diinokulasi pada media agar miring menggunakan jarum ose kemudian dimasukkan kedalam *anaerobic jar*, dimasukkan *gas pack* anaerob, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2x24 jam dalam kondisi anaerob untuk bakteri *Propionibacterium acnes*, sedangkan untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* langsung diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dalam keadaan aerob (Alusinsing, *et al.*, 2017).

#### 3.4.7. Pembuatan Media Suspensi Bakteri

Proses suspensi bakteri menggunakan NaCl 0,9% dengan prosedur kerja sebagai berikut : Disuspensikan bakteri uji dengan larutan NaCl 0,9% sebanyak 3 mL, kemudian suspensi bakteri ini disetarakan kekeruhannya dengan larutan standar *Mc. Farland* 0,5 (diperkirakan  $1,5 \times 10^8$  sel bakteri/ml).

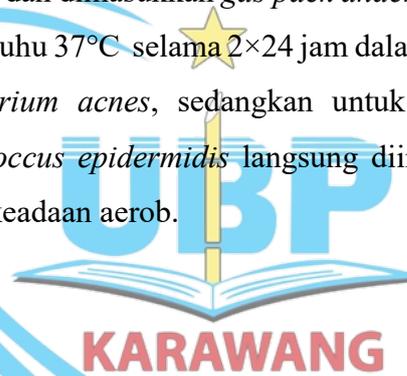
#### 3.4.8. Pembuatan Media Pembenihan

Pembuatan media pembenihan dilakukan dengan cara sebagai berikut: Media agar ditimbang sebanyak yang dibutuhkan dilarutkan dalam aquadest dan dipanaskan diatas kompor listrik sampai mendidih kemudian di sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dituang ke dalam cawan petri (masing-masing cawan petri berisi 15 mL) (Alusinsing, *et al.*, 2017).

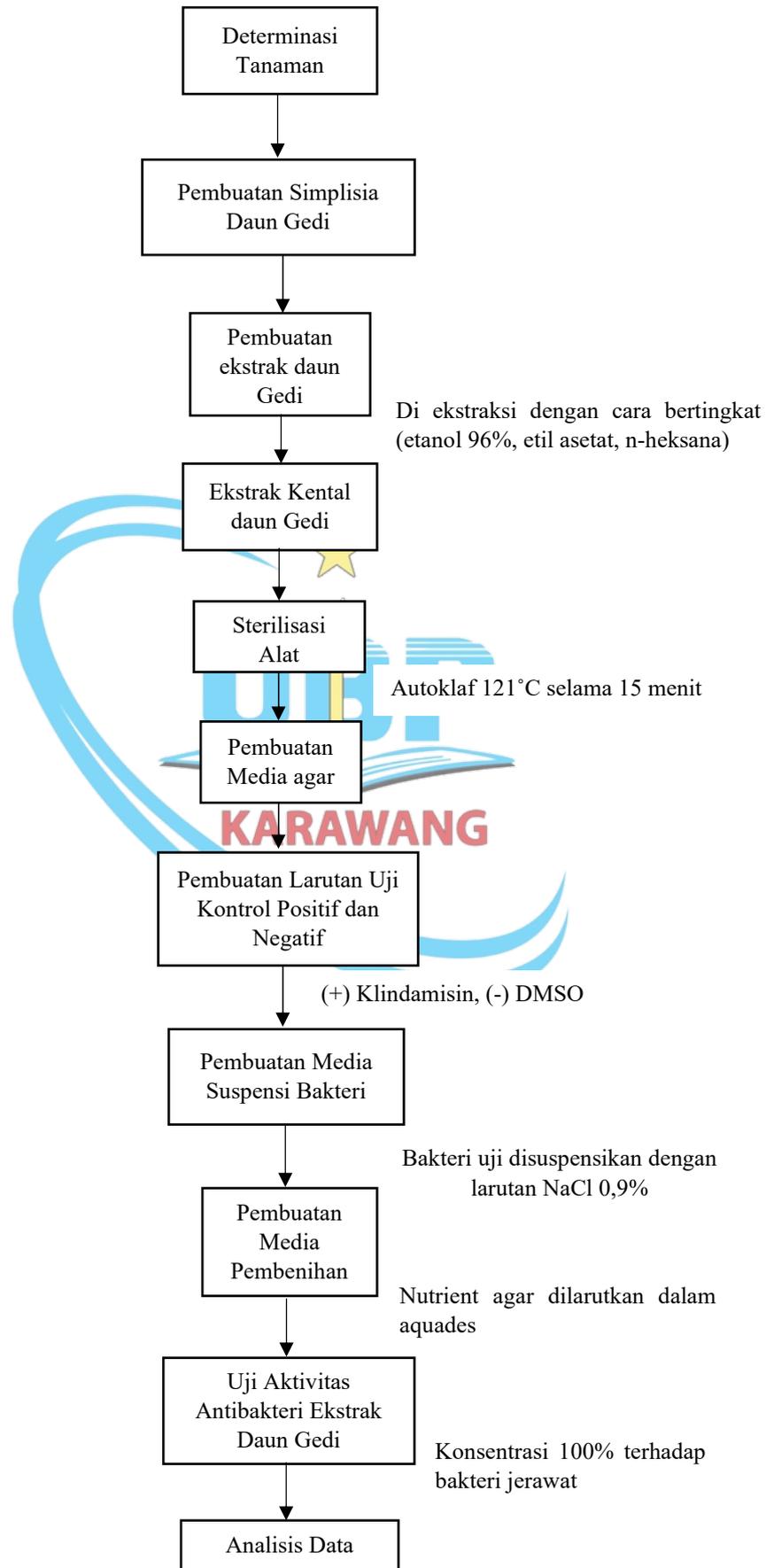
### 3.4.9. Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Gedi

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran (*cup-plate technique*), dengan cara memberikan larutan uji ekstrak daun gedi, dengan pelarut polar, semi polar, non polar serta larutan kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-), dengan prosedur kerja sebagai berikut:

Media agar dituang ke dalam cawan petri sebanyak 15ml dan dibiarkan mengeras. Setelah media agar mengeras kemudian suspensi bakteri disebar diatas media agar, di lubangi dengan pelubang sumuran dengan membagi beberapa bagian cawan petri. Dengan menggunakan mikropipet, masing-masing lubang di teteskan larutan uji ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, ekstrak heksana pada konsentrasi 100%, kontrol positif dan kontrol negatif, setelah itu dimasukkan kedalam *anaerobic jar* dan dimasukkan *gas pack anaerob*, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2×24 jam dalam keadaan anaerob untuk bakteri *Propionibacterium acnes*, sedangkan untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* langsung diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dalam keadaan aerob.



### 3.5. Diagram Alir Penelitian



### 3.6. Analisis Data

Analisis data yang di gunakan adalah analisis statistik menggunakan *Anova One Way* dengan tingkat kepercayaan 95% dan dilakukan tiga kali pengulangan pada setiap ekstrak yang di uji. Pengumpulan data dilakukan dengan mengukur diameter zona bening dari masing-masing pelarut, berdasarkan kepolarannya selama 2×24 jam dalam keadaan anaerob untuk bakteri *Propionibacterium acnes* dan 1x24 jam dalam keadaan aerob untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*.

