

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-April 2018. Pengambilan sampel dilakukan di Hutan Kerangas, Desa Air Anyir, Kecamatan Merawang, Kabupaten Bangka. Ekstraksi dan uji fitokimia tumbuhan dilakukan di Laboratorium Dasar, Fakultas Pertanian, Perikanan, dan Biologi Universitas Bangka Belitung. Uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian, Perikanan, dan Biologi Universitas Bangka Belitung.

3.2. Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *autoclave*, *blender*, cawan petri, erlenmayer, gelas beker, gunting, *hot plate*, *incubator*, jangka sorong digital, jarum ose, *Laminar Air Flow* (LAF), kamera (canon PW A2300 HD), mortar dan alu, *microvave*, *orbital shaker*, pembakar spiritus, pengaduk, pinset, pipet tetes, pipet mikro, *soil tester*, spektrofotometer UV-Vis 1800, tabung reaksi, timbangan analitik digital, termohidrometer, thermometer, dan vortex.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah air, akuades, alkohol 70%, amoniak, asam sulfat, CH_3COOH glacial, dietil eter, ekstrak daun tumbuhan pucuk idat, etanol 70%, H_2SO_4 , HCL pekat, isolat bakteri (*Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, dan *Xanthomonas oryzae*), klorafenikol, kertas saring, media *nutrient agar* (NA), Media *Nutrien Broth* (NB), pereaksi dragendorff, *plastic wrap*, dan serbuk Mg.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel daun dilakukan dengan memperhatikan beberapa kriteria, yaitu pucuk p+3 dan daun tidak terserang penyakit. Daun yang telah diambil dimasukkan kedalam kantong plastik, kemudian dibawa ke Laboratorium

Dasar Fakultas Pertanian, Perikanan dan Biologi Universitas Bangka Belitung untuk dilakukan uji lebih lanjut.

3.3.2. Pembuatan Ekstrak

3.3.2.1. Preparasi Ekstrak

Daun tumbuhan pucuk idat yang telah diambil dicuci menggunakan air mengalir dan tiriskan. Daun tersebut dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 40°C selama 5x24 jam atau sampai kering. Daun yang sudah dikeringkan kemudian dihancurkan menggunakan blender (Nuria *et al.* 2009).

3.3.2.2. Ekstrak Kasar Daun Pucuk Idat

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Sampel yang telah kering dan halus, kemudian direndam dengan etanol 70% hingga semua terendam dengan sempurna. Serbuk daun tumbuhan pucuk idat direndam dengan etanol selama 72 jam pada suhu ruang. Hal ini dilakukan untuk melarutkan komponen bioaktif pada daun tersebut. Setelah 72 jam, larutan tersebut difiltrasi dengan menggunakan kertas Whatman. Pelarut diuapkan menggunakan *vaccum rotary evaporator* dengan suhu 70°C untuk menghilangkan pelarut. Menurut Naufalin *et al.* (2005). Rendemen ekstrak dihitung dengan cara berikut:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Kering Sampel}} \times 100\%$$

3.3.3. Analisis Senyawa Antibakteri

Analisis senyawa antibakteri yang dilakukan dalam penelitian ini hanya dilakukan secara kualitatif yaitu mengetahui senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol yang terdapat pada daun tumbuhan.

3.3.3.1. Uji Alkaloid

30 mg ekstrak ditambah 10 mL kloroform-amoniak, kemudian disaring kedalam tabung reaksi. Filtrat ditambahkan dengan 3-5 tetes asam sulfat 2 M dan dikocok hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam (terdapat pada bagian atas) diambil menggunakan pipet kemudian dipindahkan dalam tabung reaksi lain, lalu

ditambahkan dengan 1 pipet pereaksi. Dragendorf (campuran Bi $(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam asam nitrat dan larutan KI). Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga sampai merah coklat pada pereaksi dragendorf.

3.3.3.2. Uji Saponin

30 mg ekstrak diekstraksi dengan 5 mL dietil eter. Fraksi yang tidak larut dalam dietil eter kemudian ditambahkan air sebanyak 5 mL dalam tabung reaksi lalu dikocok. Ekstrak dinyatakan positif mengandung saponin apabila terdapat busa dengan ketinggian 1-3 cm bertahan selama 15 menit.

3.3.3.3. Uji terpenoid dan Steroid

Fraksi larutan dalam dietil eter dari saponin dipisahkan, kemudian ditambahkan dengan CH_3COOH glasial sebanyak 10 tetes dan H_2SO_4 pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan beberapa menit. Triterpenoid memberikan warna merah atau ungu, sedangkan steroid memberikan warna biru atau hijau.

3.3.3.4. Uji Flavonoid

Sebanyak 30 mg ekstrak ditambahkan dengan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan HCl pekat, kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga.

3.3.3.5. Uji Fenol

Sebanyak 30 mg ekstrak ditambahkan 10 tetes FeCl_3 1%. Ekstrak positif mengandung fenol apabila menghasilkan warna hijau, merah, ungu, atau hitam pekat.

3.3.4. Uji Potensi Antibakteri

3.3.3.1. Kurva Pertumbuhan Bakteri

Sebelum melakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri, perlu dilakukan pengukuran kurva pertumbuhan bakteri untuk melihat pertumbuhan optimum bakteri. Penentuan kurva pertumbuhan bakteri dilakukan dengan metode turbidimetri. Sebanyak satu ose bakteri uji ditumbuhkan dalam 50 mL media NB.

Bakteri tersebut dihomogenkan dengan *orbital shaker* selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 125 rpm. Sebanyak 1 mL bakteri yang telah dikocok dengan shaker selama 24 jam dipindahkan kedalam 50 mL media NB steril dan di inkubasi pada suhu 37°C. Sebanyak 5 mL sampel bakteri uji tersebut dimasukan kedalam kuvet. Sebagai blanko digunakan 5 mL media NB steril. Sampel bakteri uji diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 620nm setiap 2 jam sekali mulai jam ke-0 sampai jam ke-12. Absorbansinya dibaca sampai mencapai 0.6-0.8 A (setara dengan konsentrasi 10^6 - 10^8 sel/mL). Bakteri dengan absorbansi 0.6-0.8 A digunakan untuk uji selanjutnya.

3.3.3.2. *Penetapan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)*

Penentuan konsentrasi hambat minimum mengacu pada Junaidi (2013) bertujuan untuk mengetahui kadar terendah dari ekstrak yang memberikan aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji. Metode penetapan yaitu menggunakan metode dilusi agar cair (Junaidi 2013). Ekstrak dibuat dengan rentang konsentrasi yaitu 20mg/mL, 20mg/mL, 40mg/mL, 60mg/mL, 80mg/mL dan 100mg/mL. Ekstrak yang sudah dilarutkan masing-masing diambil 0,5 mL kemudian dimasukan kedalam tabung yang berisi media NB sebanyak 0,9 mL lalu diberi label. Bakteri yang telah berada pada fase optimum dimasukan ke dalam tabung sebanyak 0,1 mL dan dihomogenkan lalu ditutup dengan kapas steril. Bakteri kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Kontrol yang digunakan dalam KHM yaitu media NB steril. Pada tabung yang terlihat keruh menandakan adanya pertumbuhan bakteri. Konsentrasi yang paling rendah yang tidak keruh menandakan konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Hasil konsentrasi hambat minimum yang telah didapatkan, maka uji selanjutnya yaitu dilakukan uji untuk menentukan konsentrasi bunuh minimum bakteri. Uji ini dilakukan dengan mengambil suspensi dari evaluasi KHM dengan mencelupkan suspensi dengan menggunakan jarum ose steril dan digoreskan pada media NA. Media yang berisi suspensi selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Konsentrasi yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri

menandakan bahwa konsentrasi bunuh minimum (KBM), yaitu konsentrasi terkecil yang mampu membunuh bakteri uji.

3.3.3.3. Uji Aktivitas Bakteri (Melki et al. 2011)

Masing-masing sebanyak 1 mL bakteri uji pada pengenceran 10^{-8} dituang kedalam cawan petri, kemudian ditambahkan 20 mL media NA dengan suhu 40°C lalu didinginkan. Kertas cakram direndam dengan ekstrak daun pucuk idat dengan berbagai variasi konsentrasi 20mg/mL, 40mg/mL, 50mg/mL, 60mg/mL, 70mg/mL dan 80mg/mL selama 30 menit. Selanjutnya kertas cakram yang telah dicelupkan kedalam ekstrak diletakan di permukaan agar yang telah terisi bakteri uji. Kertas cakram tersebut ditekan menggunakan pinset steril supaya menempel sempurna pada permukaan agar. Bakteri uji selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengujian dilakukan sebanyak 3x ulangan.

Sebagai kontrol digunakan bakteri uji dengan meletakan daun pucuk idat yang telah dihaluskan dan ditambah air dengan konsentrasi 10-100 mg. sebanyak 1 mL bakteri uji dengan absorbansi 0.6-0.8 A dituang kedalam cawan petri, selanjutnya ditambahkan 20 mL media NA pada suhu 40°C . Selanjutnya kertas cakram yang telah dicelupkan kedalam ekstrak diletakan dipermukaan agar yang telah diisi bakteri uji. Kertas cakram tersebut ditekan menggunakan pinset steril supaya menempel sempurna pada permukaan agar. Bakteri uji selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengujian dilakukan sebanyak 3x ulangan.

Sebagai kontrol negatif, kertas cakram direndam dengan akuades steril selama 15 menit. 1 mL bakteri uji pada fase optimum dituang kedalam cawan petri, kemudian ditambahkan 20 mL media NA dengan suhu 40°C lalu didinginkan, setelah beku kertas cakram yang dicelupkan ke dalam akuades diletakan di permukaan agar yang telah diisi dengan bakteri uji. Bakteri uji selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali ulangan.

3.3.3.4. Pengukuran Diameter pembentukan Zona Bening

Zona bening yang berbentuk ekstrak daun pucuk idat disekitar isolat uji diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong digital.

$$\text{Rumus Diamater Penghambat} = B - A$$

Keterangan:

A : Diameter kertas cakram

B : Diameter zona bening

Kategori zona hambat mengacu pada Sudrajat & Ruga (2012) yaitu :

Tabel 1 Klasifikasi Respon Zona Hambat Bakteri

Diameter Zona Bening	Respon Hambat Pertumbuhan
≥ 5 mm	Lemah
6-10 mm	Sedang
11-10 mm	Kuat
≥ 20 mm	Sangat kuat

3.3.5. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF) dengan 2 faktor perlakuan. Faktor pertama adalah konsentrasi ekstrak daun pucuk idat masing-masing dengan 6 taraf konsentrasi ekstrak daun pucuk idat. Faktor kedua adalah jenis bakteri patogen yang terdiri dari 3 taraf yaitu *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, dan *Xanthomonas Oryzae*. Penelitian dilaksanakan dengan 3 kali ulangan pada masing-masing sampel. Parameter yang diamati adalah pembentukan zona bening. Data kuantitatif dianalisis menggunakan ANOVA. Jika berpengaruh nyata maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Duncan (Gomes 2007).