

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dari bulan April sampai dengan bulan Oktober 2013 di Laboratorium Kimia Riset Makanan dan Material serta di Laboratorium Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas, neraca analitik, juicer, blender, saringan, pemanas listrik, kompor gas, corong buchner, *rotary vacuum evaporator*, autoklaf, laminar air flow, presto, mikropipet, makropipet, kawat ose, lampu spiritus, rotary evaporator vacum (Buchi Rotavapor R-114), spektrofotometer FTIR (Shimadzu, FTIR-8400) dan instrumen spektrofotometer UV-Vis Mini Shimadzu 1240.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sukun muda yang diambil dari perkebunan Balai Pengujian Mutu Konstruksi dan Lingkungan, Dinas Tata Ruang dan Permukiman Provinsi Jawa Barat, beralamatkan di jalan A.H.Nasution No.117 Ujungberung. Bahan lainnya yang digunakan untuk mengekstrak daun sukun adalah air, metanol dan etanol. Bahan yang digunakan dalam pengujian fitokimia adalah  $H_2SO_4$  pekat,  $FeCl_3$  1%, serbuk Mg, HCl pekat, n-heksana, gelatin, KI dan kloroform. Serta bahan yang digunakan dalam pembuatan media dan pembiakan bakteri adalah ekstrak daging sapi, pepton, agar batang dan melon.

#### **3.3 Tahapan Penelitian**

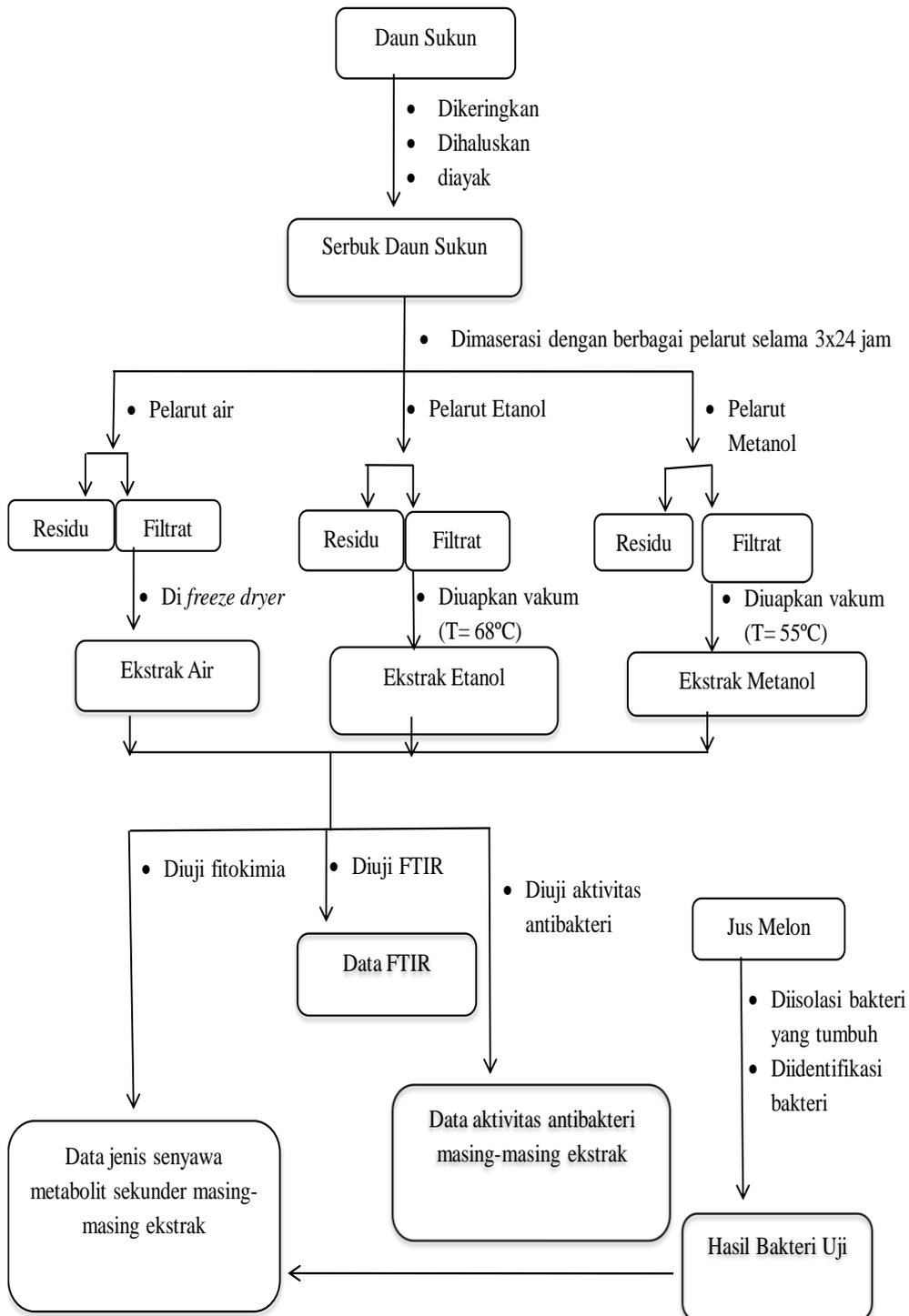
Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu :

1. Tahap penyiapan sampel daun sukun

2. Tahap ekstraksi daun sukun
3. Tahap uji pendahuluan berupa uji fitokimia
4. Tahap pembuatan media nutrisi
5. Tahap isolasi dan identifikasi bakteri
6. Tahap pengujian aktivitas antibakteri

#### **3.4 Bagan Alir Penelitian**

Penelitian yang dilakukan meliputi sembilan tahapan yaitu tahap persiapan sampel daun sukun, tahap ekstraksi daun sukun, tahap uji pendahuluan berupa uji fitokimia, tahap sterilisasi alat, tahap pembuatan media nutrisi, tahap inokulasi bakteri, tahap pengukuran waktu pertumbuhan bakteri optimum dan tahap pengujian aktivitas antibakteri dengan variasi konsentrasi. Bagan alir penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1



Gambar 3. 1 Bagan Alir Penelitian

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Penyiapan Sampel Daun Sukun

Daun sukun muda dipilih untuk pembuatan sampel ekstrak. Lalu disortasi untuk memilih daun sukun dengan kualitas yang baik kemudian bagian yang tidak diperlukan dibuang. Daun sukun dicuci dan dijemur hingga kering dengan sinar matahari. Setelah kering, daun sukun dihaluskan menggunakan blender dan disaring untuk mendapatkan serbuk daun sukun yang halus.

#### 3.5.2 Ekstraksi Daun Sukun

Lima puluh gram serbuk daun sukun dimaserasi dengan 400 mL pelarut metanol selama tiga hari dengan penggantian pelarut setiap harinya, dimaserasi dengan 400 mL pelarut etanol selama tiga hari dengan penggantian pelarut setiap harinya dan dimaserasi juga dengan 400 mL pelarut air selama tiga hari dengan penggantian pelarut setiap harinya. Ekstrak yang diperoleh disaring dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator*.

#### 3.5.3 Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan menggunakan metode menurut Sangi (2008). Setiap sampel diidentifikasi komponen fitokimianya dengan metode pereaksi warna yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam masing-masing sampel. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi :

1. Pemeriksaan Golongan Fenol dan Tanin

Pemeriksaan golongan fenol dan tanin dilakukan dengan cara ekstrak daun sukun diambil sebanyak 1mL masing-masing ditambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Timbulnya warna hijau kehitaman menunjukkan adanya fenol dan saat ditambahkan gelatin membentuk gel yang cukup stabil maka ekstrak mengandung tanin.

2. Pemeriksaan Golongan Flavanoid

Pemeriksaan golongan flavanoid dilakukan dengan cara 1 mL ekstrak ditambahkan 1 gram serbuk Mg dan 10 mL HCl pekat menghasilkan warna creme/kekuningan menunjukkan adanya flavanoid.

### 3. Pemeriksaan Golongan Saponin

Pemeriksaan golongan saponin dilakukan dengan cara mengambil masing-masing ekstrak daun sukun sebanyak 1mL dimasukan kedalam tabung reaksi yang berbeda ditambahkan air panas lalu dikocok kuat atau menggunakan vorteks selama 10 detik. Bila terbentuk busa stabil maka ekstrak mengandung saponin.

### 4. Pemeriksaan Golongan Steroid dan Terpenoid

Pemeriksaan golongan steroid dan terpenoid dilakukan dengan cara sebanyak 1mL masing-masing ekstrak daun sukun ditambahkan dengan 1mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial dan 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

### 5. Pemeriksaa Golongan Alkaloid

Pemeriksaan golongan alkaloid dilakukan dengan cara 1 mL masing-masing ekstrak daun sukun ditambahkan 5 mL kloroform dan beberapa tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.

## 3.5.4 Pembuatan Media Nutrien

Untuk membuat media nutrien agar sebanyak 1000 mL maka komposisi yang digunakan ialah ekstrak daging 3 gram, pepton 5 gram, agar 15 gram dan air 1000 mL. Sebanyak 1000 mL air dan daging dipanaskan hingga mendidih dalam labu erlenmeyer setelah itu disaring sehingga serat daging dan ampas-ampasnya tidak terbawa dalam larutan. Larutan ekstrak daging tersebut dipanaskan kembali dan ditambahkan pepton sebanyak 5 gram hingga larut setelah itu tambahkan agar sebanyak 15 gram, diaduk hingga semua melarut dan berwarna kuning.

Sedangkan pembuatan nutrien broth sebanyak 1000 mL air dan daging 3 gram dipanaskan hingga mendidih lalu disaring untuk mendapatkan larutan yang

bebas dari serat-serat daging. Larutan ekstrak tersebut dipanaskan kembali dan ditambahkan pepton sebanyak 5 gram hingga larut dan berwarna kuning.

### 3.5.5 Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari jus melon buatan sendiri. Buah melon diambil sarinya dengan menggunakan alat *juicer*, lalu jus yang didapat diencerkan menggunakan air sebanyak 5mL hingga pengenceran  $10^{-5}$ . Jus melon yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri dipilih pada pengenceran  $10^{-5}$  yang diambil sebanyak 1 mL lalu dicampurkan kedalam cawan petri dengan 15mL media yang dibiarkan memadat. Setelah memadat, cawan petri tersebut dilapisi kertas untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi dan diinkubasi selama 2-3 hari.

Bakteri terbentuk pada media nutrisi agar dengan beragam warna yaitu kuning, putih hingga coklat. Serta memiliki ragam bentuk diantaranya bulat dan tak beraturan. Bakteri yang dipilih untuk diujikan ialah bakteri berwarna kecoklatan dengan bentuk tak beraturan yang diambil sebanyak satu ose kemudian diinokulasi kembali khusus untuk spesies tersebut dengan metode gores. Setelah dikultur untuk satu jenis bakteri tersebut kemudian dilakukan pengujian identifikasi bakteri untuk mengetahui spesies bakteri yang terdapat dalam jus melon tersebut.

### 3.5.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Dalam menentukan aktivitas antibakteri dilakukan uji difusi cakram yaitu menumbuhkan terlebih dahulu bakteri ke dalam media nutrisi broth dengan cara mengambil 1 ose bakteri dalam media nutrisi agar dicampurkan kedalam 25 mL nutrisi broth dan diinkubasi selama 2 jam. Setelah itu media nutrisi agar dituangkan kedalam cawan petri dan tambahkan suspensi bakteri sebanyak 1 mL lalu diaduk hingga homogen tunggu sampai memadat. Setelah memadat letakkan kertas cakram dipermukaan atas media padat yang telah dibagi menjadi enam daerah. Setelah itu tambahkan masing-masing ekstrak daun sukun sebanyak 1µL

pada kertas cakram dengan variasi ekstrak yang berbeda mulai dari 1000 ppm, 1500 ppm dan 2000 ppm dengan pengerjaan triplo. Dibungkus kembali dengan kertas untuk meminimalisir kontaminasi.

