

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Penelitian eksperimental merupakan pengujian yang dilakukan untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang disebabkan oleh suatu faktor atau perlakuan. Dalam hal ini dapat diketahui aktivitas antibakteri terhadap ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz). Metode ekstraksi yang digunakan metode refluks dengan pelarut etanol dan n-heksan untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak daun singkong menggunakan metode difusi cakram.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Pembuatan simplisia dilakukan di Banyubiru, Kabupaten Semarang.
- b. Determinasi tanaman dilakukan di Universitas Diponegoro Semarang tepatnya di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika.
- c. Pembuatan ekstrak dan uji senyawa metabolit sekunder dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Program Studi Universitas Ngudi Waluyo.

d. Uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan Di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu Penelitian

Proses penelitian ini dilaksanakan dari bulan November 2023 sampai Februari 2024.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang dipanen dari Kecamatan Banyubiru, Kabupaten Semarang.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian atau wakil yang memiliki karakteristik representasi dari populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) sebanyak 2,5 kg.

D. Definisi Operasional

1. Simplisia Daun Singkong

Simplisia daun singkong adalah simplisia yang diperoleh asal Kecamatan Banyubiru yang di proses menggunakan panas sinar matahari tidak langsung yaitu dengan cara ditutup kain hitam.

2. Konsentrasi Ekstrak

Konsentrasi ekstrak etanol dan n-heksan daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) adalah 5%, 10%, dan 15%.

3. Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Cakram

Aktivitas metode difusi cakram dilakukan untuk menentukan zona hambat atau bening terhadap bakteri yang diujikan yaitu *Staphylococcus aureus* dari ekstrak etanol dan n-heksan dengan kertas cakram yang sudah berisi antibakteri (ekstrak) kemudian dihitung diameter zona bening di sekitar disk. Kontrol positif yang digunakan amoksisilin dan kontrol negatif yang digunakan DMSO 10%.

4. Zona Hambat

Zona hambat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri ditandai dengan zona bening di sekitar media NA yang telah diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu luas zona hambat di sekitar disk pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah blender, ayakan, set alat refluks, kertas saring, batang pengaduk, beaker gelas (Iwaki), cawan porselin, timbangan analitik (Ohaus), gelas ukur (Iwaki), Erlenmeyer (Iwaki), alat *refluks*, *water bath*, pipet volume, gunting / pisau, pipet tetes, aluminium foil, pinset, spidol, kertas label, corong (Iwaki), jas lab, handscoon, masker, sendok tanduk, batang pengaduk, mikropipet (Socorex), blank disk, amoksisilin disk (Oxoid), jangka sorong, bunsen dan spiritus, kapas, tisu, kassa steril, autoklaf (Hirayama), oven (Binder), inkubator (Memmert), lemari pendingin (Modena), tabung reaksi (Iwaki), penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose bulat, cawan petri, kompor dan panci, *magnetic stirrer* (Thermo cimarec), *vortex* (Dlab), *densitometer* DEN 18 (Biosan), mikroskop (Hiclave), Objek gelas.

b. Bahan

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz), etanol 96%, n-heksan, Disk

Amoksisilin, DMSO, suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* resisten terhadap antibiotik, aquadest, media *Nutrient Agar* (NA), pereaksi Meyer, Dragendorff, Besi (III) klorida 1%, serbuk Mg, aquadest, HCL 2N, Kloroform, asam asetat.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan dan mengetahui daun yang digunakan benar-benar dari daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dan identitas daun singkong yang akan digunakan sebagai bahan uji dalam penelitian. Determinasi dilakukan di Universitas Diponegoro Semarang tepatnya di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika.

3. Pemanenan Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

Pemanenan daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dilakukan di Kecamatan Banyubiru, dan dipanen pada saat pagi hari. Kriteria yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

Sampel yang digunakan sebagai objek penelitian adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang dihasilkan dari Kecamatan Banyubiru, Jawa Tengah. Kriteria lain yang harus dipenuhi supaya dapat memaksimalkan hasil penelitian adalah daun singkong yang masih muda dengan daun yang utuh.

b. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dalam pemilihan sampel adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang muda dengan noda bercak hitam atau coklat, tidak utuh (dimakan ulat atau serangga lainnya).

4. Pembuatan Simplisia Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

Daun singkong yang digunakan merupakan daun yang muda dan tanpa bercak hitam atau coklat. Setelah daun singkong dipanen dan tanpa bercak hitam atau coklat. Setelah daun singkong dipanen dan dikumpulkan kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir lalu dilakukan sortasi basah dan ditiriskan. Setelah kering daun singkong dirajang tipis untuk memudahkan proses pengeringan dengan metode pengeringan matahari tidak langsung, yaitu dengan cara daun singkong ditutup menggunakan kain hitam.

Simplisia yang sudah melalui proses pengeringan kemudian dilakukan sortasi kering untuk memisahkan kotoran dengan sampel dan dilakukan uji kadar air. Setelah sortasi kering dilakukan proses selanjutnya yaitu penghalusan sampel daun singkong dengan cara diblender, setelah halus sampel daun singkong disaring atau diayak menggunakan ayakan, dan hasil ayakan kemudian ditimbang.

5. Pembuatan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang sudah menjadi serbuk kemudian ditimbang sebanyak 300 gram dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Ekstrak dibuat dengan cara refluks (ekstraksi

panas), yaitu dengan merendam menambahkan pelarut etanol sebanyak 600 ml. Menyusun atau merangkai alat refluks kemudian sampel serbuk daun singkong diekstraksi pada suhu 50°C selama 3 jam. Pelarut n-heksan, ditimbang sebanyak 300 gram serbuk simplisia ditambahkan pelarut 600 ml n-heksan. Kemudian larutan etanol dan n-heksan yang sudah selesai, masing-masing disaring menggunakan kain kasa, selanjutnya dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan hasil penyaringan diuapkan diatas waterbath hingga terbentuk ekstrak kental.

6. Uji Kadar Air Simplisia

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara cawan porselin dioven pada suhu 105°C selama 1 jam, kemudian ditimbang, selanjutnya meletakkan 2 gram ekstrak daun singkong ke dalam cawan yang sudah ditimbang. Ekstrak daun singkong kemudian dipanaskan dalam oven dengan suhu $\pm 105^\circ\text{C}$ selama 3 jam. Setelah dipanaskan wadah kemudian ditimbang hingga mencapai berat konstan (Srikandi, 2020), kadar air dikatakan memenuhi syarat apabila tidak lebih dari 10% (FHI, 2017).

Uji kadar air dapat dihitung menggunakan rumus:

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

Keterangan:

a = Berat sampel sebelum dikeringkan

b = Berat sampel sesudah dikeringkan

7. Perhitungan Nilai Rendemen Ekstrak

Hasil perhitungan rendemen pada ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dibagi dengan berat bahan yang digunakan, kemudian hasil dikalikan 100%.

Rendemen ekstrak dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak (gram)}}{\text{Berat Serbuk Kering (gram)}} \times 100\%$$

8. Uji Kadar Air Ekstrak

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara cawan porselin dioven pada suhu 105°C selama 1 jam, kemudian ditimbang, selanjutnya meletakkan 2 gram ekstrak daun singkong ke dalam cawan yang sudah ditimbang. Ekstrak daun singkong kemudian dipanaskan dalam oven dengan suhu $\pm 105^\circ\text{C}$ selama 3 jam. Setelah dipanaskan wadah kemudian ditimbang hingga mencapai berat konstan (Srikandi, 2020), kadar air dikatakan memenuhi syarat apabila tidak lebih dari 10% (FHI, 2017).

Uji kadar air dapat dihitung menggunakan rumus:

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

Keterangan:

a = Berat sampel sebelum dikeringkan

b = Berat sampel sesudah dikeringkan

9. Uji Bebas Pelarut

Ekstrak yang sudah mengental diambil dan ditambahkan dengan 1 ml kalium Dikromat ($K_2Cr_2O_7$), kemudian ditambahkan dengan 3 tetes asam sulfat pekat (H_2SO_4). Perubahan warna diamati jika hasil uji menunjukkan warna coklat maka ekstrak tidak mengandung senyawa etanol (Astutik, 2021).

Uji bebas pelarut n-heksan dilakukan dengan cara 2 tetes ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu dibakar. Dikatakan bebas n-heksan apabila tidak ada api dan asap yang terbentuk, tetapi jika ada api dan asap maka ekstrak perlu diuapkan (Mahdalena *et al.*, 2023).

10. Skrining Fitokimia Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

a. Uji Alkaloid

Timbang 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 1 ml HCL 2 N ditambah 9 ml aquades, dipanaskan, didinginkan, disaring dimasukkan dalam beker gelas. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian secara merata, dimasukkan kedalam tabung reaksi. Bagian 1 ditambahkan 2-3 tetes pereaksi meyer, bagian 2 ditambahkan 2-3 tetes pereaksi dragendorff, bagian 3 sebagai blangko. Jika sampel positif mengandung alkaloid maka akan menghasilkan endapan atau larutan berubah menjadi keruh, untuk pereaksi meyer, dan akan menghasilkan endapan merah bata atau jingga untuk pereaksi dragendorff (Julianto, 2019).

b. Uji Flavonoid

Sebanyak 1 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 ml aquadest dalam beaker gelas, dipanaskan diatas penangas air menggunakan penjepit sekitar 5 menit, kemudian disaring. Ambil 5 ml filtrat kemudian ditambahkan 0,5 ml serbuk magnesium dan HCL pekat, kemudian dikocok. Jika menghasilkan perubahan warna merah, kuning, atau jingga maka menunjukkan hasil positif ekstrak mengandung flavonoid (Julianto, 2019).

c. Uji Tanin

Sebanyak 1 gram ekstrak ditambah 5 ml aquadest di dalam beaker gelas, kemudian dipanaskan dan disaring. Ambil filtrat sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl_3 1%. Jika menghasilkan perubahan warna hijau biru, ungu atau hitam pekat maka menunjukkan hasil positif ekstrak mengandung tanin (Julianto, 2019).

d. Uji Saponin

Mengambil 1 gram ekstrak yang ditambah 10 ml aquades dimasukkan ke dalam beaker gelas, dipanaskan sampai mendidih dan disaring diambil filtratnya. Setelah dingin filtrat diambil sebanyak 10 tetes dikocok kuat kuat secara vertikal selama 15 menit hingga berbusa, kemudian ditambahkan 1 tetes HCL 2N jika busa tidak hilang maka ekstrak mengandung saponin (Julianto, 2019).

11. Identifikasi Bakteri

Mengambil NaCl fisiologis kemudian diteteskan ke dalam objek gelas dan dikeringkan, ose disterilkan dengan bunsen dan mengambil satu ose biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, letakkan bakteri pada objek gelas. Teteskan pewarnaan gram crystal violet kedalam objek glass tunggu selama 2 menit setelah itu warna dilunturkan menggunakan aquadest mengalir, teteskan lugol selama 1 menit lunturkan dengan alkohol 95% selama 1 menit, jika sudah 1 menit alkohol dilunturkan menggunakan aquadest mengalir, teteskan safranin selama 2 menit. Kemudian preparat dicuci menggunakan aquades mengalir dan dikeringkan dan diamati morfologi serta warna selnya di bawah mikroskop. Bakteri dikelompokkan menjadi gram positif jika selnya berwarna ungu dan gram negatif jika selnya berwarna merah (Dewi, 2013).

12. Sterilisasi Alat

Sebelum melakukan uji aktivitas antibakteri semua alat yang digunakan seperti cawan petri, batang pengaduk, gelas ukur, pinset, dan lain-lain disterilisasi menggunakan oven dengan suhu 160°C-180°C selama 1-3 jam. Dengan cara membungkus alat yang akan disterilkan menggunakan kertas.

13. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Media NA dibuat dengan cara menimbang sejumlah 6 gram kemudian dilarutkan ke dalam 300 ml aquades di Erlenmeyer lalu dipanaskan di atas *hot plate* dan *magnetic stirrer* hingga homogen. Media NA agar akan berwarna kuning ketika larutan tersebut larut dengan sempurna. Selanjutnya media dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama kurang lebih 15 menit dengan tekanan 1,5 ATM (Suryadi *et al.*, 2018).

14. Inokulasi Bakteri

Proses inokulasi bakteri dapat dimulai dengan cara membuat agar miring, kemudian mengambil 1 ose bakteri *Staphylococcus aureus* resisten digoreskan pada media agar miring NA yang berbeda secara zig zag. Pekerjaan ini dilakukan secara aseptis dekat dengan api Bunsen. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah bakteri tumbuh yang ditandai dengan adanya bercak putih pada media kemudian disimpan pada lemari pendingin (Misna, 2018).

15. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Kultur *Staphylococcus aureus* yang telah diinokulasi diambil sebanyak 1 jarum ose, kemudian disuspensikan pada dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan MCFarland 0,5 (Misna, 2018).

16. Pembuatan Larutan Kontrol dan Uji

a. Pembuatan Kontrol Negatif

Pembuatan kontrol negatif dibuat dengan cara melarutkan DMSO 10% dengan mengambil 1 ml DMSO 100% dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 10 ml.

b. Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan uji ekstrak etanol dan n-heksan dibuat dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15% dengan cara menimbang masing-masing konsentrasi yaitu 5% = 500 mg / 10 ml DMSO, 10% = 1.000 mg / 10 ml DMSO, dan 15% = 1.500 mg / 10 ml DMSO dengan mengencerkan ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang telah ditimbang dilarutkan dalam 10 ml larutan DMSO 100%.

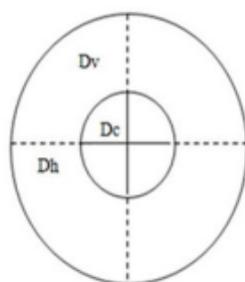
17. Pengujian Aktivitas Antibakteri Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) Metode Difusi cakram

Metode difusi cakram dilakukan dengan cara mengambil 1 ml suspensi bakteri uji kemudian ditambahkan media NA secara merata dengan cara dihomogenkan dengan cara cawan petri diletakkan diatas meja steril diputar membentuk angka delapan. Tunggu hingga media memadat. Merendam paper disk yang terdiri dari ekstrak etanol 96% dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15%, ekstrak n-heksan dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15%, kontrol positif (Disk Amoksisilin) dan kontrol negatif (DMSO 10%). Masukkan masing masing konsentrasi ekstrak etanol dan n-

heksan, kontrol positif dan negatif ke dalam media yang sudah memadat. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam ke dalam inkubator. Kemudian diamati zona bening atau jernih yang terdapat disekitar paper disk dengan zona reader atau jangka sorong (Ningsih *et al.*, 2023).

Pada pengukuran zona hambat diukur menggunakan jangka sorong yang diperoleh dengan diameter berupa (cm) didaerah pertumbuhan mikroba termasuk diameter kertas cakram. Untuk mendapatkan hasil data yang akurat setiap konsentrasi dan kontrol positif diukur sebanyak 3 kali, kemudian dibandingkan dengan kontrol positif.

Rumus perhitungan diameter zona hambat:



$$\frac{(Dv - Dc) + (Dh - Dc)}{2}$$

Keterangan:

Dv = Diameter Vertikal

Dh = Diameter Horizontal

Dc= Diameter cakram

G. Pengolahan Data

Metode analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu deskriptif, yang bertujuan untuk menganalisis data secara mendeskripsikan data yang telah diperoleh (Anggita & Masturoh, 2018). Data yang telah didapatkan pada penelitian ini adalah data kuantitatif. Data kuantitatif berupa Zona Hambat yaitu dengan melihat konsentrasi terendah yang menunjukkan zona bening disekitar disk pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

H. Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dilakukan pengujian normalitas dan homogenitas menggunakan software SPSS versi 26 untuk melihat data yang didapatkan memiliki perbedaan yang signifikan atau tidak. Jika $P > 0,05$ maka data terdistribusi secara normal dan homogen sehingga dapat dilakukan uji lanjutan dengan uji One Way Anova dan uji T-Test. Jika $P < 0,05$ maka data tidak terdistribusi secara normal dan dilakukan uji lanjutan dengan uji nonparametrik Kruskal Wallis dan Mann-Whitney, untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan signifikan dari data yang dihasilkan.