

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium yaitu untuk menentukan perbedaan pelarut pengestraksi daun afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) terhadap daya hambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian
 - a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik MIPA di Universitas Diponegoro Semarang
 - b. Pembuatan ekstrak daun afrika dari senyawa pelarut dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
2. Waktu penelitian
 - a. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari - Februari 2020

C. Subjek Penelitian

1. Populasi dalam penelitian adalah perbedaan pelarut pengestraksi daun afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) terhadap daya hambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*..
2. Sampel dalam penelitian adalah ekstrak daun afrika dengan perbedaan kepolaran pelarut (n-Heksan, etil asetat, etanol).

D. Definisi Operasional

1. Variabel bebas

Konsentrasi 20% b/v, 30% b/v, 40% b/v perbedaan aktivitas antibakteri ekstrak n-Heksan, etil asetat, etanol 70% daun afrika dengan metode difusi cakram.

2. Variabel Tergantung

Variabel pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak n-Heksan, etil asetat, etanol 70% daun afrika dilihat dari diameter zona hambat yang ditandai dengan adanya daerah bening disekeliling cakram.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol adalah variabel yang dapat mempengaruhi hubungan antara variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah didapatkan dari daerah yang sama, waktu, dan suhu.

E. Pengumpulan Data

1. Alat penelitian : waterbath (Mettler), oven (Mettler), rotary evaporator (Eyela), autoclave (All American), inkubator, laminar air flow (CV Quadrant), batang pengaduk, rak tabung reaksi, gelas ukur (Pirex), cawan petri, erlenmeyer, beaker glass, jarum ose, labu takar, kertas cakram, lampu spiritus, kaki tiga, kawat kasa, cawan penguap.
2. Bahan penelitian : Ekstrak Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*), etil asetat, n-Heksan, dan etanol 70%, media NA (Nutrien Agar), ciprofloxacin, Bakteri gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*, aquadest steril.

3. Prosedur Penelitian

a. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biositematik Fakultas Sains dan Matematika Program Studi Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

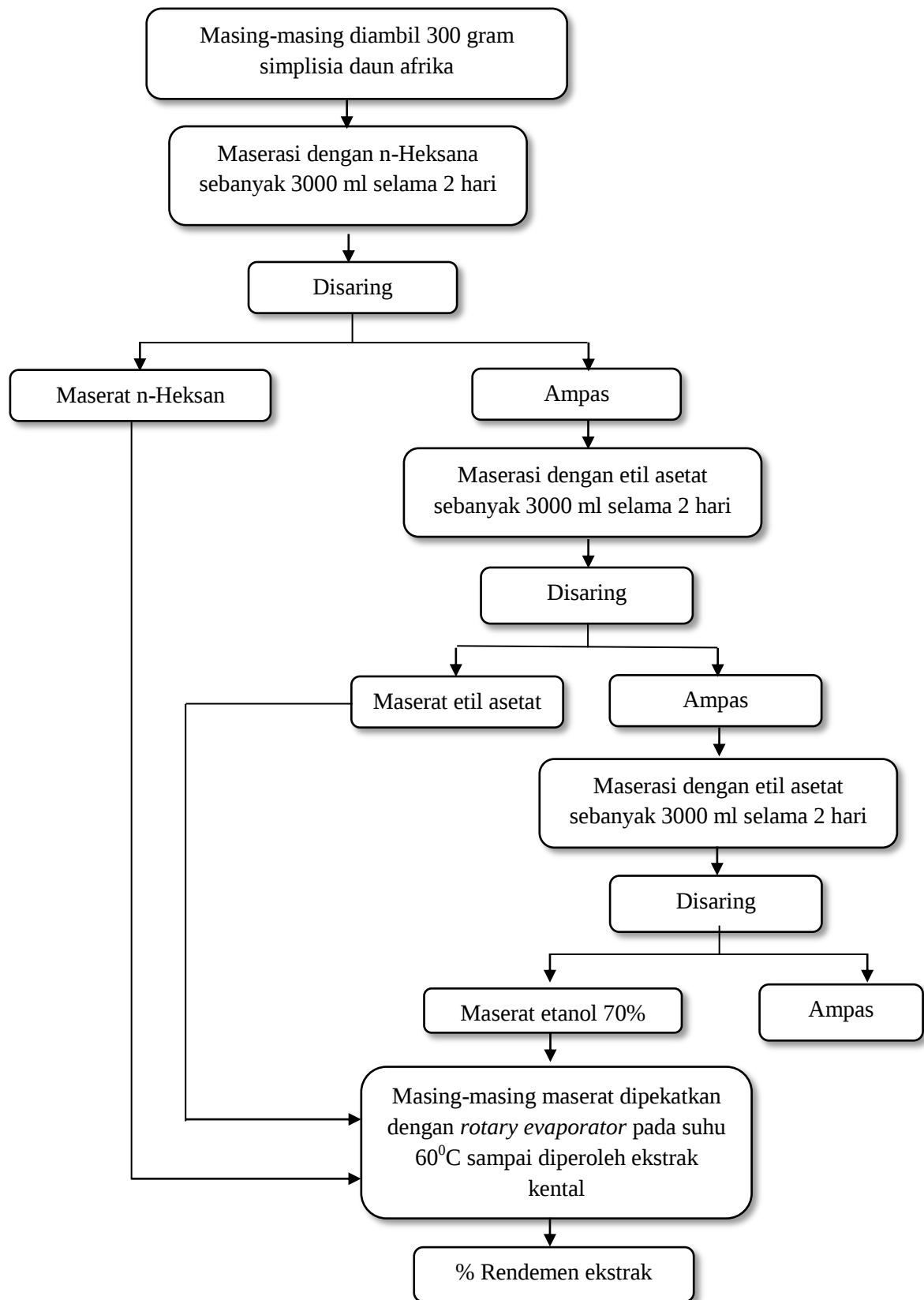
b. Penyiapan Bahan

Tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) yang diperoleh selanjutnya dilakukan sortasi basah tujuannya untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor, kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu diangin-anginkan hingga tidak terdapat sisa air, kemudian dilakukan perajangan daun afrika dan dikeringkan dibawah sinar matahari hal ini bertujuan untuk menghindari kerusakan senyawa kimia yang terkandung dalam daun afrika. Setelah itu dikeringkan kemudian dilanjutkan untuk menghaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus, setelah itu diayak dengan ayakan 30 mesh kemudian dilakukan ekstraksi.

c. Pembuatan Ekstrak Daun Afrika (*Vernonia Amygdalina* Del.)

Ekstrak daun afrika dibuat dengan menggunakan metode maserasi dengan cara masing-masing ditimbang sebanyak 300 gr serbuk daun afrika kemudian dilakukan ekstraksi dengan menggunakan perbandingan 1:10. Maserasi dapat dilakukan dengan tiga jenis pelarut

yaitu n-Heksana (non polar), etil asetat (semi polar), dan etanol (polar). Ekstraksi pertama n-Heksan 3L didalam wadah agar terhindar dari cahaya matahari selama 2x24 jam sambil diaduk. Kemudian maserat yang diperoleh disaring. Residu yang diperoleh dikering anginkan, setelah itu dimasukkan ke dalam erlenmeyer untuk diekstrak kembali dengan pelarut etil asetat, kemudian pada pelarut etanol dengan perlakuan yang sama pada ekstrak menggunakan *n-Heksan*. Hasil maserat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan filtrat ekstrak daun afrika menggunakan alat *rotary evaporator* suhu 60⁰C setelah itu dipanaskan kedalam waterbath dengan suhu 65⁰C sehingga didapatkan ekstrak kental daun afrika. Ekstrak kental yang sudah di waterbath ditimbang untuk menghitung rendemen dan simplisia di tempat yang terlindung dari cahaya matahari dan digunakan untuk pengujian tersebut.



Gambar 3.1 Skema Pembuatan Maserasi Bertingkat Ekstrak n-Heksana, Etil Asetat, Etanol 70% Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.)

Pemeriksaan secara kualitatif senyawa flavonoid, tannin, saponin, steroid dan alkaloid adalah sebagai berikut :

1) Flavonoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambah dengan 5 ml etanol setelah itu dipanaskan selama 5 menit. Ditambahkan 1-2 tetes HCL pekat dan serbuk magnesium (Mg) 0,2 gr. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan warna merah hingga jingga.

2) Steroid/triterpenoid

Sebanyak 1 mL ditambahkan asam asetat anhidrat sebanyak 10 tetes dan asam sulfat pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan dan diamati. Adanya steroid ditunjukkan oleh warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu.

3) Saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditimbang dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan 10 ml air suling panas dan didinginkan kemudian dikocok hingga kuat selama 10 detik. Saponin positif jika terbentuk busa yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N buih akan hilang.

4) Tanin

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan 10 mL air suling lalu disaring, filtratnya diencerkan dengan aquadest sampai tidak berwarna. Larutan diambil 2ml kemudian ditambahkan 2 tetes

pereaksi FeCl_3 1%, hasilnya akan berubah menjadi warna biru atau hijau kehitaman

5) Glikosida

Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 ml aquadest dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan larutan NaOH. Terbentuknya warna kuning mengindikasikan adanya senyawa glikosida (Nurlaila *et al.*, 2017).

4. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Bahan, Media dan Alat

Sterilisasi alat dilakukan sterilisasi panas kering untuk alat-alat yang berupa kaca dan sterilisasi panas basah untuk alat-alat yang berupa plastik dan media. Sterilisasi panas kering dengan oven pada suhu 170°C untuk alat-alat kaca, sedangkan sterilisasi panas basah dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit untuk alat-alat plastik dan media. Alat-alat lain seperti jarum ose disterilisasi dengan cara dipanaskan di atas api lampu spiritus sebelum digunakan (Sari, 2013).

b. Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

Pembuatan media dilakukan dengan cara menyiapkan bahan untuk medium yaitu dengan menimbang media *Nutrient Agar* sebanyak 20 gr kemudian dilarutkan dengan aquades sebanyak 500 ml, setelah itu dipanaskan diatas *hotplate* sambil terus diaduk

sehingga NA tersebut melarut dan menghasilkan warna jernih. Kemudian medium dimasukkan dalam erlenmeyer ditutup dengan kapas dan wrap kemudian disterilisasi. Proses sterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit (Arifin *et al.*, 2013).

c. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diambil beberapa koloni dari biakan menggunakan ose steril, disuspensikan pada media NA steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Suspensi bakteri diambil 100 µl pada hari pertama dimasukkan dalam 1 ml Na, kemudian diinkubasi 37⁰C selama 5 jam. Setelah itu diambil 100 µl, disamakan konsentrasinya dengan cara menambah larutan salin (Aquadest) sedikit demi sedikit karena sebagai larutan pengisotonis agar tekanan osmosis antara larutan dan mikroba sama sehingga mempunyai kekeruhan yang sesuai dengan standar Mc. Farland (10⁸ CFU/ml).

5. Pembuatan Larutan Pembanding

Pembuatan larutan pembanding ini digunakan ciprofloxacin sebagai kontrol positif, sedangkan kontrol negatifnya menggunakan Aquadest steril. Pada pembuatan stok awal ciprofloxacin 1 mg yang setara dengan konsentrasi 1000 µg/ml. Kemudian dibuat pengenceran untuk masing-masing bakteri sehingga didapatkan kadar *Pseudomonas aeruginosa* 2 µg/ml.

6. Perhitungan Stok Awal Ciprofloxacin

Pembuatan stok konsentrasi awal 1 mg/ ml (1000 µg/ml)
ciprofloxacin dengan cara :

$$1000 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml} = 100000 \mu\text{g} \\ = 100 \text{ mg}$$

1 tablet mengandung 500 mg ciprofloxacin

a. Perhitungan :

$$\text{Berat 1 tablet} = 700 \text{ mg}$$

$$\text{Rumus} = \frac{\text{Berat 1 tablet}}{\text{kandungan cipro}} \times 100 \text{ mg}$$

$$= \frac{700 \text{ mg}}{500 \text{ mg}} \times 100 \text{ mg}$$

$$= 140 \text{ mg}$$

1) Ditimbang ciprofloxacin tablet sebanyak 140 mg ditambahkan
dengan aquadest add 100 ml diaduk sampai homogen.

b. Stok Ciprofloxacin 2 µg/ml untuk *Pseudomonas aeruginosa* :

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$V1 \times 1000 \mu\text{g/ml} = 100 \text{ ml} \times 2 \mu\text{g/ml}$$

$$V1 \times 1000 = 200 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{200}{1000} \text{ ml}$$

$$V1 = 0,2 \text{ ml}$$

2) Diambil sebanyak 0,2 ml kemudian ditambah dengan aquadest
steril add 10 ml.

7. Pembuatan Seri Konsentrasi

Konsentrasi ekstrak daun afrika untuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa* 20%, 30%, 40% :

a. Konsentrasi 40% b/v

Ditimbang 4 gram ekstrak kental kemudian ditambahkan dengan aquadest add 10 ml pada labu takar.

Perhitungan konsentrasi 40% b/v :

$$40 \text{ gram}/100 \times 10 \text{ ml} = 4 \text{ gram}$$

4 gram ekstrak dilarutkan dengan aquadest sampai 10 ml.

b. Konsentrasi 30% b/v

Ditimbang 3 gram ekstrak kental kemudian ditambahkan dengan aquadest add 10 ml pada labu takar.

Perhitungan konsentrasi 30% b/v :

$$30 \text{ gram}/100 \times 10 \text{ ml} = 3 \text{ gram}$$

3 gram ekstrak dilarutkan dengan aquadest sampai 10 ml.

c. Konsentrasi 20% b/v

Ditimbang 2 gram ekstrak kental kemudian ditambahkan dengan aquadest add 10 ml pada labu takar.

Perhitungan konsentrasi 20% b/v :

$$20 \text{ gram}/100 \times 10 \text{ ml} = 2 \text{ gram}$$

2 gram ekstrak dilarutkan dengan aquadest sampai 10 ml.

8. Pengujian Antibakteri Dengan Difusi Cakram

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi Kirby bauer. Pengujian ini dilakukan pada ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) pada tiga konsentrasi yang berbeda 20% b/v, 30% b/v, dan 40% b/v. Masing-masing konsentrasi dilakukan pengujian terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, pertama media NA dituang dalam cawan petri dibiarkan dingin, kemudian ditambahkan dengan suspensi bakteri dicampur dan digoyangkan hingga merata dan dibiarkan sampai memadat, kemudian kertas cakram yang telah diberi ekstrak n-Heksan, etil asetat, etanol 70% daun afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) dengan seri konsentrasi 20% b/v, 30% b/v, 40% b/v diletakkan diatas media tersebut dan ditetaskan ekstrak daun afrika tunggu hingga padat. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam.

9. Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri

Kontrol yang digunakan pada aktivitas antibakteri ekstrak n-Heksan, etil asetat, etanol 70% daun afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yaitu :

a. Perlakuan *Pseudomonas aeruginosa*

- 1) Kontrol positif = 5 ml media NA + suspensi bakteri + ciprofloxacin
- 2) Kontrol negatif = 5 ml media NA + suspensi bakteri + Aquadest
- 3) Kontrol media = 5 ml media NA

b. Perlakuan 1 :

- 1) 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak n-Heksana 20%
- 2) 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak etil asetat 20%
- 3) 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak etanol 20%

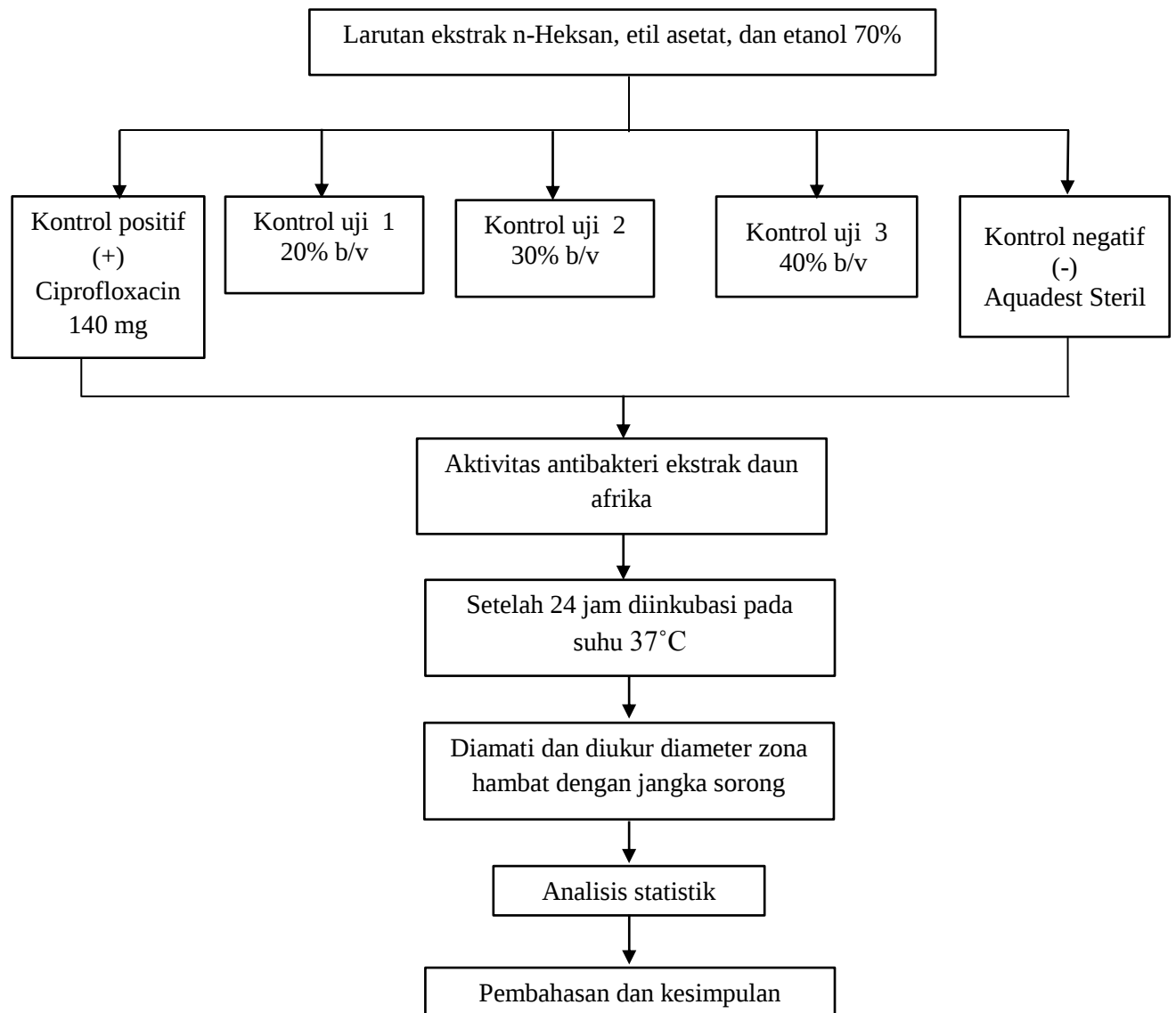
c. Perlakuan 2 :

- 1) 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak n-Heksana 30%
- 2) 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak etil asetat 30%
- 3) 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak etanol 30%

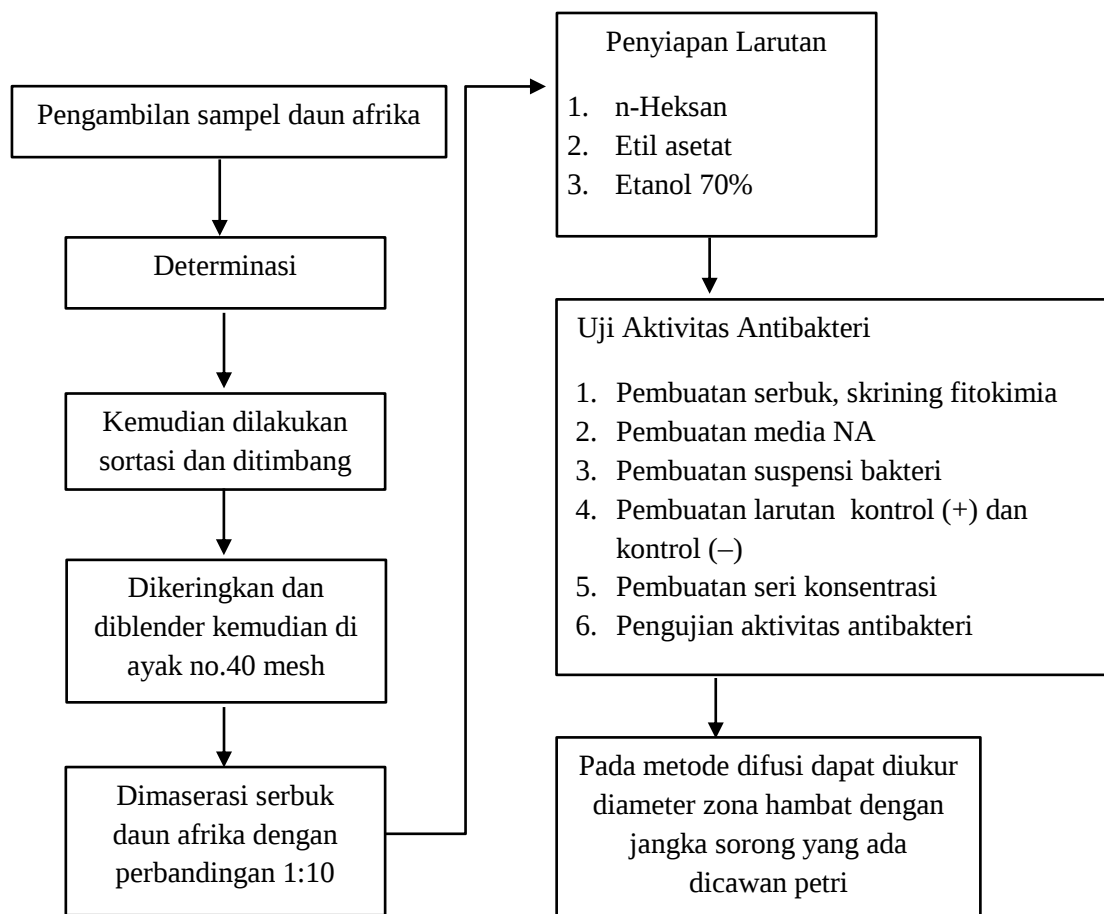
d. Perlakuan 3 :

- 1) 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak n-Heksana 40%
- 2) 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak etil asetat 40%
- 3) 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak etanol 40%

Setelah itu medium diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Pada tiap perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Hasilnya diperoleh dengan mengukur diameter zona bening disekeliling kertas cakram. Kemudian untuk tiap konsentrasi dihitung setiap rata-rata hasil yang diperoleh.



Gambar 3.2 Skema Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Afrika



Gambar 3.3 Skema Perbedaan Pelarut Ekstraksi Daun Afrika (*Vernonia amygdalina Del.*) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

F. Analisis Data

Data diperoleh dari pengamatan diameter zona hambat ekstrak n-Heksana, etil asetat, etanol 70% daun afrika (*Vernonia amygdalina Del.*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan perhitungan diameter zona bening dan dicari diameter terpanjang dan dikurangi dengan diameter dari kertas cakram tersebut. Data diamati pada masing-masing konsentrasi dan didapatkan diameter zona hambat kemudian dianalisa menggunakan SPSS 25,0 for windows. Uji normalitas dilakukan menggunakan *Shapiro wilk* dan uji *Levene test* untuk mengetahui homogenitas data yang artinya data tersebut

normal. Hasil analisa ini memiliki nilai signifikan $P > 0,05$ yang artinya terdapat perbedaan. Data yang terdistribusi normal dan variansnya homogen dianalisis menggunakan uji statistik One Way Anova (Analysis Of Varians) dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil diperoleh bahwa data terdistribusi normal akan tetapi tidak homogen sehingga tidak memenuhi syarat parametrik. Oleh karena itu, dilakukan uji non parametrik yaitu *Kruskal Wallis*. Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji Tukey HSD.