

## **BAB III**

### **Metodologi Penelitian**

#### **3.1 Racangan Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian bersifat eksperimental dan bertujuan untuk mengetahui aktifitas antibakteri air perasan daun kitolod (*Isotoma longiflora*) terhadap bakteri *Lactobacillus acidophilus* dengan melalui beberapa tahap yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan dan tahap akhir,

Tahap persiapan merupakan tahap awal yaitu persiapan sampel daun kitolod (*Isotoma longiflora*), alat dan bahan yang akan dibutuhkan dalam penelitian. Tahapan selanjutnya yaitu tahap pelaksanaan, merupakan tahapan pembuatan sampel (air perasan), uji identifikasi fitokimia, pembuatan kontrol negatif (aquadest), kontrol media, sterilisasi alat dan bahan, persiapan bakteri uji *Lactobacillus acidophilus* yang ditumbuhkan pada media MRS-A (*de Mann Rogosa Sharp Agar*). Tahap akhir dari penelitian ini yaitu mengamati zona bening yang dihasilkan dari air perasan daun kitolod (*Isotoma longiflora*) terhadap pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*.

## **3.2 Populasi dan Sampel**

### **3.2.1 Populasi**

Populasi merupakan keseluruhan dari objek yang akan diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah air perasan daun kitolod (*Isotoma longiflora*).

### **3.2.2 Sampel**

Sampel merupakan bagian dari populasi yang diteliti. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagian air perasan daun kitolod (*Isotoma longiflora*).

## **3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**

### **3.3.1 Lokasi**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang.

### **3.3.2 Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan dalam kurun waktu bulan April-Juni 2019.

## **3.4 Definisi Operasional Variabel**

Definisi operasional dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu air perasan daun kitolod (*Isotoma longiflora*). Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini yaitu skrining fitokimia air perasan daun kitolod (*Isotoma longiflora*) dan aktifitas antibakteri air perasan daun kitolod (*Isotoma longiflora*) dengan perbedaan dosis terhadap bakteri *Lactobacillus acidophilus*.

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Sub Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
<b>Variabel Bebas :</b> Air perasan Daun Kitolod ( <i>Isotoma longiflora</i> ).	-	Cairan yang diperoleh dari tumbukan daun kitolod segar dengan penambahan air kemudian diperas.	Gelas Ukur	mL (mililiter)	Nominal
<b>Variabel Terikat :</b> Skrining Fitokimia air perasan daun kitolod ( <i>Isotoma longiflora</i> )	Senyawa Alkaloid	Kandungan metabolit sekunder pada daun kitolod ( <i>Isotoma longiflora</i> )	Warna	- Pereaksi dragendroff : adanya endapan/ kekeruhan hitam - Pereaksi mayer : adanya endapan putih/ kekuningan - Pereaksi wagner : adanya endapan coklat/ kemerahan	Ordinal
	Senyawa Flavonoid			Adanya warna jingga	
Aktifitas antibakteri air perasan daun kitolod ( <i>Isotoma longiflora</i> ) terhadap bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	-	Metode untuk mengukur berapa besar potensial atau konsentrasi suatu senyawa dapat memberikan efek bagi mikroorganismenya.	Jangka Sorong	Diameter zona bening (mm).	Nominal

### 3.5 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi : pisau, timbangan analitik, mortir, stamper, alat saring, tabung reaksi, rak tabung, penjepit tabung, pipet tetes, cawan petri, gelas ukur, Erlenmeyer, batang pengaduk, kaki tiga, lampu spiritus, kawat kasa, jarum ose, kertas coklat, mikro pipet, bluetip, jangka sorong, autoklaf, oven, lemari pendingin, mikroskop, incubator, LAF (*Laminar Air Flow*), Spektrofotometer UV-Vis, desikator.

#### 3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : daun kitolod (*Isotoma longiflora*), bakteri *Lactobacillus acidophilus*, aquadest steril, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pereaksi dragendroff, pereaksi mayer, pereaksi wagner, NaOH, HCl, serbuk Mg, media MRS-A (*de Mann Rogosa Sharp Agar*), kristal violet, iodine, safranin, alkohol, NaCl 0,9%,

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman kitolod (*Isotoma longiflora*) dilakukan oleh LIPI Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi.

#### 3.6.2 Pengambilan Sampel Daun Kitolod

1. Diambil beberapa daun kitolod (*Isotoma longiflora*) segar
2. Dibersihkan dari kotoran, dicuci dengan air mengalir lalu ditiriskan.

### 3.6.3 Pembuatan Ekstrak (Air perasan Daun Kitolod)

1. Diambil daun kitolod untuk masing-masing perlakuan.

<b>Perlakuan Ke-</b>	<b>Prosedur</b>
1	diambil 1 lembar daun kitolod segar setara dengan 0,65 gram
2	diambil 2 lembar daun kitolod segar setara dengan 1,3 gram
3	diambil 3 lembar daun kitolod segar setara dengan 1,95 gram

2. Ditumbuk daun kitolod hingga halus ditambahkan sedikit air.
3. Diperas dan disaring menggunakan *syringe filter*.

### 3.6.4 Uji Identifikasi

#### 3.6.4.1 Senyawa Alkaloid

1. Diambil sebanyak  $\pm 2$  mL air perasan daun kitolod pada masing-masing tabung.
2. Dimasukkan kedalam tabung yang berbeda.
3. Pada masing- masing tabung ditambahkan 5 tetes kloroform dan 5 tetes ammonia
4. Disaring larutan dalam tabung reaksi, dan filtrate ditambahkan  $H_2SO_4$  2N sebanyak 3 tetes.
5. Dikocok filtrat dengan teratur kemudian didiamkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan.
6. Dipindahkan lapisan atas kedalam tiga tabung (Sangi *et all*, 2008)

<b>Tabel Ke-</b>	<b>Prosedur</b>
1	ditetesi dragendorff 2-3 tetes, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan atau kekeruhan (hitam).
2	ditetesi pereaksi mayer 2-3 tetes, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih/kekuningan.
3	ditetesi pereaksi wagner 2-3 tetes, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan coklat kemerahan

#### 3.6.4.2 Senyawa Flavonoid

1. Sebanyak 2 mL sampel air perasan daun kitolod ditambahkan 5 tetes etanol

2. Dipanaskan selama 5 menit dalam tabung reaksi
3. Ditambahkan 0,2 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau jingga.  
(Setyowati, W.A.E, dkk. 2014)

#### 3.6.5 Sterilisasi Alat dan Bahan

1. Disiapkan terlebih dahulu alat dan bahan yang akan digunakan seperti cawan petri, tabung reaksi, Erlenmeyer, beaker glass, bluetip.
2. Semua alat disterilisasikan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm
3. Cawan petri disterilisasi dalam oven dengan suhu 175°C selama 1,5 – 2 jam, yang sebelumnya telah dibungkus dengan kertas coklat..(Rahmawati *et al*, 2013)

#### 3.6.6 Pembuatan Media MRS-A (*de Mann Rogosa Sharp Agar*)

1. Ditimbang MRS-A sesuai kebutuhan menggunakan neraca
2. Diukur aquadest sesuai kebutuhan menggunakan gelas ukur.
3. Dimasukkan kedua bahan dalam *erlenmeyer*, diaduk dan dipanaskan sampai mendidih,
4. Disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
5. Dimasukkan dalam lemari pendingin (Astanti dalam Mega Nawaekasari, 2012)

#### 3.6.7 Peremajaan Bakteri

1. Inokulasi satu ose bakteri *Lactobacillus acidophilus* dari biakan murni kedalam 15 tabung reaksi yang berisi media MRS-A.
2. Diinkubasi dalam incubator pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam.

Untuk memastikan bahwa mikroorganisme yang tumbuh adalah *Lactobacillus acidophilus*, maka perlu dilakukan identifikasi bakteri dengan menggunakan preparat ulas yang diberi pewarnaan gram.

1. Diambil 1 ose dari peremajaan bakteri *Lactobacillus acidophilus* diletakkan pada kaca preparat yang telah diberikan aquadest terlebih dahulu, lalu difiksasi.
2. Ditambahkan Kristal violet pada kaca preparat, diamkan selama 3 menit, kemudian dibilas dengan aquades.
3. Ditambahkan lugol (iodin) pada kaca preparat, diamkan selama 1 menit, dibilas dengan alkohol
4. Ditambahkan fuchsin safranin sesaat lalu dibilas dengan aquades dan dikeringkan.
5. Diamati hasilnya menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi (Agustina dkk, 2007).

#### 3.6.8 Pembuatan Suspensi Bakteri

1. Diambil dengan ose bakteri *Lactobacillus acidophilus* dari kultur persediaan yang diinokulasikan pada media agar miring.
2. Dimasukkan kedalam tabung reaksi berisi larutan NaCl 0,9%
3. Dicampur hingga homogen
4. Kekeruhan suspensi diukur dengan spektrofotometri UV-Vis sesuai dengan panjang gelombang 580 nm dan diperoleh 25%T (Krisyanella dkk, 2016)

#### 3.6.9 Pembuatan Kontrol

##### 3.6.9.1 Kontrol media

1. Dimasukkan media MRS-A hangat kedalam cawan petri
2. Dibungkus kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam

### 3.6.9.2 Kontrol bakteri

1. Dimasukkan suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* kedalam cawan petri menggunakan mikro pipet.
2. Ditambahkan media MRS-A sebanyak 15mL lalu digoyang-goyangkan sesuai dengan angka 8 dan dibiarkan hingga memadat.
3. Dibungkus kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Mega Nawaekasari, 2012)

### 3.6.10 Uji Antimikroba

1. Disiapkan alat dan bahan
2. Dimasukkan suspensi bakteri kedalam cawan petri
3. Ditambahkan media MRS-A sebanyak 15 mL, digoyang-goyangkan sesuai dengan angka delapan dan biarkan memadat.
4. Dibuat 3 lubang sumuran pada tiap cawan petri dengan menggunakan bor (pelubang) steril.
5. Diisi air perasan dengan dosis 0,65 gram pada lubang sumuran pertama, air perasan dengan dosis 1,3 gram pada lubang sumuran kedua dan dosis 1,95 gram pada lubang sumuran ketiga.
6. Media yang telah diberi perlakuan, selanjutnya dimasukkan kedalam desikator untuk menciptakan suasana anaerob selama 30 menit, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
7. Dihitung zona hambatya.

### 3.7 Analisa Data

Dalam penelitian ini analisis data diambil dari hasil pengukuran zona bening yang terjadi pada daerah sekitar sumuran menggunakan jangka sorong. Kemudian data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan dimasukkan kedalam kategori lemah, sedang, kuat, sangat kuat dan tidak ada daya hambatnya berdasarkan frekuensi diameter zona bening. (Hidayati, 2010). Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan program computer SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) for windows. Analisis data menggunakan uji *One Way ANOVA* digunakan untuk membandingkan seluruh kelompok perlakuan, kemudian akan dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* yaitu dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk membandingkan antara kelompok perlakuan apakah berbeda secara signifikan atau tidak.