

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu Dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan April-Juni 2014 di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat untuk ekstraksi maserasi dan uji fitokimia: Timbangan analitik, oven, blender, *shaker*, *rotary evaporator vakum*, penyaring *buchner*, gelas ukur 10 mL, Erlenmeyer 500 mL, Erlenmeyer 250 mL, *Beaker glass* 100 mL, tabung reaksi, mikro pipet, pengaduk kaca, kertas saring, aluminium foil.

Alat-alat untuk uji antibakteri: Autoklaf, inkubator, LAF, spektrofotometer, lampu bunsen, labu Erlenmeyer 250 mL, cawan petri, tabung reaksi, paper disk, gelas ukur, mikro pipet, pinset, jangka sorong, koloni counter, jarum ose, stirer, kertas label, kapas.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu serbuk daun sisik naga, serbuk daun binahong (diperoleh dari Materia Medika Batu Malang), dan bakteri

*Streptococcus mutans* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Malang). Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi yaitu etanol p.a 70% (Merck). Uji antibakteri menggunakan bahan-bahan sebagai berikut: media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*), media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*), kertas wathman no. 1, aquades, alkohol teknis 70%, spiritus, plastik wrap, tissue, kapas. Uji reagen menggunakan bahan-bahan sebagai berikut: reagen Mayer, reagen Dragendrof, logam Mg, kloroform, HCl pekat, HCl 2N, FeCl<sub>3</sub>.

### **3.3 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini digunakan untuk mempelajari pengaruh jenis tanaman dan konsentrasi ekstrak etanol daun sisik naga dan binahong. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak kelompok (RAK) yang terdiri dari dua faktor yaitu:

Faktor I : Jenis daun (D), terdiri dari:

D1 : Daun sisik naga

D2 : Daun binahong

Faktor II : Konsentrasi ekstrak etanol (K), terdiri dari:

K1 : Konsentrasi ekstrak etanol 100% (b/v)

K2 : Konsentrasi ekstrak etanol 50% (b/v)

K3 : Konsentrasi ekstrak etanol 25% (b/v)

K4 : Konsentrasi ekstrak etanol 12,5% (b/v)

Percobaan diulang 3 kali sehingga terdapat 24 percobaan. Penelitian menggunakan metode dilusi tabung untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan tahap penggoresan pada media BHIA untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

### 3.4 Variabel Penelitian

Variabel-variabel dalam penelitian ini meliputi:

1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% daun sisik naga dan daun binahong dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah tingkat kekeruhan yang dihasilkan pada media BHIB (KHM) dan jumlah koloni bakteri yang dihasilkan pada media BHIA (KBM).

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah variabel yang diusahakan sama untuk setiap perlakuan meliputi, suhu inkubasi, waktu, pH dan media.

### 3.5 Prosedur Kerja

#### 3.5.1 Ekstraksi Etanol 70% Daun Sisik Naga Dan Daun Binahong

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Sebanyak 200 gram serbuk daun sisik naga dan daun binahong yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 500 mL, kemudian digoyang selama satu jam untuk mencapai kondisi homogen dalam *shaker water bath* dengan kecepatan 120 rpm (rotation per minutes) selama 1 jam. Selanjutnya larutan dimaserasi selama 24 jam pada suhu kamar, setelah 24 jam larutan difiltrasi atau dipisahkan dengan menggunakan *penyaring Buchner*. Kemudian residu

penyaringan di angin-anginkan dan dilakukan remaserasi selama 24 jam dan dilakukan sampai 3 kali. Hasil saringan 1-3 dicampur dan dipekatkan dengan *Rotary vakum evaporator* dengan suhu 50°C sampai didapatkan ekstrak pekat, agar ekstrak benar-benar murni dari pelarut maka ekstrak disemprot menggunakan gas N<sub>2</sub>. Ekstrak pekat yang diperoleh digunakan untuk identifikasi golongan senyawa aktif dalam daun sisik naga serta daun binahong dan untuk uji antibakteri (Lampiran 9) (Khunaifi, 2010).

### **3.5.2 Identifikasi Senyawa Aktif Pada Daun Sisik Naga Dan Daun Binahong**

Uji fitokimia kandungan senyawa aktif secara kualitatif. Uji kualitatif dengan uji reagen dari ekstrak etanol daun sisik naga dan daun binahong dilarutkan dengan sedikit pelarut. Kemudian dilakukan uji flavonoid, polifenol, tanin, alkaloid, dan minyak atsiri. Pengujian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.5.2.1 Flavonoid**

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50%. Setelah itu ditambah logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Hasil positif jika terbentuk warna merah atau jingga (Indrayani, 2006).

#### **3.5.2.2 Polifenol**

Dua ratus mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL air lalu dipanaskan selama 10 menit, larutan didinginkan, setelah dingin larutan disaring. Filtrat ditetesi dengan FeCl<sub>3</sub> 1% sebanyak 3 tetes. Lalu diamati perubahan warnanya. Hasil positif polifenol adalah terbentuknya larutan berwarna hijau kehitaman atau biru tua, maka bahan tersebut mengandung polifenol (Khunaifi, 2010).

### 3.5.2.3 Tanin

Ekstrak dipanaskan selama 30 menit lalu disaring, 5 mL filtrat ditambah 1 mL larutan NaCl 2%, jika terjadi endapan disaring dengan kertas saring kemudian ditambah 5 mL larutan gelatin 1%, timbulnya endapan menunjukkan adanya tanin (Wardhani, 2012).

### 3.5.2.4 Alkaloid

Ekstrak sebanyak 0.5 gram ditambahkan 0.5 mL HCl 2%. Larutan dibagi dalam 2 tabung. Tabung 1 ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendrof, tabung 2 ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Terbentuknya endapan jingga pada tabung 1 dan endapan putih pada tabung 2 menunjukkan adanya alkaloid (Indrayani, 2006).

## 3.5.3 Pembuatan Media

### 3.5.3.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan sebelum semua peralatan digunakan, yaitu dengan cara membungkus semua peralatan dengan menggunakan kertas coklat kemudian dimasukkan dalam autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 15 Psi (Per Square Inchi) selama 15 menit. Alat yang tidak tahan panas tinggi disterilisasi dengan alkohol 70 %.

### 3.5.3.2 Media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*)

Prosedur pembuatan media BHIA adalah 4,7 gram bubuk BHIA dan 100 mL aquades steril dicampur dalam tabung Erlenmeyer, diaduk sampai homogen dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Setelah itu dituangkan ke *petridish* dengan ketebalan 2 mm, didiamkan hingga agar BHIA dingin dan

membeku. Uji sterilisasi dilakukan dengan meletakkan dalam inkubator dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37<sup>0</sup>C (Andrianto, 2012).

### **3.5.3.3 Media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*)**

Prosedur pembuatan media BHIB adalah 3 gram bubuk BHIB dan 100 mL aquades steril dicampur dalam tabung Erlenmeyer, diaduk sampai homogen dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37<sup>0</sup>C. Hal ini dilakukan untuk membuktikan bahwa media BHIB dalam keadaan steril sebelum inokulasi (Andrianto, 2012).

### **3.5.4 Regenerasi Bakteri *Streptococcus mutans***

Untuk melakukan peremajaan bakteri *Streptococcus mutans* caranya yaitu dengan memindahkan bibit dari koloni yang lama ke medium yang baru. Bakteri diambil 1 ose kemudian digoreskan pada media BHIA 5 ml dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 18-24 jam (Madani, 2010).

### **3.5.5 Pembuatan Inokulum *Streptococcus mutans***

Biakan murni *Streptococcus mutans* yang telah diremajakan diambil 2 ose lalu disuspensikan dalam 100 mL BHIB kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 24 jam (Madani, 2010).

### **3.5.6 Kurva Standar *Streptococcus mutans***

Inokulum bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diregenerasi dalam Erlenmeyer berisi BHIB, diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Sebanyak 3 mL kultur murni diambil dan dimasukkan ke dalam 12 mL BHIB lalu dihomogenisasi dengan vortex dan dihitung sebagai pengenceran pertama (10<sup>-1</sup>). Sebanyak 3 mL dari

suspensi pengenceran  $10^{-1}$  diambil dan dimasukkan ke dalam 12 mL BHIB lalu dihomogenisasi dengan vortex dan dihitung sebagai pengenceran kedua ( $10^{-2}$ ). Pengenceran terus dilakukan sampai pada pengenceran  $10^{-5}$ . Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm. Sedangkan pengukuran jumlah sel dilakukan dengan menggunakan metode total plate count (TPC). Kemudian masing-masing pengenceran diambil 1 mL kultur bakteri dan diinokulasikan pada media BHIA dengan metode sebar, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan dihitung jumlah selnya.

### **3.5.7 Pembuatan Suspensi *Streptococcus mutans***

Inokulum *Streptococcus mutans* diambil 2 mL, kemudian dimasukkan ke dalam 20 mL media BHIB dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam. Kemudian diukur kekeruhannya pada panjang gelombang 650 nm dan jumlah sel yang digunakan disetarakan dengan  $10^6$  cfu/mL dengan berpedoman pada kurva standar.

### **3.5.8 Uji Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Kertas Cakram**

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan kertas cakram diameter 6 mm. Dimasukkan media BHIA yang masih cair sebanyak 15 mL, dan media dibiarkan memadat pada suhu kamar, kemudian suspensi bakteri digoreskan menggunakan cotton swab, di atas medium BHIA diletakkan kertas cakram steril yang telah direndam dengan ekstrak etanol daun sisik naga dan binahong selama 30 menit. Setelah didiamkan selama 30 menit, cawan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam (Suganda, 2003). Setelah 24 jam diamati ada tidaknya zona bening disekitar kertas cakram. Zona bening yang terbentuk diukur diameternya menggunakan

jangka sorong. Adanya daerah bening di sekeliling cakram kertas menunjukkan adanya aktivitas antibakteri.

**Luas zona hambat = Luas zona bening – Luas kertas cakram**

### **3.5.9 Uji Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum**

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM), dilakukan metode dilusi tabung atau pengenceran dengan melakukan penanaman bakteri pada media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*) pada tabung reaksi (KHM) dan metode dilusi agar dengan melakukan penanaman pada media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*) pada cawan petri (KBM).

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah pengujian untuk menentukan dosis terendah yang dapat membunuh patogen dengan jumlah paling tinggi. Penelitian ini menggunakan metode pengenceran secara bertingkat. Penelitian ini menyiapkan 24 tabung percobaan dan 3 tabung kontrol. Pada tabung kontrol positif diisi dengan 1 mL BHIB dan 1 mL suspensi bakteri dan pada kontrol negatif berisi 1 gr ekstrak daun sisik naga dan binahong dan 1 mL BHIB. Masing-masing tabung diisi 9 mL BHIB steril dan ditambahkan 0,5 mL suspensi bakteri dan 0,5 mL ekstrak etanol daun sisik naga serta binahong sesuai konsentrasi. Diambil 3 mL secara aseptis untuk dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm. Kemudian diinkubasi dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, larutan divortex terlebih dahulu sebelum diukur nilai absorbansinya kembali. KHM ditentukan dengan menghitung OD setelah perlakuan inkubasi dikurangi OD sebelum perlakuan. Apabila terdapat konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan bakteri,

ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan (OD bakteri adalah  $\leq 0$ ), maka didapatkan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) (Arinta, 2012).

Dilanjutkan dengan uji KBM, dilakukan uji lanjutan dengan cara mengambil 1 mL dari konsentrasi yang menunjukkan KHM, ditumbuhkan pada media BHIA secara *pour plate*, lalu diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 24 jam. KBM ditentukan jika setelah diinkubasi tidak terdapat koloni bakteri yang tumbuh pada cawan petri.

### **3.6 Penghitungan Koloni Bakteri secara “Pour Plate” (Menurut Khunaifi, 2010).**

Setelah biakan di inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C lalu dilakukan pengamatan biakan bakteri dan dihitung dengan menggunakan *Colony Counter*. Biakan yang dihitung Diambil koloni yang tumbuh sesuai dengan standar plat count yaitu 30-300 koloni per cawan. Adapun cara menghitung koloni adalah sebagai berikut:

- a. Satu koloni dihitung 1 koloni
- b. Dua koloni yang bertumpuk dihitung 1 koloni
- c. Beberapa koloni yang berhubungan dihitung 1 koloni
- d. Dua koloni yang berhimpitan dan masih dapat dibedakan dihitung 2 koloni
- e. Satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan, dihitung sebagai 1 koloni
- f. Satu koloni yang membentuk satu deretan atau rantai dan terlihat sebagai satu garis tebal dihitung sebagai 1 koloni
- g. Dari hasil penghitungan yang dilakukan, kemudian dihitung jumlah koloni per ml dengan cara sebagai berikut:

$$\text{jumlah koloni} = \text{jumlah koloni tiap cawan} \times \frac{1}{\text{Faktor pengencer}}$$

Faktor pengenceran= pengenceran× jumlah yang diencerkan.

### 3.7 Analisa data

Data yang diperoleh yaitu data konsentrasi ekstrak daun sisik naga dan binahong dan jumlah koloni bakteri. data yang diperoleh diuji distribusi normalnya dengan *Kolmogorov-Smirnov*, jika data berdistribusi normal maka dianalisis menggunakan ANOVA *two way*. Uji ANOVA *two way* digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun sisik naga dan binahong terhadap pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans*. Jika ada pengaruh, maka dilanjutkan dengan menggunakan uji lanjut Uji Jarak Duncan (UJD). Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS *for windows* versi 16.