

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan metode ekperimental dengan beberapa tahapan, yaitu tahap pembuatan ekstraksi maserasi dengan menggunakan etanol 70% kemudian pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi sumuran. Tahapan akhir dalam penelitian ini adalah pengumpulan data, menganalisis data dan membuat kesimpulan.

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

##### **1. Populasi Penelitian**

Populasi pada penelitian ini adalah daun cabe jawa yang diperoleh dari Dusun Pandean RT 02 RW 11 Kecamatan Nguling Kabupaten Pasuruan dan selanjutnya pada tahap pembuatan simplisia dilakukan di Materia Medika Batu.

##### **2. Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian daun cabe jawa yang hanya berwarna hijau..

#### **3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang pada bulan Mei-Juni 2019. Sedangkan determinasi daun cabe jawa dilakukan di Materia Medika Batu, Malang.

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

Pada penelitian ini terdapat dua variabel, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstraksi daun cabe jawa sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstraksi daun cabe jawa terhadap *Escherichia coli*.

**Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel**

Variabel	Definisi Variabel	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Bebas : Ekstrak daun cabe jawa	Cairan yang diperoleh dari ekstrak etanol daun cabe jawa dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%	Gelas ukur, Beaker glass	mL	Nominal
Terikat : Aktivitas antibakteri ekstrak daun cabe jawa terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i>	Zona bening yang terbentuk disekitar sumuran yang telah diberi ekstrak etanol daun cabe jawa	Jangka sorong	mm	Nominal

### 3.5 Instrumen Penelitian

#### 3.5.1 Alat

Adapun alat yang digunakan dalam pembuatan ekstraksi seperti : botol kaca gelap, lap dan tisu, water bath, rotary evaporasi, sudip, batang pengaduk, cawan porselin, penjepit kayu, gelas ukur, kertas saring, corong *bucner*, *vacuum stage pump*.

Adapun alat yang digunakan dalam uji aktivitas anti bakteri ini antara lain : sendok tanduk, kertas perkamen, neraca analitik, erlenmeyer 500 ml, batang pengaduk, kaki tiga, api bunsen spirtus, asbes, kapas, kertas coklat, tali atau benang, cawan petri, beaker glass, gelas ukur, inkubator, jangka sorong, kawat ose, oven, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *Laminar air flow*, mikro pipet, autoklaf, blue tip, tisu dan lap, lemari pendingin, vortex, korek api, pembuat lubang sumuran, label.

### 3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada pembuatan ekstrak daun cabe jawa seperti: simplisia daun cabe jawa, etanol 70%. Bahan yang digunakan pada uji aktivitas anti bakteri seperti : ekstrak daun cabe jawa, Bakteri *Escherichia coli*, media EMB (*Eosin Methylene Blue*), NaCl 0.9%, alkohol, aquadest steril.

## 3.6 Prosedur Penelitian

### 3.6.1 Tahap Pembuatan Serbuk Simplisia (Goeswin, 2007 ; Sari, 2013)

1. Dikumpulkan daun cabe jawa 720 gram
2. Dicuci bersih dengan air mengalir (sortasi basah) dilakukan untuk memisahkan cemaran (kotoran dan benda asing lain) dari bahan simplisia, kemudian ditiriskan.
3. Dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C selama  $\pm 2 \times 24$  jam (sortasi kering) agar simplisia tidak cepat rusak dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lebih lama. Dengan berkurangnya kadar air, maka reaksi enzimatik dapat dicegah sehingga penurunan mutu atau kerusakan simplisia dapat dihindari
4. Selanjutnya, daun yang sudah kering dihancurkan dengan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk.
5. Serbuk simplisia ditimbang dengan hasil 150 gram lalu disimpan pada suhu yang sesuai dengan sifat dan ketahanan simplisia.

### 3.6.2 Tahap Pembuatan Ekstraksi daun cabe jawa dengan menggunakan etanol 70% (Sari, 2012 ; Farmakope Herbal, 2009)

1. Ditimbang 100 gram simplisia serbuk daun cabe jawa.

2. Diekstraksi dengan perbandingan pelarut 1:10 (b/v) (100 gram simplisia dilarutkan dalam 1000 ml pelarut). Proses ekstraksi dilakukan selama 4 x 24 jam secara maserasi dengan pengadukan selama 6 jam.
3. Hasil maserasi disaring dengan menggunakan corong buchner yang diberi kertas saring dan bantuan *stage vacuum pump*, filtrat di tampung dalam erlenmeyer.
4. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan atau dikentalkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental.
5. Apabila masih terdapat sisa pelarut maka ekstrak dipekatkan kembali dengan menggunakan *waterbath* hingga seluruh pelarut menguap dan diperoleh ekstrak etanol kental daun cabe jawa.
6. Ditimbang ekstrak kental daun cabe jawa dan dicatat.
7. Dilakukan perhitungan kadar rendemen dari ekstrak yang diperoleh. Kadar rendemen ekstrak dihitung untuk mengetahui seberapa besar ekstrak yang dihasilkan dari proses ekstraksi dari masing-masing pelarut.

$$\text{Kadar rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{bobot hasil ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

### 3.6.3 Tahap Uji Skrining Fitokimia

#### 3.6.3.1 Uji Flavonoid (Mailihu dkk, 2017)

1. Diambil sebanyak 1 mL ekstrak etanol daun cabe jawa dimasukkan tabung reaksi
2. Ditambahkan asam klorida pekat (HCl pekat) sebanyak 2 tetes dan dikocok kuat

3. Ditambahkan serbuk Magnesium (Mg) dan dikocok kuat. Sampel mengandung flavonoid bila terdapat buih dengan intensitas yang banyak dan larutan akan mengalami perubahan warna dari warna awal sampel menjadi warna jingga.
4. Terbentuk larutan berwarna jingga menunjukkan adanya flavonoid

#### 3.6.3.2 Uji Saponin (Mailuhu dkk, 2017 : Simaremare, 2014)

1. Diambil sebanyak 1 mL ekstrak etanol daun cabe jawa dan dimasukkan tabung reaksi lalu ditambahkan 5 mL air panas dan ditambahkan asam klorida (HCl) 2N lalu dikocok kuat
2. Setelah itu, dilihat apakah terbentuk buih dari warna awal sampel setelah didiamkan selama 10 menit. Sampel yang mengandung saponin bila terdapat buih dan intensitas yang banyak dan konsisten selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm.

#### 3.6.3.3 Uji Alkaloid (Kristanti dkk, 2008 : Mailuhu dkk, 2017)

1. Diambil sebanyak 2 mL ekstrak daun cabe jawa dilarutkan dengan 10 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N dan dikocok kuat
2. Larutan yang didapat kemudian dibagi 4 tabung reaksi,  
Tabung pertama : sebagai blanko,  
Tabung kedua : Ditambahkan pereaksi Dragendroff sebanyak 3 tetes, maka akan terbentuk endapan merah jingga,  
Tabung ketiga : Ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes, maka akan terbentuk endapan warna putih hingga kekuningan,  
Tabung keempat : Ditambah pereaksi Wagner sebanyak 3 tetes maka akan terbentuk endapan coklat kemerahan

#### 3.6.4 Tahap pembuatan seri konsentrasi ekstrak etanol daun cabe jawa (Utami, 2017)

1. Dibuat 4 seri konsentrasi dari ekstrak kental daun cabe jawa (25%,50%,75% dan 100%) dengan menggunakan pelarut aquadest
2. Untuk larutan uji dengan konsentrasi 25% diambil 0,5 gram ekstrak kental daun cabe jawa kemudian ditambahkan pelarut DMSO 2 mL.
3. Untuk larutan uji konsentrasi 50% diambil 1 gram ekstrak kental daun cabe jawa kemudian ditambahkan pelarut DMSO 2 mL.
4. Untuk larutan uji konsentrasi 75% diambil 1,5 gram ekstrak kental daun cabe jawa kemudian ditambahkan pelarut DMSO 2 mL.
5. Untuk larutan uji konsentrasi 100% diambil 2 gram ekstrak kental daun cabe jawa kemudian ditambahkan pelarut DMSO 2 mL.

#### 3.6.5 Tahap Pembuatan Sterilisasi Alat dan Bahan (Utami, 2017)

1. Disiapkan terlebih dahulu alat dan bahan yang akan digunakan seperti cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, beaker glass, bluetip
2. Disiapkan cawan petri kosong, bluetip dimasukkan dalam beaker glass 100 mL, tabung reaksi dengan ditutup kertas coklat
3. Semua alat dan bahan disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

#### 3.6.6 Tahap Pembuatan Media EMBA (Bhaskara et al., 2012)

1. Ditimbang media EMBA 12 gram
2. Dimasukkan media EMBA kedalam erlenmeyer, larutkan dengan aquadest
3. Dipanaskan sampai mendidih.

4. Diangkat dan ditutup erlenmeyer dengan kapas dan kertas coklat, kemudian ikat dengan benang.
5. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 1 atm selama 15 menit

#### 3.6.7 Tahap pembuatan Media Miring (Saparianti, 2014)

1. Disiapkan tabung reaksi
2. Dituangkan media EMB steril ke dalam tabung reaksi sebanyak 5-7 mL.
3. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit
4. Setelah steril, diletakkan tabung reaksi pada posisi miring hingga media benar-benar memadat dan siap untuk digunakan.

#### 3.6.8 Tahap pembuatan NaCl (Saparianti, 2014)

1. Diukur NaCl 0.9% 60 mL
2. Dimasukkan ke dalam erlenmeyer
3. Ditutup dengan kapas dan kertas coklat
4. Disterilkan dengan autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 1 atm selama 15 menit.

#### 3.6.9 Peremajaan Bakteri (Pakekong et al., 2016)

1. Disiapkan tabung reaksi steril yang berisi media EMBA
2. Disiapkan biakan bakteri *Escherichia coli*
3. Diambil satu ose lalu ditanamkan pada media miring secara aseptis
4. Ditanam ke media EMBA dengan cara digores
5. Ditutup tabung reaksi dengan kapas dan kertas coklat.
6. Diinkubasi dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam.

### 3.6.10 Pembuatan suspensi bakteri (Handayani, 2017)

1. Disiapkan larutan NaCl 0,9% steril
2. Diambil dengan kawat oose bakteri *E. coli* dari kultur yang diinokulasikan pada media miring
3. Dimasukan ke dalam erlenmeyer yang berisi larutan NaCl 0,9%
4. Kemudian diaduk hingga homogen dan ditandai dengan cairan berubah menjadi keruh
5. Kekeruhan dari suspensi diukur dengan spektrofotometri UV sesuai dengan panjang gelombang 580 nm dan diperoleh nilai transmittan 25% yang setara dengan jumlah sel  $1,0 \times 10^8$  cfu/mL.

### 3.6.11 Pembuatan Kontrol Media

1. Dimasukkan media EMBA sebanyak 15 mL ke dalam cawan petri steril
2. Ditunggu hingga memadat lalu dibungkus dengan kertas coklat
3. Diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}$  selama 1x24 jam

### 3.6.12 Pembuatan Kontrol Bakteri

1. Dimasukkan suspensi bakteri sebanyak 1 mL ke dalam cawan petri menggunakan mikropipet
2. Ditambahakan media EMBA sebanyak 15 mL lalu diputar angaka delapan agar tercampur merata
3. Ditunggu hingga memadat dan dibungkus dengan kertas coklat
4. Diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}$  selama 1x24 jam

### 3.6.13 Pewarnaan Bakteri (Pratiwi, 2008)

1. Dibersihkan kaca objek dengan alkohol 70% dan dikeringkan



2. Dibuat lingkaran dengan spidol di bagian bawah kaca objek untuk menandai tempat bakteri
3. Diambil satu ose bakteri dan ditempatkan dalam batas lingkaran yang sudah ditetesi dengan NaCl 0,9% dan dicampur hingga merata.
4. Difiksasi bakteri dengan cara melewatkan kaca objek diatas api bunsen spiritus sehingga membentuk noda pada kaca objek
5. Diwarnai preparat dengan kristal violet selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir, kering anginkan
6. Selanjutnya preparat diwarnai dengan iodin selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir, kering anginkan
7. Cuci dengan alkohol 96% selama 30 detik sampai tidak berwarna, kering anginkan
8. Diwarnai kembali preparat dengan safranin selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan kering anginkan
9. Amati preparat menggunakan mikroskop

#### 3.6.14 Uji aktivitas antibakteri (Utami, 2017)

1. Suspensi bakteri sebanyak 1 mL dituang pada cawan petri dengan media EMBA 15 mL menggunakan metode *pour plate*
2. Ditunggu hingga media dingin dan memadat
3. Membuat sumuran dengan diameter  $\pm$  8 mm lalu diisi dengan ekstrak etanol daun cabe jawa dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%
4. Dibiarkan sebentar dalam LAF agar ekstrak sedikit mengering
5. Diberi label pada cawan petri secara benar
6. Diinkubasi selama 1x 24 jam pada inkubator

7. Diamati dan diukur diameter zona bening.

### **3.7 Analisis Data**

Penelitian ini dilakukan secara eksperimen dan data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data primer yaitu data eksperimen laboratorium diambil Pengukuran diameter zona bening yang dihasilkan dengan mengukur batas terpanjang serta batas terpendek zona bening dengan menggunakan jangka sorong yang terbentuk sehingga data yang dihasilkan dirata-rata (Utami, 2017). Kemudian data dimasukkan dalam kategori, lemah, sedang, kuat dan sangat kuat berdasarkan frekuensi diameter zona bening (Moerfiah, 2011). Data hasil penelitian diameter zona hambat dianalisis menggunakan program SPSS 15.0 untuk melihat apakah ada perbedaan bermakna dari berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun cabe jawa. Data pada penelitian ini berupa variabel numerik lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan sehingga menggunakan *One-Way ANOVA* jika distribusi normal. Jika distribusi tidak normal maka dengan menggunakan uji *Kruskall-Wallis* dengan taraf kepercayaan 95% (Prayoga, 2013).