

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, penelitian ini menggunakan pendekatan secara deskriptif, karena pada penelitian ini hanya mengamati ada tidaknya aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 96% daun gamal terhadap *Staphylococcus aureus*.

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilaksanakan dalam beberapa tahap kerja, yaitu melakukan determinasi tanaman gamal, persiapan alat dan bahan yang akan digunakan, pengumpulan daun tanaman gamal dari daerah Sukun, pembuatan simplisia, skrining senyawa metabolit sekunder secara kualitatif, pembuatan ekstrak daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*), sterilisasi alat, pembuatan media selektif *Manitol Salt Agar* (MSA) dan pembuatan suspensi bakteri, pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, pengamatan terhadap hasil pengujian, analisis data dan menarik kesimpulan.

#### **3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi dalam penelitian ini adalah ekstrak daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) dan sampel yang digunakan adalah ekstrak daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) dengan konsentrasi 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%.

### **3.3 Lokasi dan Waktu**

Lokasi pengumpulan bahan baku daun gamal di daerah Sukun sedangkan lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Waktu penelitian dilakukan mulai dari pengumpulan bahan baku sampai analisis data yaitu pada bulan Februari sampai selesai.

### **3.4 Definisi Operasional Variabel**

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini terdiri atas variable bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*), sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*).

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Indikator/ hasil ukur	Alat ukur	Skala ukur
<b>Ekstrak etanol 96% daun gamal</b>	Cairan kental yang diperoleh dengan metode maserasi simplisia daun gamal menggunakan pelarut etanol 96%.	Rendemen (%)	Neraca analitik	Nominal
<b>Identifikasi fitokimia ekstrak etanol 96% daun gamal</b>	Proses untuk mengetahui metabolit sekunder suatu ekstrak meliputi alkaloid, flavonoid, terpenoid dan tannin.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alkaloid : endapan jingga (pereaksi dragendorff) atau endapan putih kuning (pereaksi mayer), endapan coklat (pereaksi wagner)</li> <li>• Flavonoid : merah jingga</li> <li>• Saponin: terbentuk busa</li> <li>• Tannin : warna biru-hijau</li> </ul>	Panca Indera	-
<b>Aktivitas antibakteri</b>	Kemampuan suatu senyawa dapat memberikan efek bagi bakteri	Di=meter zona hambat di ' sekitar sumuran (mm)	Jangka sorong	Ordinal

### 3.5 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: autoklaf merk wisconsin alumunium, oven, inkubator merk Tech Inki, pinset merk ACPO, jangka sorong, bunsen, gelas ukur berukuran 10 mL, 100 mL, suhu 20°C merk Tech Inki, cawan petri, tabung reaksi merk Pyrex, corong gelas ukuran 50 mL merk Pyrex, pipet volum merk Precicolon, bola hisap merk Assistant, batang pengaduk, beaker glass ukuran 100 mL, 400 mL, 1.500 mL, merk Pyrex, cawan penguap, perkolaktor, alumunium foil, cawat osse.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) dari daerah Keben kecamatan Sukun, etanol 96%,

biakan murni *Staphylococcus aureus*, media *Manitol Salt Agar* (MSA), reagen *Dragendroff*, reagen *Mayer*, logam Mg, HCl pekat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, FeCl<sub>3</sub>, aquadest.

## 1.6 Prosedur Penelitian

### 3.6.1 Determinasi Tanaman

Dilakukan dengan cara membandingkan ciri-ciri morfologi tumbuhan dengan literature *flora of Java*.

### 3.6.2 Pembuatan Simplisia

Adapun cara pembuatan serbuk simplisia adalah sebagai berikut :

Dilakukan pengambilan daun segar dari tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) tanpa menentukan posisi daun pada tangkai yang akan dijadikan simplisia. Kemudian disortasi daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) yang masih segar untuk memisahkan daun dari kotoran. Setelah itu, dicuci daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) yang telah disortasi, dengan cara direndam dalam air dan bilas hingga bersih. Dirajang daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) menjadi bagian yang lebih kecil. Diletakkan daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) yang telah dirajang pada nampan, kemudian dikeringkan dalam oven dengan suhu 60<sup>0</sup>C selama 6 jam (Hidana and Fauziyyah, 2016). Dilakukan sortasi kembali pada daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) yang sudah kering. Diambil bagian yang bagus dan dibuang yang rusak. Diserbukkan daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) dengan blender, kemudian diayak dan dilakukan uji organoleptis (bentuk, bau, warna dan rasa) (Depkes RI, 1985).

### 3.6.3 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak daun tanaman gamal (*Gliricidia sepium*) dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% menurut Gunawan (2010) yaitu sebagai berikut :

Ditimbang serbuk simplisia sebanyak 500 gram, lalu dimasukkan ke dalam botol coklat kemudian dibasahi dengan etanol 96% sebanyak 5000 mL dan disimpan selama 5 hari, sesekali diaduk. Setelah disimpan selama 5 hari, dilakukan penyaringan dengan corong Buchner untuk memperoleh ekstrak dari simplisia. Ekstrak yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40<sup>0</sup>C-50<sup>0</sup>C sampai diperoleh ekstrak kental (Lebang, 2016), kemudian diwaterbath untuk menguapkan sisa air pada ekstrak. Ekstrak kental jika memiliki kadar air antara 5%-30% (Voigt, 1994). Setelah diperoleh ekstrak kental dilakukan uji organoleptis (bentuk, bau, warna dan rasa). Kemudian dibuat 5 varian dosis dengan konsentrasi 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%.

### 3.6.4 Uji Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder secara Kualitatif

#### 1. Uji Alkaloid

Pengujian dilakukan dengan mengambil masing-masing 2 mL sampel daun gamal yang telah diekstraksi dengan pelarut air dan etanol ke dalam 2 buah tabung reaksi yang berbeda. Setelah itu masing-masing ekstrak ditambahkan dengan 5 tetes reagen *Dragendroff*. Jika masing-masing larutan terbentuk endapan jingga maka positif mengandung alkaloid. Selanjutnya untuk pengujian alkaloid dengan menggunakan reagen *Mayer* dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 mL sampel daun gamal yang telah diekstraksi dengan pelarut air dan etanol ke dalam 2 buah tabung reaksi yang berbeda. Setelah itu masing-masing

ekstrak ditambahkan 3 tetes asam klorida pekat dan 5 tetes reagen *Mayer*. Jika masing-masing larutan terbentuk endapan putih maka sampel positif mengandung alkaloid (Ergina, 2014).

## 2. Uji Flavonoid

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 mL sampel daun gamal yang telah diekstraksi dengan pelarut air dan etanol, kemudian dipanaskan kurang lebih 5 menit. Setelah dipanaskan masing-masing ditambahkan dengan 0,1 gram logam Mg dan 5 tetes HCl pekat. Jika masing-masing larutan terbentuk warna kuning jingga sampai merah, maka positif mengandung flavonoid (Ergina, 2014).

## 3. Uji Saponin

Sebanyak 5 gram sampel dididihkan dalam 100 mL air selama 5 menit, kemudian disaring dalam keadaan panas. Larutan tersebut diambil sebanyak 10 mL kemudian dikocok kuat secara vertikal selama 10 detik. Adanya saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil setinggi 1-10 cm dan tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang pada penambahan satu tetes HCl 2 N (Djamil, 2009).

## 4. Uji Tanin

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 mL sampel daun gamal yang telah diekstraksi dengan pelarut air dan etanol, kemudian dipanaskan kurang lebih 5 menit. Setelah dipanaskan masing-masing ditambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Jika masing-masing larutan terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman maka positif mengandung tanin (Ergina, 2014).

### 3.6.5 Sterilisasi Alat

Sebelum alat pengujian antibakteri digunakan harus dilakukan proses sterilisasi terlebih dahulu yaitu dengan sterilisasi panas basah dan panas kering. Sterilisasi panas basah adalah sterilisasi untuk alat-alat yang terbuat dari bahan kaca dengan cara dibungkus dengan kertas coklat, kemudian disterilisasikan dalam autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Contoh alat-alatnya: beaker glass, gelas ukur, erlenmeyer. Sterilisasi panas dingin adalah sterilisasi untuk alat-alat yang terbuat dari bahan logam dan porselen yaitu dengan membungkusnya dengan alumunium foil kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu  $160^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam, contohnya cawan penguap, batang pengaduk.

### 3.6.6 Pembuatan Media *Manitol Salt Agar* (MSA)

Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan. Ditimbang bahan 56 gram dan diukur aquadest sebanyak 500 mL. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer. Memanaskannya di atas api spirtus sampai larut sempurna dan mendidih. Menutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya. Mensterilisasi media MSA di autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

### 3.6.7 Peremajaan Bakteri

Peremajaan tersebut dilakukan dengan media miring MSA ditanami bakteri *Staphylococcus aureus* dengan teknik goresan, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ - $38^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam.

### 3.6.8 Pembuatan Larutan Standar *Mc Farland*

Pembuatan standar kekeruhan *Mc Farland* dibuat dengan mencampurkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% dan larutan BaCl<sub>2</sub> 1% dengan rincian sesuai tabel 3.2 berikut :

**Tabel 3.2 Larutan Standar *Mc Farland***

<b>Mc Farland</b>	<b>1% BaCl<sub>2</sub> (mL)</b>	<b>1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mL)</b>	<b>Jumlah Suspensi Bakteri /mL</b>
0,5	0,05	9,95	$1,5 \times 10^8$ cfu/mL
1,0	0,10	9,90	$3,0 \times 10^8$ cfu/mL
2,0	0,20	9,80	$6,0 \times 10^8$ cfu/mL
3,0	0,3	9,7	$9,0 \times 10^8$ cfu/mL
4,0	0,4	9,6	$1,2 \times 10^8$ cfu/mL
5,0	0,5	9,5	$1,5 \times 10^8$ cfu/mL
6,0	0,6	9,4	$1,8 \times 10^8$ cfu/mL
7,0	0,7	9,3	$2,1 \times 10^8$ cfu/mL
8,0	0,8	9,2	$2,4 \times 10^8$ cfu/mL
9,0	0,8	9,1	$2,7 \times 10^8$ cfu/mL
10,0	1,0	9,0	$3,0 \times 10^8$ cfu/mL

Larutan standar kekeruhan diperiksa dengan menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 580 nm. Nilai absorbansi dibuat menjadi kurva standard McFarland sehingga didapatkan persamaan garis linier  $y = ax + b$ .

### 3.6.9 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Masing-masing bakteri yang telah dibiakkan secara murni pada media MSA yang telah disiapkan pada prosedur sebelumnya dalam suasana aerob. Diambil sebanyak 1-2 ose biakkan murni bakteri uji yang telah dikultur, disuspensikan dengan menggunakan larutan NaCl 0,9% 30 mL pada panjang gelombang 580 nm (Mambang, 2014). Nilai absorbansi suspense bakteri dimasukkan dalam persamaan kurva standard McFarland sehingga diketahui jumlah sel bakterinya. Kemudian diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam media agar penanaman.

### 3.6.10 Uji Aktivitas Antibakteri

Dalam uji aktivitas antibakteri, metode yang digunakan yaitu metode difusi sumuran dengan larutan uji yang telah disiapkan yaitu konsentrasi ekstrak etanol 96% daun gamal 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%. Untuk satu set percobaan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali, satu cawan untuk kontrol media dan satu lagi untuk kontrol bakteri. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam-48 jam.

### 3.6.11 Pengukuran Zona Hambat

Pada percobaan ini hasil yang diperoleh berupa diameter (mm) dengan rumus :

Zona hambatan pertumbuhan mikroba = diameter zona bening-diameter sumur

Daerah hambatan yang terjadi diamati dengan diukur dengan menggunakan jangka sorong. Pengukuran luas zona bening dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam, dari hasil inkubasi terlihat zona bening di sekitar sumuran. Zona bening tersebut menandakan daya hambat antibakteri. Zona bening tersebut diukur menggunakan pengukur jangka sorong.

## 3.7 Analisis Data

Aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun gamal terhadap bakteri (*Staphylococcus aureus*) menghasilkan zona bening, kemudian data hasil pengukuran dianalisis secara deskriptif, karena pada penelitian ini hanya mengamati ada tidaknya aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 96% daun gamal terhadap *Staphylococcus aureus*.