

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental, dengan delapan kelompok perlakuan yaitu ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan konsentrasi 10%, 30%, 50% dan ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan konsentrasi 10%, 30%, 50% serta perlakuan terhadap kelompok kontrol yaitu kontrol positif (Kloramfenikol 30 µg) dan kontrol negatif (DMSO). Variabel bebas adalah konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dan ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Sedangkan variabel terikatnya yaitu zona hambat bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Pengulangan pada penelitian ini adalah (Hanafiah, 2001:6)

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(8-1)(r-1) \geq 15$$

$$7r-7 \geq 15$$

$$7r \geq 15+7$$

$$r \geq 3,33$$

Keterangan : r = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

15 = tetapan yang telah ditentukan

Berdasarkan perhitungan jumlah pengulangan tersebut, jumlah pengulangan yang dapat dilakukan yaitu sebanyak  $\geq 3,33$  kali. Dimana dari hasil tersebut peneliti akan melakukan pengulangan sebanyak 4 kali.

#### B. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan konsentrasi 10%, 30%, 50% dan ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan konsentrasi 10%, 30%, 50%.

#### C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang untuk melakukan proses identifikasi

tanaman, proses ekstraksi, uji skrining fitokimia dan pengujian aktivitas antibakteri serta Laboratorium Kimia Organik Universitas Lampung untuk melakukan evaporasi. Waktu penelitian ini dilaksanakan pada Maret-Mei tahun 2021.

#### D. Pengumpulan Data

##### 1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (*Quattro*), beaker glass 1000 ml, beaker glass 100 ml, gelas ukur 100 ml, labu ukur 5,0 ml, tabung reaksi, erlenmeyer 100 ml, kaca arloji, batang pengaduk, oven (*Gemmy888 YCO-010*), autoklaf (*Equitron*), inkubator (*Equitron*), lampu spiritus, cawan petri dish, cawan penguap, *hot plate (IKA C-MAG H57)*, blender (*Nima*), ose, pinset, corong gelas, spatula, jangka sorong, *rotary evaporator (IKA RV8)*.

##### 2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*), Aquadest, Etanol, *Nutrient Agar (NA)*, *Nutrient Broth (NB)*, *Mueller Hinton Agar (MHA)*, DMSO, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, BaCl<sub>2</sub> 1%, NaCl 0,9%, HCl 2N, Pereaksi Meyer, Pereaksi Bouchardat, Pereaksi Dragendrof, Serbuk Mg, HCl (P), n-Heksan, H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (P), Gelatin 1%, NaCl 10%, alumunium foil, kapas steril, disc kosong, disc kloramfenikol 30 µg, kertas tempel, kertas saring, kertas buram.

##### 3. Prosedur Kerja Penelitian

###### a. Dilakukan Identifikasi Tanaman Belimbing Wuluh

Tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) banyak tumbuh di mana-mana, baik karena sengaja ditanam di pekarangan rumah maupun tumbuh secara liar di ladang dan hutan. Daun dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) didapatkan di daerah Singgah Pai, Kecamatan Rajabasa. Identifikasi tanaman dilakukan oleh peneliti berdasarkan literatur yaitu buku *Khasiat dan Manfaat Belimbing Wuluh (2011)*. Identifikasi ini dilakukan untuk mengidentifikasi kebenaran sampel daun dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*).

b. Dilakukan Pembuatan Simplisia Daun dan Buah Belimbing Wuluh

- 1) Diambil daun dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) di daerah Singgah Pai, Kecamatan Rajabasa. Daun yang diambil yaitu daun yang segar, berwarna hijau dan terletak di baris ke-4 hingga ke-10 pada sederetan daun yang berjumlah sekitar 10 hingga 14 daun. Sedangkan, buah yang diambil yaitu buah yang segar, berwarna hijau, dan berukuran panjang  $\geq 4$  cm.
- 2) Dilakukan sortasi basah dengan memisahkan daun dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dari kotoran dan bahan asing lainnya.
- 3) Dicuci bersih daun dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menggunakan air mengalir.
- 4) Dilakukan perajangan daun dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) untuk memperkecil ukurannya.
- 5) Daun belimbing wuluh dan buah belimbing wuluh yang telah dirajang diletakkan di atas nampan kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 40°C.
- 6) Dilakukan sortasi kering dengan cara pemilihan daun dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dari bahan yang rusak atau terkena kotoran.
- 7) Diperhalus masing-masing daun dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan menggunakan blender menjadi serbuk kering.
- 8) Daun dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang sudah halus diayak menggunakan ayakan No. 60.

c. Dilakukan Ekstraksi Daun dan Buah Belimbing Wuluh

- 1) Disiapkan wadah yaitu bejana yang digunakan untuk maserasi.
- 2) Ditimbang masing-masing serbuk kering daun dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) sebanyak 300 gram pada neraca analitik, dimasukkan ke dalam wadah.
- 3) Ditambahkan masing-masing 2100 ml etanol 96% hingga semua daun dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terendam larutan tersebut dan diamkan selama 72 jam dan diaduk setiap 24 jam.
- 4) Kemudian disaring menggunakan kertas saring dan dipisahkan antara hasil saringan dan endapan.

- 5) Direndam kembali endapan tersebut dengan 1050 ml etanol 96% selama 48 jam dan diaduk setiap 24 jam lalu dilakukan kembali pengulangan
- 6) Lalu disaring kembali, dan dicampurkan semua maserat yang diperoleh.
- 7) Semua maserat dikumpulkan dan diuapkan dengan *rotary evaporator*, hingga diperoleh ekstrak kental.

d. Dilakukan Skrining Fitokimia

1) Uji Alkaloid

0,5 gram ekstrak ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, lalu dipanaskan diatas tangas air selama 2 menit, dinginkan lalu saring. Filtrat digunakan untuk percobaan berikut :

- a) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer akan menghasilkan endapan putih / kuning.
- b) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat akan menghasilkan endapan coklat hitam.
- c) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorf akan menghasilkan endapan merah bata.

Apabila terdapat endapan putih paling sedikit 2 atau 3 dari pengujian diatas, maka ekstrak dinyatakan mengandung alkaloid (Marjoni, 2016:8).

2) Uji Flavonoid

1 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 ml air panas. Campuran kemudian didihkan kurang lebih 5 menit, kemudian disaring ketika panas. Sebanyak 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk Mg, 1 ml HCl pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok, dan biarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Marjoni, 2016:10).

3) Uji Saponin

0,5 gram ekstrak dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air suling panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa yang selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes larutan HCl 2 N, apabila buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Marjoni, 2016:12).

#### 4) Uji Steroid / Terpenoid

Sebanyak 1 gram ekstrak dimaserasi dengan 20 ml n-heksan selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap. Pada sisa ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Senyawa steroid ditunjukkan dengan warna ungu atau merah, dan senyawa terpenoid ditunjukkan dengan warna hijau biru (Marjoni, 2016:13).

#### 5) Uji Tanin

Sebanyak 1 g ekstrak ditambahkan dengan 10 ml air panas, kocok, lalu tambahkan 5 tetes NaCl 10% , kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan gelatin 1% . Adanya endapan menunjukkan positif tanin (Endarini, 2016:134).

#### e. Dilakukan Pewarnaan Gram

- 1) Dibersihkan kaca objek menggunakan kapas alkohol 70%.
- 2) Diberi tanda pada kaca objek bagian belakang.
- 3) Ditetaskan NaCl 0,9 % pada kaca objek.
- 4) Dipijarkan ose hingga pijar menggunakan lampu spiritus kemudian diambil bakteri dari tabung 2-3 mata ose , lalu diratakan bagian depan kaca objek yang telah diberi tanda. Ose yang telah digunakan dibakar lagi.
- 5) Difiksasi kaca objek pada lampu spiritus hingga sampel kering kemudian dibiarkan hingga dingin.
- 6) Ditetaskan gram A (violet) pada sampel ditunggu hingga 2 menit lalu dibilas dengan meneteskan air pada kaca objek
- 7) Ditetaskan gram B (lugol) pada sampel, ditunggu hingga 1 menit lalu dibilas dengan meneteskan air pada kaca objek.
- 8) Ditetaskan gram C (alkohol 96%) pada sampel ditunggu hingga 30 detik lalu bilas dengan air pada kaca objek.
- 9) Ditetaskan gram D (safranin) pada sampel, ditunggu hingga 30 detik lalu bilas dengan air pada kaca objek, lalu dikeringkan kaca objek.
- 10) Diamati sampel menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali dengan ditetesi minyak anisol.

f. Dilakukan Sterilisasi Alat

Semua alat yang terbuat dari kaca dicuci bersih dan dikeringkan, setelah itu dibungkus dengan kertas buram. Sterilisasi dilakukan dengan oven pada suhu 160°C selama 1 jam, sedangkan jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara pemijaran (Hamidy; dkk, 2006). Untuk bahan seperti media dan aquades setelah dilarutkan, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditutup dengan kapas dan alumunium foil, lalu dimasukkan autoklaf dan disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

g. Dilakukan Pembuatan Larutan Uji

- 1) Masing-masing ekstrak yang didapat dari daun dan buah yang sudah diuapkan, ekstrak kental dianggap sebagai ekstrak dengan konsentrasi 100% sebagai larutan induk.
- 2) Dari larutan induk tersebut dibuat larutan konsentrasi 50% kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 10% dan 30% dengan ditambahkan DMSO.
- 3) Pengenceran konsentrasi 10%, dan 30% digunakan metode pengenceran bertingkat menggunakan rumus:

$$V1 \cdot \%1 = V2 \cdot \%2$$

Keterangan :

V1 : Jumlah volume yang digunakan (ml)

V2 : Jumlah volume yang diinginkan (ml)

%1 : Konsentrasi yang tersedia (%)

%2 : Konsentrasi yang akan dibuat (%)

h. Dilakukan Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

Ditimbang Mueller Hinton Agar sebanyak 8,5 gram dalam 250 ml aquades kemudian dipanaskan pada hot plate hingga larut kemudian ditutup dengan kapas yang dibungkus alumunium foil, lalu disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, dan dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 45°C-50°C dan dituangkan ke dalam cawan petridish (Safitri dan Novel, 2010).

i. Dilakukan Pembuatan *Nutrient Agar Slant* (NAS)

Ditimbang Nutrient Agar sebanyak 1 gram dalam 50 ml aquadest kemudian, dipanaskan pada hot plate hingga larut kemudian ditutup dengan kapas yang dibungkus aluminium foil, lalu disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, dan dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 40°C-45°C kemudian dimiringkan (Safitri dan Novel, 2010).

j. Dilakukan Pembuatan *Nutrient Broth* (NB)

Ditimbang Nutrient Broth sebanyak 0,32 gram dalam 40 ml aquadest lalu, dipanaskan pada hot plate hingga larut kemudian, ditutup dengan kapas yang dibungkus aluminium foil, lalu disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, dan dibiarkan selama beberapa menit hingga suhu media 40°C-45°C kemudian masukkan kedalam tabung reaksi (Safitri dan Novel, 2010).

k. Dilakukan Pembuatan Standar Mcfarland 0,5

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sebanyak 9,95 ml dicampurkan dengan larutan BaCl 1% sebanyak 0,05 ml, lalu dikocok hingga homogen. Sebelum menggunakan kocok terlebih dahulu agar larutan merata (Dalynn Biologicals, 2002).

l. Dilakukan Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil dua mata ose biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang telah diremajakan pada media *Nutrient Agar Slant* (NAS) disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 ml media *Nutrient Broth* (NB) kemudian kocok hingga homogen dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri tersebut kekeruhannya dibandingkan dengan larutan standar Mcfarland 0,5 apabila suspensi bakteri keruh maka ditambahkan NaCl 0,9% steril, jika kurang keruh ditambahkan bakteri hingga kekeruhannya sama dengan standar Mcfarland (Nuria, 2010).

m. Dilakukan Pengujian Aktivitas dan Efektivitas Antibakteri

- 1) Alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan terlebih dahulu.
- 2) Lidi kapas steril dimasukkan ke suspensi bakteri yang sudah disamakan

kekeruhannya dengan standar Mcfarland 0,5 selama 10-15 detik.

- 3) Lidi kapas diangkat dan diperas dengan cara ditekan pada dinding bagian dalam tabung sambil diputar-putar.
- 4) Lidi kapas dipulaskan pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) sampai merata.
- 5) Media yang telah dipulaskan dibiarkan selama 15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam media.
- 6) Kemudian dilakukan proses penempelan disk kontrol positif dan disk yang telah ditetesi kontrol negatif, ekstrak daun dan ekstrak buah dengan konsentrasi 10%, 30% dan 50% di atas pulasan bakteri pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) menggunakan pinset steril dengan cara ditekan satu persatu supaya disk cakram menempel dengan baik pada media, lalu diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37° C selama 24 jam.
- 7) Dilakukan pengukuran zona hambat pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) pada setiap konsentrasi yang ditandai dengan adanya daerah bening menggunakan alat ukur jangka sorong dengan satuan milimeter (mm).
- 8) Dicatat dan didokumentasikan sebagai salah satu bukti pada penelitian ini dan dilanjutkan pengumpulan data yang diperoleh kemudian dimasukkan kedalam tabel (Iswara, 2015).

#### **4. Pengolahan dan Analisis Data**

Data-data hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel hasil penelitian berupa diameter zona hambat dalam satuan mm (millimeter) pada masing-masing konsentrasi, untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan nyata antara ekstrak daun serta buah terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* menggunakan uji statistik ANOVA (*Analysis of Variance*). Apabila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil).