

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.5. Penyiapan Bahan

Tahapan penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan yang didapat dari kebun Manoko Lembang, Bandung. Kemudian bahan yang sudah terkumpul dideterminasi di Herbarium Bandungese, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Selanjutnya dilakukan pengolahan bahan meliputi sortasi basah, pencucian, pengeringan, sortasi kering, perajangan, pengepakan dan penyimpanan.

4.2. Pembuatan Ekstrak Daun Jati Belanda

Sebanyak 200 g simplisia daun jati belanda diekstraksi dengan 1500 mL etanol 96% menggunakan metode soxhletasi, ekstrak yang didapat kemudian diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan dipekatkan menggunakan water bath hingga didapat ekstrak kental daun jati belanda.

4.3. Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi *Azeotrop*. Tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan seksama, kemudian dibilas dengan air dan dikeringkan. Sebanyak 200 mL toluena dan 2 mL aquadest disuling dalam labu selama 2 jam, didinginkan selama 30 menit. Sebanyak 20 g serbuk simplisia ditimbang seksama dan dimasukkan ke dalam labu destilasi bersama batu didih.

Kemudian labu dipanaskan perlahan hingga cairan di dalamnya mendidih. Setelah mendidih, larutan disuling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian air tersuling, kemudian kecepatan penyulingan ditingkatkan hingga 4 tetes tiap detik, setelah semua air tersuling, bagian dalam tabung pendingin dibilas dengan 2 mL toluena, kemudian penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar dan air yang menempel pada tabung penerima dilepaskan dengan mengetuk tabung. Setelah air dan toluena memisah sempurna, volume air dibaca. Kadar air dihitung dalam persen (%) (Depkes RI, 2000:16).

4.4. Penapisan Fitokimia

Penapisan/skrining fitokimia meliputi penentuan senyawa alkaloid, flavanoid, saponin, kuinon, tanin, polifenolat, monoterpenoid, seskuiterpenoid, steroid, dan triterpenoid.

4.4.1. Alkaloid

Sebanyak 2 g sampel ditambahkan dengan amoniak 25% kemudian digerus dengan mortar, ditambahkan 20 mL kloroform dan digerus kuat. Campuran disaring dan filtrat digunakan untuk percobaan (Larutan A). larutan A diteteskan pada kertas saring dan diberi pereaksi Dragendorff. Warna jingga yang timbul pada kertas saring menunjukkan alkaloid positif. Sisa larutan A ditambahkan HCl 10% lalu lapisan air dipisahkan (larutan B) dibagi dua. Tabung pertama ditambahkan pereaksi Mayer, hasil positif bila endapan putih yang terbentuk bertahan selama 15 menit dan pada tabung kedua ditambahkan pereaksi

Dragendorff, hasil positif bila terbentuk endapan merah bata yang bertahan selama 15 menit (Depkes RI, 1989:549).

4.4.2. Flavonoid

Sampel dilarutkan dalam air panas secukupnya kemudian ditambahkan serbuk magnesium, 1 mL HCl pekat dan amil alkohol lalu dikocok kuat-kuat dan biarkan memisah. Jika dalam fase amil alkohol berwarna kuning atau jingga maka terdapat flavonoid dalam bahan uji (Farnsworth, 1966:263).

4.4.3. Saponin

Sampel dilarutkan dalam air panas, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok kuat vertikal selama 10 detik. Jika busa dengan tinggi 1 cm stabil selama 10 menit, maka pengujian dilanjutkan dengan menambahkan 2 tetes HCl 2N. jika busa tersebut tetap tidak hilang maka didalam bahan uji terkandung saponin (Farnsworth, 1966:266).

4.4.4. Kuinon

Sampel dilarutkan dalam air panas, lalu dimasukan kedalam tabung reaksi ditambahkan beberapa tetes NaOH 1N. adanya kuinon ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah (Farnsworth, 1966:266).

4.4.5. Tanin

Sampel dilarutkan dalam air panas, lalu dimasukkan kedalam 2 tabung reaksi. Tabung 1 ditambahkan 2 tetes FeCl₃ 1%, reaksi positif jika terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan. Tabung 2 ditambahkan gelatin 1%, jika terbentuk endapan putih maka menunjukkan adanya tanin. Untuk dapat mengetahui jenis senyawa tanin yang terkandung, maka bahan uji dimasukkan kedalam tabung

reaksi lainnya dan ditambahkan beberapa tetes pereaksi Steasny, lalu dipanaskan dalam penangas air, jika terbentuk endapan merah muda artinya terdapat tanin katekat. Hasil tersebut disaring lalu filtrat ditambahkan natrium asetat sampai jenuh lalu ditambahkan 2 tetes FeCl_3 1%, jika terbentuk warna biru tinta atau biru hitam menunjukkan reaksi positif untuk tanin galat (Farnsworth, 1966:264).

4.4.6. Steroid dan triterpenoid

Sampel digerus dengan eter kemudian disaring lalu diuapkan hingga kering. Pada residu ditetaskan larutan Lieberman-Burchard. Adanya golongan triterpenoid ditentukan dengan terbentuknya warna ungu, sedangkan warna hijau menunjukkan adanya senyawa steroid (Farnsworth, 1966:259).

4.4.7. Polifenolat

Sebanyak 1 g sampel ditambahkan dengan 20 mL air panas, dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dipanaskan dan disaring. Filtrat ditetesi dengan FeCl_3 . Hasil menunjukkan positif fenolat apabila terbentuk warna biru, biru-kehitaman, hijau atau biru-kehijauan (Farnsworth, 1966:264).

4.4.8. Monoterpenoid dan seskuiterpenoid

Sebanyak 1 g sampel digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat diuapkan sampai kering kemudian ditambahkan larutan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat. Terbentuknya warna-warna menunjukkan positif monoterpen dan seskuiterpen (Depkes RI, 1977:132).

4.5. Penyiapan Media, Sediaan Uji, dan Suspensi Bakteri

4.5.1. Pembuatan media agar

Media agar yang digunakan pada penelitian ini yaitu nutrient agar (NA) dan nutrient broth (NB). Nutrient agar digunakan untuk media pengujian aktivitas antibakteri, dibuat dengan cara sebanyak 25 g nutrient agar dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL dalam labu Erlenmeyer. Kemudian dipanaskan hingga larut, disumbat menggunakan kapas berlemak dan ditutup dengan aluminium foil. Sedangkan nutrient broth digunakan dalam pembuatan suspensi bakteri, dibuat dengan cara sebanyak 13 g NB dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL dalam labu Erlenmeyer. Kemudian dipanaskan hingga larut, disumbat menggunakan kapas berlemak dan ditutup dengan aluminium foil. Seluruh media dan alat yang akan digunakan disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 50 menit.

4.5.2. Pembuatan sediaan uji

Pembuatan sediaan uji ekstrak etanol daun jati belanda dilakukan dengan cara ekstrak etanol daun jati belanda dilarutkan dalam dimetilsulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi 20%; 15%; 10%; 5%; 2,5%; 1%; 0,75%; dan 0,5%. Pada pembuatan sediaan uji kloramfenikol dengan cara kloramfenikol dilarutkan dalam dimetilsulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi 1000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm, dan 1 ppm.

4.5.3. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli* ditanam dalam media nutrient agar (NA) miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian

disuspensikan dalam media cair nutrient broth (NB) dan dimasukkan kedalam tabung. Kemudian ditentukan transmittan hingga sebesar 25% dengan alat spektrofotometri UV-Vis panjang gelombang 580 nm (Depkes, 1995:896-897).

4.6. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Sebanyak 20 mL Nutrient Agar (NA) dicairkan dan dibiarkan sampai mencapai suhu 45-53°C, kemudian dituangkan kedalam cawan petri steril yang sudah berisi suspensi bakteri sebanyak 0,1 mL. Campuran kemudian dibiarkan selama beberapa menit sehingga menjadi padat. Setelah menjadi padat, dibuat beberapa lubang pada tiap lempeng agar dalam cawan petri. Ekstrak daun jati belanda konsentrasi 20%; 15%; 10%; 5%; 2,5%; 1%; 0,75%; dan 0,5% ditetaskan sebanyak 50 µL kedalam lubang, kemudian dimasukkan kedalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi dilihat hasil diameter hambat. Diameter hambat yang terbentuk ditandai dengan adanya zona bening disekitar lubang, kemudian diukur menggunakan jangka sorong.

4.7. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Metode yang digunakan adalah metode difusi agar. Ekstrak etanol daun jati belanda dengan konsentrasi 1%; 0,75%; dan 0,5%, diuji aktivitasnya pada bakteri uji yang peka terhadap ekstrak tersebut. Dari hasil pengujian konsentrasi terkecil yang masih bisa memberikan hambatan/zona bening pada bakteri uji merupakan konsentrasi hambat minimum (KHM) dari ekstrak tersebut.

4.8. Uji Kesetaraan Aktivitas Ekstrak dan Antibiotik Pembeding

Uji kesetaraan aktivitas ekstrak dengan antibiotik pembeding dilakukan dengan metode difusi. Antibiotik pembeding yaitu kloramfenikol pada konsentrasi 1000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5ppm, dan 1 ppm, diuji aktivitasnya terhadap bakteri uji. Berdasarkan hasil pengujian dibuat persamaan garis antara diameter hambatan pertumbuhan bakteri terhadap log konsentrasi kloramfenikol. Kemudian dihitung nilai kesetaraan antara ekstrak etanol daun jati belanda dengan kloramfenikol.