

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan di Laboratorium Teknobia-Industri dan Laboratorium Teknobia-Pangan Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Selain itu pengujian kadar total tanin ekstrak etanol daun randu juga telah dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi Prodi Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan mulai pada bulan Februari sampai Juli 2016. Jadwal penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

B. Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *Laminair Air Flow* ESCO, erlemeyer, petridish, tabung reaksi, rak tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, gelas ukur, gelas beker, panci, pisau, blender MIYAKO, corong gelas, kertas saring, pinset, mikroskop RRC L-301, autoklaf STMN-Y222 OMRON, *microwave* Panasonic, inkubator Memmert, oven Venticell, *rotary evaporator* RV06-ML KIKA WERKE, pipet ukur, pro-pipet, mikropipet BIOHIT, tips, jarum ose, jarum enten, kapas, karet gelang, label, *aluminium foil*, tissue, lampu spiritus, korek api, kompor, sprayer, timbangan elektrik AL204, *vortex* 37600 Mixer Termolyne, kertas payung, *plasticwrap*, karet, label, tabung Durham, blender Maspion MT-1207, ayakan 90 mesh, trigalski, pembolong kertas, corong, kertas

saring, penggaris, *hair dryer*, *inkubator shaking* JSR-JSSI-300C, kamera HP, dan *waterbath* MEMMERT .

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun randu segar sebanyak 2 kg yang diperoleh dari pekarangan Bapak Atmo di Jalan Wonosari Banguntapan, Yogyakarta. Bahan lain yang digunakan antara lain berupa isolat *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, medium CHROMagar *Staphylococcus aureus*, vankomisin disk, cefoxitin disk, medium *Müller-Hinton*, akuades steril, etanol 70%, alkohol 70%, medium *Nutrient Agar*, medium *Nutrient Broth*, pati, cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D, minyak emersi, H₂O₂3%, FeCl₃ 1%, metanol 30%, larutan H₂SO₄, kloroform, amoniak, larutan Dragendorff, reagen Meyer, reagen Wagner, larutan Lieberman, asetat anhidrat, Standard McFarland 0,5, larutan indigokarmin, larutan KMNO 0,1 N, larutan gelatin, larutan NaCl, dan serbuk kaolin.

C. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan variasi konsentrasi ekstrak dan lima (5) kali ulangan pada setiap perlakuan yang diujikan pada bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Kontrol positif menggunakan vankomisin dan kontrol negatif menggunakan DMSO. Rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Variasi Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Randu terhadap Zona Hambat Bakteri Uji.

Perlakuan	Ulangan	Bakteri
		MRSA
Konsentrasi ekstrak 100%	1	E11S
	2	E12S
	3	E13S
	4	E14S
	5	E15S
Konsentrasi ekstrak 75%	1	E71S
	2	E72S
	3	E73S
	4	E74S
	5	E75S
Konsentrasi ekstrak 50%	1	E51S
	2	E52S
	3	E53S
	4	E54S
	5	E55S
Konsentrasi ekstrak 25%	1	E21S
	2	E22S
	3	E23S
	4	E24S
	5	E25S
Kontrol negatif (DMSO)	1	DM1S
	2	DM2S
	3	DM3S
	4	DM4S
	5	DM5S
Kontrol positif (Vankomisin)	1	VA1S
	2	VA2S
	3	VA3S
	4	VA4S
	5	VA5S

Keterangan: E1 = Ekstrak daun randu dengan konsentrasi 100%

E7 = Ekstrak daun randu dengan konsentrasi 75%

E5 = Ekstrak daun randu dengan konsentrasi 50%

E2 = Ekstrak daun randu dengan konsentrasi 25%

DM= Kontrol negatif (DMSO)

VA= Kontrol positif (Vankomisin disk)

D. Tahap Pelaksanaan

1. Pengeringan dan pembuatan serbuk daun randu (Mpila dkk., 2012 dengan modifikasi)

Daun randu segar sebanyak 2 kg dicuci dengan air mengalir. Daun dikeringkan pada suhu ruang (25-27°C). Daun randu dipilih dengan kriteria daun randu berumur tua yang masih segar dengan panjang 10-20 cm. Daun yang telah kering dipotong kecil-kecil dengan pisau kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 55°C. Daun yang sudah benar-benar kering kemudian dibuat serbuk menggunakan *Mealler machine*. Hasil serbuk yang dihasilkan diayak menggunakan ayakan dengan ukuran 43 mesh hingga diperoleh serbuk yang halus dan seragam.

2. Ekstraksi daun randu dengan metode maserasi (Cappucinno dan Sherman, 2011 dengan modifikasi)

Serbuk daun randu sebanyak 50 gram dimaserasi dengan cara direndam dalam pelarut etanol 70% sebanyak 250 ml (perbandingan 1:5) selama 24 jam pada suhu ruang (25-27°C) menggunakan inkubator shaker dengan kecepatan 150 rpm. Sampel disaring dengan kertas saring. Residu yang diperoleh dari hasil penyaringan dimaserasi kembali dengan cara yang sama sebanyak 2 kali. Hasil maserasi yang diperoleh, ditampung menjadi satu dan diuapkan untuk memisahkan pelarutnya. Penguapan dilakukan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 78°C kemudian diuapkan dengan menggunakan *waterbath* dengan suhu 78°C hingga didapatkan ekstrak kental daun randu.

3. Pembuatan medium pertumbuhan bakteri uji

a. Medium *Nutrien Agar* (NA) (Jutono dkk., 1980 dengan modifikasi)

Serbuk NA ditimbang sebanyak 2,8 g kemudian dilarutkan dalam 100 ml akuades steril pada erlenmeyer, lalu diaduk menggunakan gelas pengaduk, kemudian dipanaskan menggunakan *microwave* hingga homogen. Medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm, selama 15 menit. Medium didinginkan pada suhu ruang (25°C) hingga mengeras.

b. Medium *Nutrien Broth* (Thiel, 1999)

Serbuk NB sebanyak 8 g dilarutkan dalam 1 liter akuades steril. Medium kemudian dipanaskan menggunakan *microwave*. Medium selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm, selama 15 menit.

c. Medium *Müller-Hinton Agar* (MHA) (Ramadanti, 2008)

Serbuk Muller Hinton Agar sebanyak 3,8 gram dilarutkan dalam 100 ml aquades steril. Medium dipanaskan menggunakan *microwave* hingga mendidih dan disterilkan selama 15 menit menggunakan autoklaf dengan tekanan udara 1 atm dan suhu 121°C.

4. Sterilisasi alat dan medium (Jutono dkk., 1980)

Alat-alat dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas payung. Tabung reaksi dan erlenmeyer yang berisi medium ditutup dengan kapas dan kertas payung. Alat dan bahan yang akan disterilisasi dimasukkan ke dalam

autoclave dan dipanaskan pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit untuk medium dan 20 menit untuk alat.

6. Uji kemurnian bakteri

a. Pengamatan morfologi sel (Harley dan Prescott, 2002 dengan modifikasi)

Gelas benda dibersihkan dengan alkohol 70%. Biakan bakteri uji diambil sebanyak 1 ose, kemudian dioleskan pada gelas benda. Larutan cat Gram A (*Hucker's violet*) ditetaskan pada gelas benda, didiamkan selama 1 menit, dibilas dengan akuades, lalu dikeringkan. Larutan cat Gram B (*Lugol's iodine*) ditetaskan dan dibiarkan 1 menit, dibilas dengan akuades, lalu dikeringkan. Larutan cat Gram C (alkohol) ditetaskan dan dibiarkan 30 detik, dibilas dengan akuades, lalu dikeringkan. Larutan cat Gram D (*Safranine*) ditetaskan dan dibiarkan 2 menit, dibilas dengan akuades, lalu dikeringkan. Warna dan bentuk sel diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 45 x 10, lalu difoto menggunakan kamera HP.

b. Pengamatan morfologi koloni (Harley dan Prescott, 2002 dengan modifikasi)

Biakan mikrobial uji diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan pada medium NA petri dengan metode *spread plate*. Biakan mikrobial uji juga diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan pada medium NB. Mikrobial uji diambil menggunakan jarum enten, lalu ditusukkan pada medium NA tegak sedalam 2/3 bagian tabung reaksi. Seluruh medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati warna, bentuk koloni, tepi, motilitas, dan sifatnya terhadap udara.

c. Uji katalase (Cappucinno dan Sherman, 2011)

Gelas benda dibersihkan secara aseptis menggunakan alkohol. Satu ose biakan mikrobial diambil dari koloni biakan dan dipindahkan pada gelas benda yang sudah dibersihkan. Ditetesi hidrogen peroksida (H_2O_2) kemudian diamati adanya gelembung udara atau tidak. Hasil positif menunjukkan adanya gelembung udara.

d. *Cefoxitine disc diffusion test* (Putra, 2012 dengan modifikasi)

Biakan bakteri diinokulasikan pada medium MH dengan cara *spread plate*. Cakram Cefoxitine 30 μ g diletakkan pada permukaan medium kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang dihasilkan di sekitar cakram diukur. Dinyatakan resisten bila diameter zona hambat ≤ 14 mm, intermediet bila zona hambat 15-17 mm, dan sensitif bila zona hambat ≥ 18 mm.

7. Perbanyak bakteri uji (Cappucino dan Sherman, 2011 dengan modifikasi)

Kultur mikrobial yang dihasilkan dari tahap uji kemurniannya, kemudian diinokulasikan pada medium NA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, isolat bakteri hasil perbanyak diambil sebanyak 1-2 ose kemudian dimasukkan ke dalam 20 ml medium NB dan diinkubasi menggunakan *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 37°C.

8. Identifikasi kandungan kimia tumbuhan secara kualitatif

a. Uji Alkaloid (Harbone, 1987 dengan modifikasi)

Ekstrak daun randu sebanyak 0,2 g ditambah dengan 5 ml kloroform dan 3 tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan 2 tetes H_2SO_4 2M. Fraksi asam dibagi menjadi 3 tabung yang masing-masing ditambah pereaksi

Dragendorff, Meyer, dan Wagner. Alkaloid pada sampel ditandai dengan adanya endapan putih pada pereaksi Meyer, endapan merah pada pereaksi Dragendorff, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner.

b. Uji Flavonoid (Ayoola dkk., 2008 dan Shanmugam dkk., 2010 dengan modifikasi)

Ekstrak daun randu sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu larutan amonia sebanyak 2,5 ml juga ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Asam sulfat pekat sebanyak 0,5 ml ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan divortex. Warna kuning yang selanjutnya akan memudar merupakan hasil positif dari uji flavonoid tersebut.

c. Uji Tanin (Ayoola dkk., 2008 dan Evans, 2009 dengan modifikasi)

Ekstrak daun randu sebanyak 0,2 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah aquades sebanyak 1-2 ml dan FeCl_3 1% sebanyak 2 tetes. Reaksi positif uji tanin ditandai dengan terlihatnya warna hijau kebiruan pada sampel.

d. Uji Saponin (Harborne, 1998 dengan modifikasi)

Ekstrak daun randu sebanyak 0,1 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambah aquades sebanyak 3-4 ml, lalu dikocok selama kurang lebih 30 detik.

Reaksi positif ditandai oleh terbentuknya buih yang stabil kurang lebih 1-3 cm.

e. Uji Triterpenoid dan Steroid (Ayoola dkk., 2008 dan Shanmugam dkk., 2010 dengan modifikasi)

Ekstrak daun randu sebanyak 10 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah kloroform sebanyak 3 ml. Reagen Liebermen Burchard (asetat anhidrat 3 tetes dan H_2SO_4 pekat 1 tetes) ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Perubahan warna

menjadi merah menandakan adanya triterpenoid, sedangkan warna hijau menandakan adanya steroid.

9. Penentuan Kadar Tanin dengan metode Lowenthal-Procter (Sudarmadji dkk., 1984)

Satu gram ekstrak ditambah 80 ml akuades kemudian didihkan selama 30 menit. Setelah dingin, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambah akuades sampai tanda batas, larutan disaring untuk mendapatkan filtrat 1. Filtrat diambil 2 ml, ditambah dengan 5 ml larutan indigokarmin dan 150 ml akuades, kemudian dititrasasi dengan larutan KMnO_4 0,1 N sampai warna kuning emas (misal A ml). Selanjutnya diambil 20 ml filtrat 1 ditambah berturut-turut 10 ml larutan gelatin, 20 ml larutan garam asam, 2 gram serbuk kaolin kemudian digojog selama beberapa menit dan disaring (filtrat 2). Filtrat 2 diambil 5 ml, dicampur dengan larutan indigokarmin sebanyak 5 ml dan akuades 150 ml, selanjutnya titrasi dengan larutan KMnO_4 0,1 N dibutuhkan B ml.

Standarisasi larutan dengan Na Oksalat

Perhitungan :

$$1 \text{ ml } 0,1 \text{ N} = 0,00416 \text{ g tanin}$$

$$\text{Kadar tannin} = \frac{(50A-50B) \times N / 0,1 \times 0,00416 \times 100\%}{5}$$

10. Pembuatan Standard McFarland 0,5 (Wiegand dkk., 2008)

Larutan barium klorida dihidrat ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dengan konsentrasi 1,175% (b/v) dan larutan H_2SO_4 1% (v/v) disiapkan. Larutan barium klorida tersebut diambil sebanyak 0,5 ml dan direaksikan dengan 99,5 ml larutan asam sulfat 1%. Larutan diaduk hingga homogen, lalu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer

UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm hingga terbukti bahwa absorbansinya berada pada rentang 0,08-0,13. Larutan standar dimasukkan ke dalam tabung, lalu ditutup rapat. Turbiditas larutan standard tersebut setara dengan suspensi bakteri yang mengandung $1,5 \times 10^8$ sel/ml.

11. Uji antibakteri berdasarkan luas zona hambat (Parhusip dkk 2005 dengan modifikasi)

Kultur mikrobial uji berumur 24 jam (turbiditas setara dengan standard McFarland 0,5) diambil sebanyak 100 μ l dan diinokulasi ke medium NA dengan metode *spread plate*. Sumuran medium dibuat menggunakan perforator nomor 3 (diameter 6 mm). Masing-masing larutan uji berupa ekstrak etanol daun randu (konsentrasi 25, 50, 75, dan 100%) diambil sebanyak 50 μ l dan dimasukkan pada masing-masing sumuran. Satu sumuran lain diisi DMSO sebanyak 50 μ l sebagai kontrol negatif, sedangkan untuk kontrol positif digunakan vankomisin disk 30 μ g. Inokulan kemudian diinkubasi pada suhu selama 24 jam.

Menurut Volk dan Wheeler (1993), luas zona hambat dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Luas zona hambat} = 3,14 \times \left(\frac{d_2}{2}\right)^2 - \left(\frac{d_1}{2}\right)^2$$

Keterangan : d1 : diameter sumuran (cm)

d2 : rata-rata diameter zona hambat (cm)

12. Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) (Wiegand dkk., 2008 dan Jayakumari dkk., 2014 dengan modifikasi)

Penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum dilakukan dengan metode dilusi agar. Tabung reaksi sebanyak 4 buah yang berisi medium *nutrient broth* masing-masing sebanyak 1 ml ditambahkan perlakuan berupa seri pengenceran ekstrak daun randu dengan pelarut konsentrasi 25, 50, 75, dan 100% sebanyak 100 µl pada masing-masing tabung. Selain itu disiapkan juga kontrol negatif berupa DMSO dan kontrol positif berupa larutan vankomisin. Biakan bakteri 10 µl (dengan turbiditas setara McFarland 0,5) diinokulasikan ke dalam masing-masing tabung (1:100), lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi selama 24 jam, medium uji KHM diambil sebanyak 100 µl lalu diinokulasikan pada medium NA petri menggunakan metode *spread plate*. Medium kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, dilakukan penghitungan jumlah koloni bakteri pada masing-masing seri pengenceran dan medium kontrol. Konsentrasi ekstrak terkecil yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri ditetapkan sebagai KHM.

13. Analisis data (MacFarland, 2014)

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANAVA dengan tingkat kepercayaan 95%. Apabila hasil ANAVA menunjukkan hasil yang beda nyata, analisis dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui beda nyata antarperlakuan. Analisis ANAVA dan DMRT dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16.0.