

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Metode penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental, daun melinjo (*Gnetum gnemon* L) diekstraksi dengan metode maserasi yaitu menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksan. Kemudian hasil dari ekstrak akan diuji aktivitasnya terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi cakram, dimana dalam teknik ini media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri kemudian dimasukan kertas cakram dalam media dan diisi dengan senyawa uji.

#### **B. Lokasi penelitian**

1. Determinasi tanaman akan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).
2. Ekstraksi daun melinjo dan skrining metabolit sekunder dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo.
3. Uji aktivitas antibakteri akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo.
4. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari Bulan November 2022 sampai Januari 2023.

### **C. Subjek Penelitian**

#### 1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun melinjo (*Gnetum gnemon* L) yang berasal dari Kelurahan Gedanganak Kecamatan Ungaran Timur Kabupaten Semarang.

#### 2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun melinjo (*Gnetum gnemon* L) sebanyak 3 kg yang berasal dari Kelurahan Gedanganak Kecamatan Ungaran Timur Kabupaten Semarang.

### **D. Definisi Operasional**

Definisi operasional dalam penelitian ini yaitu,

#### 1. Metode Ekstraksi Maserasi

Metode ekstraksi maserasi merupakan metode paling mudah dan sederhana, cara melakukan maserasi yaitu dengan mencampurkan serbuk simplisia yang direndam dengan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan N-heksan di dalam wadah yang tertutup rapat pada suhu kamar dan selama 3 hari.

#### 2. Ekstrak daun melinjo (*Gnetum gnemon* L)

Ekstrak daun melinjo adalah ekstrak yang didapatkan dari proses maserasi dengan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksan, kemudian dilanjutkan pada proses evaporasi menggunakan evaporator.

### 3. Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri adalah uji yang akan dilakukan dengan sampel ekstrak daun melinjo (*Gnetum gnemon* L) dengan variasi pelarut terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* menggunakan metode difusi cakram dan hasilnya terbentuk zona hambat.

### 4. Etanol 96%

Etanol 96 % adalah senyawa polar yang mudah menguap sehingga baik digunakan sebagai pelarut ekstrak.

### 5. Etil asetat

Etil asetat adalah senyawa organik dengan rumus  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ . Senyawa ini merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Senyawa ini berwujud cairan tidak berwarna dan memiliki aroma khas.

### 6. N-heksan

N-heksan adalah senyawa kimia dengan rumus  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , heksana tidak reaktif dan sering digunakan sebagai pelarut organik yang inert. memiliki titik didih  $60^\circ\text{C}$  dan titik lebur  $-95^\circ\text{C}$  memiliki sifat sangat tidak polar bertujuan untuk memisahkan senyawa senyawa nonpolar seperti steroid dan terpenoid (Pranata dan Marcellia, 2021).

## E. Variabel penelitian

1. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak daun melinjo dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dan 25% dengan menggunakan 3 variasi pelarut yaitu etanol 96%, etil asetat dan n-heksan.

2. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu diameter zona hambat ekstrak daun melinjo (*Gnetum gnemon* L) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*.
3. Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu simplisia daun melinjo (*Gnetum gnemon* L), cara pembuatan ekstrak, pelarut yang digunakan, media pertumbuhan, suhu inkubasi, lama inkubasi, metode pengujian antibakteri.

## **F. Pengumpulan Data**

### **1. Alat penelitian**

#### **a. Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi inkubator (Mettler), LAF (*Laminar Air Flow*) (Airtech), blender ( Philips), *rotary evaporator* (RE200-PRO), batang pengaduk, mikropipet, jangka sorong, alat-alat gelas ( Pyrex/Iwaki), kawat ose, oven (Mettler UN-30), pipet tetes, ayakan 40 mesh, seperangkat alat maserasi (toples kaca), cawan petri, cawan penguap, mikroskop, timbangan analitik (Ohaus), rak tabung reaksi, beker gelas 250 ml (Pyrex), erlenmeyer 250 ml (Pyrex/Iwaki), tabung reaksi (Pyrex) lampu spiritus, kain flanel, kertas hvs, tabung 32 reaksi (pyrex), *blank disc* steril (kertas cakram steril) (Oxioid), labu ukur (Iwaki), autoklaf (Hiramaya), waterbath (Anametri DHH-8) , corong pisah, pinset, dan pisau, hot plate (Maspion S-301).

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi etanol 96%, etil asetat, n-heksan (Toko Kimia Indrasari) bakteri *Staphylococcus epidermidis* (Lab Mikrobiologi RSI Sultan Agung, Semarang), *aluminium foil* (Toko Kimia Indrasari) daun melinjo (*Gnetum gnemon* L), medium *Nutrient Agar* (NA), doksisisiklin disk, aquadest, pereaksi dragendrof, pereaksi mayer, pereaksi  $\text{FeCl}_3$  (besi klorida), plastik wrap,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (asam sulfat), NaCl 0,9%, HCl pekat (asam klorida), cat gram A (kristal violet), serbuk Mg (magnesium), cat gram B (larutan lugol), cat gram C (alkohol aseton), cat gram D (larutan Safranin).

**2. Determinasi tanaman**

Determinasi daun melinjo dilakukan untuk mengetahui keaslian dan kebenaran daun melinjo yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian (Setiawan dan Widiyanto,2018). Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).

**3. Pemanenan Daun Melinjo**

Pemanenan daun melinjo ini dipanen di Kelurahan Gedanganak, Ungaran timur Kabupaten Semarang. Kriteria pemanenan daun melinjo yang dalam penelitian ini adalah daun melinjo muda dan daun melinjo tidak terlalu tua. Setelah pemanenan daun melinjo kemudian dilakukan pembuatan simplisia daun melinjo.

**4. Pembuatan simplisia daun melinjo**

Pembuatan serbuk simplisia dengan cara daun melinjo yang diambil sebanyak 3 kg yang masih segar kemudian dicuci bersih pada air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, kemudian daun melinjo yang sudah dicuci bersih lalu dipotong dan diperkecil ukurannya untuk mempermudah pengeringan. Daun melinjo yang sudah dipotong di dikeringkan dengan cara diangin-anginkan tanpa dikenai sinar matahari langsung. Kemudian dibuat menjadi serbuk dengan blender dan diayak menggunakan ayakan nomor 40 mesh (Rizki *et al.*, 2021).

## 5. Standarisasi simplisia parameter non spesifik

### a. Uji kadar air simplisia dan Ekstrak

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara cawan porselin dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 1 jam dan ditimbang bobotnya. Sampel ditimbang menggunakan neraca analitik 1-2 g dan dimasukkan kedalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Kemudian sampel didinginkan didalam desikator selama 20 menit dan ditimbang bobotnya (Kusmiati *et al.*, 2019).

Rumus % Kadar air sebagai berikut:

$$\text{kadar air}(\%) = \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

a = bobot sampel sebelum pemanasan (gram)

b = bobot sampel setelah pemanasan (gram)

### b. Uji kadar abu simplisia

Sejumlah serbuk simplisia dimasukkan ke dalam krus porselen terlebih dahulu, ditimbang sebanyak 2 g. Cawan yang sudah berisi bubuk dimasukkan ke dalam furnace, perlahan-lahan dipanaskan mulai dari suhu kamar sampai 600°C selama 3 jam. Selanjutnya didinginkan dalam desikator sampai beratnya konstan, kemudian ditimbang bobotnya (Aryani *et al.*, 2019).

Kadar abu total dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{kadar abu (\%)} = \frac{\text{berat abu}}{\text{berat sampel awal}} \times 100\%$$

## 6. Pembuatan ekstrak daun melinjo

Serbuk simplisia daun melinjo diekstraksi dengan cara di maserasi, yaitu dengan cara ditimbang 350 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam masing-masing bejana tertutup (toples kaca), maserasi dilakukan dengan menggunakan tiga pelarut yaitu pelarut etanol 96%, etil asetat, N-heksan (Adiningsih *et al.*, 2021). Pelarut yang digunakan yaitu dengan perbandingan (1: 5). Maserasi dilakukan selama 5 hari dengan pelarut yang digunakan 1.750 mL dan dilanjutkan remaserasi selama 2 hari dengan pelarut sebanyak 1.050 mL (1: 3) (Ramadhani *et al.*, 2020). Maserasi dilakukan pada ruangan yang terlindungi dari cahaya matahari dan dilakukan pengadukan sesering mungkin. Kemudian hasil ekstrak yang diperoleh dari maserat pertama disaring menggunakan kain flanel. Setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dilakukan maserasi. Maserat pertama dan maserat kedua yang telah dikumpulkan, diperoleh

filtrat berupa ekstrak daun melinjo. Kemudian maserat dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 40- 60°C dan uapkan lagi di atas waterbath hingga diperoleh ekstrak kental daun melinjo (Adiningsih *et al.*, 2021).

## 7. Perhitungan nilai rendemen ekstrak

Perhitungan nilai rendemen dilakukan pada masing-masing ekstrak. Rendemen merupakan hasil bagi dari berat produk (ekstrak) yang dihasilkan dibagi dengan berat bahan baku dikalikan dengan 100% (Chairunnisa *et al.*, 2019). Perhitungan nilai rendemen dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendeman} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (gram)}}{\text{Berat sampel awal (gram)}} \times 100\%$$

## 8. Uji bebas etanol

Uji etanol secara kualitatif dilakukan dengan menambahkan 5 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan 2 ml larutan kalium dikromat, adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan adanya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan (Adiningsih *et al.*, 2021).

## 9. Standarisasi Ekstrak Parameter Spesifik

### a. Pengamatan Organoleptik

Pengamatan organoleptik merupakan pengujian dengan menggunakan pancaindera sebagai alat utama untuk mendeskripsikan bentuk, warna, dan bau dari ekstrak daun melinjo pada masing masing pelarut (Aprilia *et al.*, 2021).

### b. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat pada ekstrak daun melinjo (*Gnetum gnemon* L)



dilakukan secara kualitatif meliputi uji flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, steroid dan fenolik.

1) Skrining fitokimia pada ekstrak daun melinjo

a) Uji Flavonoid

Ekstrak daun melinjo ditimbang sebanyak 10 mg masing-masing ekstrak lalu tambahkan serbuk magnesium sebanyak 2 mg dan beri 3 tetes HCl pekat. Terbentuknya perubahan warna merah, kuning atau jingga menandakan reaksi positif terhadap flavonoid (Ramadhani *et al.*,2019).

b) Uji Saponin

Ekstrak daun melinjo masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg, ditambahkan 20 mL air panas. Selanjutnya di kocok kuat selama 10 detik, akan terbentuk buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama 30 menit, dan tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Ramadhani *et al.*,2019).

c) Uji Tanin

Timbang sebanyak 0,5 mL masing-masing ekstrak kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi FeCl<sub>3</sub> 1%. Jika terjadi warna hijau kehitaman, biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Wijayah, 2014)

d) Uji Steroid

Timbang sebanyak 10 mg ekstrak daun melinjo kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi asam asetat anhidrat 2 ml dan 2 ml asam sulfat pekat. Adanya steroid ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kebiruan (Kusmiati *et al.*, 2019).

e) Uji Alkaloid

Masing- Siapkan tiga tabung reaksi, kemudian masukkan 10 mg ekstrak daun melinjo dalam masing-masing tabung. Lalu ditambahkan 10 mL kloroform diaduk rata. Kemudian ditambahkan 1 mL HCl 2N dan dikocok baik-baik, dibiarkan beberapa saat. Kemudian pada tabung pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi mayer membentuk endapan putih menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Pada tabung kedua beri 3 tetes pereaksi bouchardat jika terdapat endapan coklat atau kehitaman menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Pada tabung ketiga tambahkan 3 tetes pereaksi dragendrof jika terdapat endapan jingga atau merah coklat menunjukkan adanya kandungan alkaloid (Syamsul *et al.*, 2016).

f) Uji Fenolik

Ekstrak daun melinjo ditimbang 10 mg, ditambahkan 20 mL air panas dan ditambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$  1% 3 tetes. Hasil

positif apabila terbentuk warna biru kehitaman atau hijau kehitaman (Ramadhani *et al.*,2019).

## **10. Identifikasi bakteri**

Pewarnaan gram pada bakteri ini dilakukan untuk memastikan bahwa yang digunakan untuk uji aktivitas bakteri ini adalah bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Tahap pertama yang dilakukan yaitu kaca objek dibersihkan dengan kapas menggunakan alkohol 96% lalu dikeringkan. Biakan bakteri pada agar miring diambil menggunakan jarum ose steril dan oleskan merata pada kaca objek. Kemudian difiksasi di atas bunsen hingga mengering dengan cara melewatkan kaca objek.

Masing-masing kaca objek yang telah kering, kemudian ditetesi dengan larutan kristal violet dan dibiarkan selama satu menit, selanjutnya dibilas dengan aquades dengan cara memegang kaca obyek pada posisi miring dan dikeringkan dengan kertas tisu secara perlahan-lahan. Tahap kedua, masing-masing objek glass ditetesi dengan larutan lugol 1-2 tetes dan dibiarkan selama satu menit lalu dibilas dengan aquades dan dikeringkan menggunakan tisu. Tahap ketiga masing-masing kaca obyek ditetesi larutan pemucat warna, yaitu alkohol 96% selama 15 detik selanjutnya dicuci dengan larutan aquades dan dikeringkan menggunakan kertas tisu. Langkah yang terakhir, ditetesi larutan safranin diamkan selama 1 menit lalu dicuci dengan aquades dan dikeringkan menggunakan kertas tisu. Kemudian diamati bentuk selnya dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 x. Bakteri dinyatakan bersifat Gram positif apabila

warna selnya ungu dan Gram negatif apabila warna selnya merah (Mudawaroch *et al.*, 2019).

## 11. Sterilisasi Alat

Langkah pertama yang dilakukan yaitu mencuci terlebih dahulu alat yang akan digunakan sampai bersih kemudian dikeringkan. Untuk alat non gelas disterilkan menggunakan autoklaf (autoclave) yang dilengkapi dengan katup pengaman selama 15 menit dengan suhu 121°C. Kemudian untuk alat-alat gelas dibungkus dahulu menggunakan kertas kemudian disterilkan menggunakan oven selama 1-2 jam dengan suhu 180°C (Azizah *et al.*, 2020).

## 12. Pembuatan media

### a. Pembuatan media NA

Nutrien Agar (NA) sebanyak 5 g dilarutkan dalam 250 mL aquades menggunakan Erlenmeyer. Selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama  $\pm$  30 menit sampai kemudian media memadat. Media agar ini digunakan untuk inokulasi bakteri, lapisan dasar, dan lapisan kedua (Somba *et al.*, 2019).

### b. Inokulasi Bakteri

Inokulasi bakteri dilakukan untuk memperbanyak stok bakteri. Penanaman bakteri uji pada media agar miring. Kultur bakteri *Staphylococcus epidermidis* diambil menggunakan jarum ose bundar. Kemudian bakteri digoreskan rapat pada media agar miring secara zig-

zag dari bawah sampai atas. Selanjutnya biakan diinkubator pada suhu 37° C selama 24 jam (Rizki *et al.*, 2021).

c. Pembuatan larutan Mcfarland 0,5

Larutan McFarland 0,5 biasa digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair dengan kepadatan antara  $1 \times 10^7$  sel/ml -  $1 \times 10^8$  sel/ml (Aviany dan Pujianto, 2020). Langkah pembuatan larutan Mcfarland yaitu membuat larutan dengan memasukkan Barium Clorida ( $\text{BaCl}_2$ ) 1% dan membuat larutan dengan memasukkan Asam Sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1% mencampur kedua larutan pada tabung reaksi, dengan perbandingan 0,1 ml  $\text{BaCl}_2$  1% dan 9,9 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1% dan menyimpan larutan dalam ruangan LAF (Qomar *et al.*, 2018).

d. Pembuatan suspensi bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara diambil sebanyak 3 ose bakteri *Staphylococcus epidermidis* dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl fisiologi 0,9%, lalu tabung reaksi dikocok sampai homogen. Kemudian disamakan dengan larutan standar Mc Farland. Jika biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* belum sama dengan larutan pembanding, maka ditambahkan bakteri dengan jarum ose hingga mencapai kekeruhan yang sama (Qomar *et al.*, 2018).

e. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Ekstrak Daun Melinjo

Uji aktivitas antibakteri metode difusi cakram dilakukan menggunakan lima konsentrasi ekstrak daun melinjo, konsentrasi larutan uji yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% (Maulana *et al.*, 2021).

f. Pembuatan larutan uji kontrol positif dan kontrol negatif

Kontrol positif yang digunakan adalah doksisisiklin disk dan kontrol negatif yang digunakan adalah Aquadest steril (Sundu *et al.*, 2018).

g. Perlakuan pengujian

Media agar pada cawan petri yang telah memadat kemudian dioleskan suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* secara merata di permukaan NA menggunakan metode *spread plate* dengan kapas lidi steril. Tahap selanjutnya adalah merendam paper disk pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun melinjo pada variasi pelarut, kontrol positif dan kontrol negatif selama 15 menit (Sogandi & Rizky, 2018). Kemudian paper disk tersebut diletakkan di atas media agar yang telah diolesi *Staphylococcus epidermidis* dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Setelah itu cawan petri ditutup, kemudian panaskan sisi cawan diatas api bunsen dengan memutar-mutar agar cawan petri lebih steril. Tutup bagian tepi cawan petri menggunakan plastik wrap dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam dengan posisi tutup cawan petri terbalik (Ugha *et al.*, 2019).

h. Pengamatan hasil aktivitas antibakteri

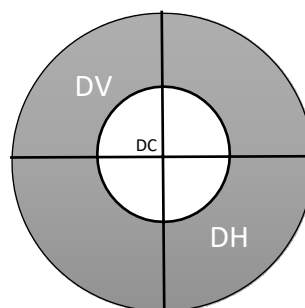
Pengamatan dilakukan setelah 24 jam masa inkubasi. Zona bening sekitar cakram merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji dan dinyatakan dengan luas zona hambat (Toy *et al.*,2015).

Langkah pengamatan antibakteri adalah sebagai berikut.

- 1) Meletakkan cawan petri secara berurutan di atas meja sesuai dengan perlakuannya
- 2) Meletakkan cawan petri secara terbalik dna tutup cawan petri tidak terbuka.
- 3) Mengukur diameter zona hambat yang muncul pada masing-masing perlakuan dengan menggunakan jangka sorong menggunakan satuan milimeter (Agustin *et al.*, 2019).

Diameter zona hambat diukur dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{(DV - DC) + (DH - DC)}{2}$$



Keterangan :

 : Zona hambat

L = Luas zona hambat

DV = Diameter vertikal

DH = Diameter horizontal

DC = Diameter cakram (Toy *et al.*,2015).

## G. Analisis Data

Data diameter zona hambat yang terbentuk, dianalisa dengan SPSS for windows. Data yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri ekstrak daun melinjo pada masing-masing pelarut kemudian dianalisis menggunakan program SPSS dan didapatkan hasil sebagai berikut: Langkah pertama yakni melakukan uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis berdistribusi normal atau tidak (Anderha & Maskar, 2021). Uji normalitas dalam penelitian ini menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dikarenakan data yang digunakan kurang dari 50 yaitu 3 kali replikasi dengan taraf uji signifikansi 5% atau 0,05 (Sabilillah *et al.*, 2016). Bila signifikansi pada *p-value* hasilnya  $<0,05$  maka  $H_0$  ditolak begitu sebaliknya bila hasil *p-value*  $>0,05$  atau sama dengan 0,05 maka  $H_0$  diterima (Gaspersz& Salamor, 2021). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data yang digunakan dalam analisis telah homogen atau tidak. Uji homogenitas ini dilakukan menggunakan uji *Levene*, jika *p-value* menunjukkan hasil  $<0,05$  maka  $H_0$  ditolak atau data tidak terdistribusi homogen (Rosidah *et al.*, 2014).

Hasil data yang telah terdistribusi normal dan homogen selanjutnyadiuji *One Way Anova*. Jika nilai signifikan yang didapatkan  $>0,05$  maka menerima  $H_0$  dan menolak  $H_1$  (Rojihah *et al.*, 2015). Untuk uji akhir analisis dilakukan dengan uji *T-Test*, uji ini menggunakan satu objek penelitian dengan



menggunakan dua atau lebih perlakuan yang berbeda (Hastuti, 2012) atau dua data berpasangan. Uji ini dilakukan untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna antara sampel ekstrak etanol 96%, etil asetat dan n-heksan dengan hipotesis bila nilai *p-value* >0,05 maka menerima H<sub>0</sub> atau tidak ada perbedaan yang bermakna (Patar *et al.*, 2015).