

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan di Laboratorium Teknobia-Industri Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Februari 2016 sampai Juli 2016.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *Laminair Air Flow* ESCO, *vortex 37600* Mixer Termolyne, autoklaf Hirayama HVE-50, *microwave* Panasonic, cawan petri Pyrex, erlenmeyer Pyrex, corong, gelas ukur, gelas beker, batang pengaduk, *oven* Venticell, *waterbath*, *rotary evaporator* RV06-ML Kika Werke, timbangan elektrik AL204, tabung reaksi, jarum ose, jarum enten, rak tabung reaksi, pipet ukur, propipet, lampu spiritus, trigalski, mikropipet Biohit, mikrotip, *moisture balancing* PMB 53, blender Maspion, *microwave* Panasonic, plastik *wrap*, *aluminium foil*, karet, *sprayer*, GCMS Shimadzu, label, *hair dryer* Airlux, cawan porselin, tisu, korek api, panci, kertas saring, gelas beker, kompor gas Rinnai, sendok, pisau, ayakan dengan mesh 90, talenan, nampan, tempat pembuangan tip, penjepit tabung reaksi, pinset, inkubator Memmert, kertas payung, mikroskop L-301, kamera digital Canon dan plastik,

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun namnam sebanyak 5 kg diambil dari petani di Purworejo, Jawa Tengah, isolat

Pseudomonas aeruginosa, dan *Staphylococcus epidemidis*, ampisilin disk 500 mg, etil asetat, akuades steril, alkohol 70 %, medium Nutrient Agar, medium Nutrient Broth, cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D, medium glukosa, medium sukrosa, medium laktosa, cat nigrosin, minyak emersi, H₂O₂ 3 % , larutan Ehrlich, eter, deterjen, FeCl₃, akuades, metanol 30 %, kloroform, amoniak, reagen Dragendorf, reagen Meyer, reagen Wagner, eter, reagen Lieberman, metanol, n-heksan, etil asetat, anisaldehyd, H₂SO₄, FeCl₃, sitroborat dan asetat anhidrat.

C. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Kelompok dengan perlakuan variasi pengenceran dan lima (5) kali ulangan pada setiap perlakuan yang diujikan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis*. Kontrol positif menggunakan ampisilin dan kontrol negatif menggunakan DMSO. Rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 2.

D. Pelaksanaan

1. Pemilihan daun namnam (Hidayati,2015)

Daun namnam yang digunakan diambil dari petani di daerah Purworejo dengan umur pohon 5 tahun. Daun yang diambil adalah daun yang berwarna hijau tua.

2. Penentuan waktu pengeringan daun namnam

Pengeringan daun namnam dilakukan pada suhu 50 °C dengan menggunakan oven selama 2-3 hari (Sembiring dkk., 2012). Pada proses

pengeringan dilakukan pengukuran kadar air menggunakan *moisture balancing*. Proses pengeringan dihentikan bila kadar air yang tertera pada *moisture balancing* di bawah 10 %.

3. Pembuatan serbuk daun namnam (Rivai dkk, 2010)

Daun namnam yang akan digunakan dicuci untuk menghilangkan kotoran kemudian ditiriskan. Daun namnam dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50 °C. Daun yang telah kering kemudian dibuat serbuk menggunakan *mealer machine* lalu diayak menggunakan ayakan dengan ukuran 90 mesh.

4. Ekstraksi daun namnam (Hidayati, 2015 dengan modifikasi).

Serbuk daun namnam diambil sebanyak 100 gram dan direndam dengan menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 500 ml (perbandingan 1 : 5 (w/v)) selama 5 hari, kemudian pada hari ke 3 disaring sehingga diperoleh filtrat I dan debris I. Debris I dimaserasi kembali dalam pelarut dengan perbandingan 1: 5 (w/v) selama 48 jam. Setelah itu, disaring lagi untuk mendapatkan filtrat II dan debris II. Selanjutnya, filtrat I dan II digabungkan kemudian pelarut diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Suhu yang digunakan untuk proses penguapan menggunakan *rotary evaporator* sebesar 77 °C. Berat ekstrak dan rendeman daun namnam yang diperoleh dihitung dengan rumus :

Berat ekstrak (gram) = (berat cawan+berat ekstrak) – berat cawan kering

$$\text{Rendeman} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

Tabel 2. Pengaruh Variasi Pengenceran Ekstrak Daun Namnam terhadap Zona Hambat Bakteri Uji

Konsentrasi Ekstrak	Ulangan	Bakteri	
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. epidermidis</i>
20%	1	P20PA1	P20SE1
	2	P20PA2	P20SE2
	3	P20PA3	P20SE3
	4	P20PA4	P20SE4
	5	P20PA5	P20SE5
40%	1	P40PA1	P40SE1
	2	P40PA2	P40SE2
	3	P40PA3	P40SE3
	4	P40PA4	P40SE4
	5	P40PA5	P40SE5
60%	1	P60PA1	P60SE1
	2	P60PA2	P60SE2
	3	P60PA3	P60SE3
	4	P60PA4	P60SE4
	5	P60PA5	P60SE5
80%	1	P80PA1	P80SE1
	2	P80PA2	P80SE2
	3	P80PA3	P80SE3
	4	P80PA4	P80SE4
	5	P80PA5	P80SE5
Kontrol Positif	1	K+PA1	K+SE1

	2	K+PA2	K+SE2
	3	K+PA3	K+SE3
	4	K+PA4	K+SE4
	5	K+PA5	K+SE5
Kontrol Negatif	1	K-PA1	K-SE1
	2	K-PA2	K-SE2
	3	K-PA3	K-SE3
	4	K-PA4	K-SE4
	5	K-PA5	K-SE5

Keterangan :

P20 = pengenceran 20 %

P40 = pengenceran 40 %

P60 = pengenceran 60 %

P80 = pengenceran 80 %

K+ = Kontrol Positif kloramfenikol

K- = Kontrol Negatif pelarut DMSO

PA = *Pseudomonas aeruginosa*

SE = *Staphylococcus epidermidis*

5. Pembuatan medium untuk bakteri uji

a. Medium *Nutrien Agar* (NA) (Thiel, 1999)

Nutrien Agar (NA) dapat dibuat dengan melarutkan 23 gram bubuk NA ke dalam 1 liter aquades. Medium dipanaskan dalam *microwave* hingga mendidih dan berubah warna menjadi jernih kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 1 atm.

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

Nutrien Broth (NB) cair dapat dibuat dengan melarutkan

8 gram bubuk NB ke dalam 1 liter aquades. Medium dipanaskan dalam microwave hingga mendidih dan berubah warna menjadi jernih kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf.

6. Sterilisasi alat dan medium (Zimbardo dkk, 2009)

Alat-alat dicuci bersih dan dikeringkan kemudian dibungkus dengan kertas payung. Medium yang masih cair dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditutup dengan menggunakan kapas dan kertas payung. Alat dan bahan yang akan disterilisasi dimasukkan ke dalam autoklaf dan dipanaskan pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit untuk bahan dan 20 menit untuk alat.

7. Identifikasi bakteri uji (Cappuccino dan Sherman, 2011)

a. Pengamatan morfologi koloni

Biakkan mikrobia diambil sebanyak 1 ose kemudian diinokulasikan pada medium NA dengan metode *Streak plate* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C setelah 24 jam, dilakukan pengamatan terhadap morfologi koloni yang meliputi bentuk, tepian dan kenaikan (*elevation*) koloni kemudian difoto dengan kamera digital Canon.

b. Pengecatan Gram

Gelas benda disterilisasi dengan cara disemprot dengan menggunakan alkohol 70 % dan dibakar di atas lampu spiritus hingga kering. Biakkan diambil dengan menggunakan jarum ose yang telah dibakar dan diletakkan diatas gelas benda lalu suspensi dikeringkan

dan difiksasi diatas lampu spiritus. Cat gram A (*Crystal violet*) diteteskan ke gelas benda lalu dibilas dan dikeringkan. Kemudian, cat gram B (*Iodine*) ditetesi dan didiamkan selama 1 menit lalu dibilas dan dikeringkan. Cat gram C (*Alcohol 95 %*) ditetesi ke atas gelas benda dan didiamkan selama 30 detik lalu dibilas dan dikeringkan. Kemudian, cat gram D (*Safranin*) ditetesi di atas gelas benda dan didiamkan selama 2 menit lalu dibilas dan dikeringkan. Hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 450 kali kemudian difoto dengan kamera digital Canon.

c. Uji motilitas

Gelas benda dibersihkan secara aseptis menggunakan alkohol. Biakkan bakteri uji diambil dengan menggunakan jarum enten lalu ditusukkan ke dalam medium agar padat NA pada tabung reaksi hingga $\frac{3}{4}$ bagian medium lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C. Pengamatan dilakukan dengan melihat pola pertumbuhan dan penyebaran mikrobia pada agar padat kemudian difoto dengan kamera digital Canon.

d. Uji katalase

Gelas benda dibersihkan secara aseptis menggunakan alkohol. Biakkan bakteri uji diambil sebanyak 1 ose secara aseptis dari medium agar miring dan diletakkan di atas gelas benda lalu ditetesi dengan H₂O₂, hasil positif ditunjukkan dengan adanya gelembung kemudian difoto dengan kamera digital Canon.

e. Uji Biokimia

Bakteri uji diinokulasikan secara aseptis ke dalam tiga medium yaitu medium glukosa, medium sukrosa dan medium laktosa sebanyak 1 ose lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C dan hasil difoto dengan kamera digital Canon.

8. Uji Kualitatif fitokimia ekstrak daun namnam (Harborne,1987)

a. Uji Flavonoid

Ekstrak daun namnam sebanyak 0,1 g ditambahkan dengan 0,1 gram serbuk Mg dan 0,4 ml amil alkohol. Alkohol ditambahkan sebanyak 4 ml dan dicampur hingga homogen. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alcohol, kemudian difoto dengan kamera digital Canon.

b. Uji Alkaloid

Ekstrak daun namnam sebanyak 0,1 g ditambah dengan 5 ml kloroform dan 3 tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan 2 tetes 2M H₂SO₄. Fraksi asam dibagi menjadi 3 tabung yang masing-masing ditambah pereaksi Dragendorf, Meyer, dan Wagner. Alkaloid pada sampel ditandai dengan adanya endapan putih pada pereaksi Meyer, endapan merah pada pereaksi Dragendorf, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner, kemudian difoto dengan kamera digital Canon.

c. Uji Triterpenoid

Ekstrak daun namnam sebanyak 0,1 g ditambah 5 ml etanol 30 % kemudian dipanaskan selama 5 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat diuapkan, kemudian ditambah larutan eter. Lapisan eter ditambah dengan pereaksi Lieberman Burchard (3 tetes asetat anhidrat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat). Perubahan warna menjadi merah atau ungu menandakan adanya triterpenoid sedangkan warna hijau menandakan steroid, kemudian difoto dengan kamera digital Canon.

d. Uji Saponin

Ekstrak daun namnam ditimbang sebanyak 0,1 gram dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Aquades ditambahkan sebanyak 10 ml lalu larutan dikocok selama 30 detik. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa sekitar 1 cm, kemudian difoto dengan kamera digital Canon.

e. Uji Tanin

Ekstrak daun namnam ditimbang sebanyak 0,1 gram dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan aquades sebanyak 10 ml. Larutan didiamkan selama 5 menit dan disaring. FeCl₃ 1% ditambahkan sebanyak 5 tetes dan reaksi positif ditunjukkan dengan warna larutan menjadi biru/hitam, kemudian difoto dengan kamera digital Canon.

9. Uji Kuantitatif Ekstrak Namnam dengan GCMS (Adams, 1995)

Sampel ekstrak etil asetat daun namnam dianalisis dengan GCMS untuk mengetahui senyawa organik yang terkandung di dalamnya. Sebanyak 1 ml ekstrak disaring menggunakan membran filter yang berdiameter pori 0.45 μ m dan siap diinjeksikan. Volume filtrat yang diinjeksikan adalah 0,5 ml. Suhu injektor di set 300 °C. Helium sebagai gas pembawa diatur pada kecepatan tetap 3 ml/menit. Suhu kolom Inowax (panjang = 30 m, diameter = 0,25 mm) diprogram dari 70 °C – 320 °C dengan kecepatan kenaikan suhu 10 °C/menit. Spektrum massa yang diperoleh kemudian diidentifikasi dengan cara membandingkannya dengan Library Wiley275.L yang telah memuat 62345 spektrum massa senyawa yang telah diketahui.

10. Perbanyak bakteri uji (Cappuccino dan Sherman, 2011)

Kultur bakteri diinokulasikan ke dalam medium NA dengan menggunakan jarum ose secara aseptis kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Isolat bakteri hasil perbanyak diambil sebanyak 1-2 ose kemudian diinkubasi pada *inkubator shaker* pada suhu 37 °C selama 24 jam.

11. Uji antibakteri berdasarkan zona hambat dengan *paper disk* (Waluyo, 2010 dengan modifikasi)

Kultur mikrobial diambil 0,1 ml diinokulasikan pada medium NA dengan metode *spread plate*. *Paper disk* ditetesi ekstrak daun namnam sebanyak 20 μ L kemudian diletakkan di atas medium sebanyak 4-6 *paper disk* secara simetri dengan jarak paling kecil 20 mm dari tepi cawan petri. Kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C. Setelah

diinkubasi, zona hambat yang terjadi diamati, diukur dan difoto. Kemudian sebagai pembanding digunakan antibiotik kloramfenikol yang dilihat zona hambatnya pada mikrobia uji. Luas zona hambat dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

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

$$d_2 = \frac{d \text{ terpanjang} + d \text{ terpendek}}{2}$$

keterangan :

d1 = diameter kertas saring (cm)

d2 = rata-rata diameter zona hambat (cm)

12. Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (Andrews, 2001)

Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan metode *total plate count* dengan variasi konsentrasi 100, 80, 60, 40 dan 20%. Setiap konsentrasi ekstrak ditambahkan sebanyak 1 ml ke dalam 1 ml *Nutrien Broth* (NB) yang telah berisi 10 μ L biakan bakteri.

Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik kloramfenikol dan kontrol negatif adalah medium yang berisikan 1 ml NB dan 10 μ L biakan bakteri. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah dilakukannya inkubasi, ekstrak diambil sebanyak 100 μ L lalu di *spread plate* di atas agar pada cawan petri. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada cawan petri.

E. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANAVA dengan tingkat kepercayaan 95 % (Gaspersz, 1994). Apabila hasil ANAVA menunjukkan hasil beda nyata, analisis dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui beda nyata antarperlakuan. Analisis ANAVA dan DMRT menggunakan program SPSS 23.0 (Gaspersz, 1994).

