

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimental dengan menggunakan desain *true experimental* dengan pendekatan pasca-tes dengan pemilihan kelompok secara acak (*post test with control group*) yaitu uji daya hambat ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Februari 2021 hingga April 2021. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia UPT Materia Medica Batu untuk proses pembuatan ekstrak daun kelor dengan metode maserasi dan uji skrining fitokimia daun kelor, sedangkan pembuatan infusa daun kelor dilakukan di Laboratorium Kimia Poltekkes Kemenkes Malang. Adapun pelaksanaan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun kelor terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

a) Pembuatan Ekstrak Daun Kelor dan Uji Skrining Fitokimia

Alat yang digunakan untuk pengolahan pembuatan ekstrak daun kelor adalah wadah, timbangan atau neraca, talenan, pisau, oven, panci infusa, termometer, grinder, erlenmeyer, batang pengaduk, spatula, tabung reaksi, botol kaca, gelas ukur, spatula, *moisture balance* (Ohaus MB90), *rotary evaporator* (Buchi R-215), *waterbath* (Memmert WNB 14 Ring), rak tabung reaksi, pipet tetes, bola hisap, corong gelas, gelas beaker, botol kaca, pembakar bunsen dan kaki tiga.

b) Uji Antibakteri Ekstrak Daun Kelor

Alat yang dibutuhkan dalam pengujian daya hambat ekstrak daun kelor pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* adalah gelas kimia, gelas ukur, erlenmeyer,

pipet volume, sendok, batang pengaduk, spatula, kaca arloji, autoklaf, cawan petri, ose jarum, pembakar bunsen, mikropipet, LAF (*Laminar Air Flow*), incubator (Memmert), oven, pinset, mistar, tabung reaksi, rak tabung reaksi dan kompor listrik.

3.3.2 Bahan

a) Pembuatan Ekstrak Daun Kelor dan Uji Skrining Fitokimia

Bahan yang digunakan adalah serbuk simplisia daun kelor (*Moringa olifera*), aquadest, etanol 70%, kain saring, serbuk magnesium, HCl, FeCl₃ 1%, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, pereaksi bouchardat dan air panas.

b) Uji Antibakteri Ekstrak Daun Kelor

Bahan yang digunakan adalah infusa daun kelor, ekstrak etanol daun kelor, media Mueller Hinton Agar (MHA), media NB (Nutrient Broth), media Mc Farland 0,5, aquadest, NaCl 0,85%, kultur bakteri *Escherichia coli*, alkohol, kapas, lidi, kertas tahan panas, benang, korek api dan kertas saring.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi infusa dan ekstrak etanol daun kelor masing-masing sebesar 20%, 40%, 60% dan 80%.

3.4.2 Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat hasil uji daya hambat ekstrak daun kelor terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Cara Pengukuran	Skala Data
Infusa daun kelor	Zat hasil ekstraksi daun kelor dengan metode infusa dengan pelarut aquadest	Infusa % (b/v)	Rasio

Tabel 3.1 Lanjutan

Variabel	Definisi	Cara Pengukuran	Skala Data
Ekstrak etanol daun kelor	Zat hasil ekstraksi daun kelor dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%	Maserasi % (b/v)	Rasio
Daya hambat pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i>	Kemampuan ekstrak daun kelor (<i>Moringa oleifera L.</i>) dalam menghambat pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> berupa zona bening didaerah sekitar cakram disk.	Jangka sorong atau mistar (mm)	Rasio

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan Simplisia Daun Kelor

Sampel yang digunakan adalah daun kelor berwarna hijau segar tanpa adanya bercak kuning, bintik-bintik putih dan berlubang sebanyak ± 1.000 gram. Kemudian dilakukan pencucian menggunakan air, dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven suhu 50°C hingga warna daun berubah kecoklatan dan bergemerisik apabila diremas. Simplisia daun kelor dihaluskan menggunakan grinder atau mesin penggiling. Kadar air simplisia daun kelor diukur dengan menggunakan alat *moisture balance*.

3.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kelor

Proses pembuatan ekstrak etanol daun kelor menggunakan metode maserasi dengan cara dimasukkan 50 gram serbuk simplisia daun kelor ke dalam wadah tertutup berisi 500 ml etanol 70%, kemudian diaduk perlahan. Biarkan selama 3 hari dengan dilakukan pengadukan setiap harinya. Setelah 3 hari, disaring menggunakan kertas saring dan diuapkan pelarut dari filtrat menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak etanol daun kelor yang diperoleh dibuat dalam variasi konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%. Pembuatan ekstrak konsentrasi 20% dibuat

dari 0,2 gram ekstrak, ekstrak konsentrasi 40% sebanyak 0,4 gram, ekstrak konsentrasi 60% sebanyak 0,6 gram dan ekstrak konsentrasi 80% sebanyak 0,8 gram. Masing-masing ekstrak yang telah ditimbang dilarutkan dalam 1 ml aquadest.

3.6.3 Pembuatan Infusa Daun Kelor

Proses pembuatan infusa daun kelor yaitu dengan cara dimasukkan 50 gram serbuk daun kelor ke dalam panci berisi 500 ml aquadest, kemudian dipanaskan selama 15 menit saat suhu telah mencapai 90°C. Infusa daun kelor yang diperoleh kemudian disaring dengan kertas saring. Selanjutnya diuapkan pelarut filtrat menggunakan *waterbath*. Ekstrak yang diperoleh akan dibuat dalam varian konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%. Pembuatan ekstrak konsentrasi 20% dibuat dari 0,2 gram ekstrak, ekstrak konsentrasi 40% sebanyak 0,4 gram, ekstrak konsentrasi 60% sebanyak 0,6 gram dan ekstrak konsentrasi 80% sebanyak 0,8 gram. Masing-masing ekstrak yang telah ditimbang dilarutkan dalam 1 ml aquadest.

3.6.4 Uji Skrining Fitokimia

Pada pengujian kali ini akan dilakukan uji skrining fitokimia dengan menggunakan metode dari UPT *Materia Medica* Batu. Sebelum uji skrining fitokimia pada simplisia daun kelor, dilakukan preparasi terlebih dahulu dengan cara 5 gram simplisia daun kelor yang telah ditimbang kemudian dilarutkan dalam 80 ml air dan dipanaskan kurang lebih 20 menit. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring dan filtrat yang diperoleh dibagi ke dalam 6 tabung reaksi dalam jumlah yang sama masing-masing sebesar ± 2 ml filtrat.

1) Uji Flavonoid

Pada pengujian ini dilakukan dengan uji *wilstater*. Filtrat sebanyak 2 ml dalam tabung reaksi ditambahkan sedikit serbuk logam magnesium dan ditambahkan tiga tetes asam klorida (HCl). Hasil positif flavonoid ditandai dengan terbentuk warna merah, oranye dan hijau tergantung struktur flavonoid yang terkandung dalam sampel tersebut (Harborne, 1987).

2) Uji Tanin

Pada pengujian ini dilakukan dengan uji Ferri Klorida. Filtrat sebanyak 2 ml dalam tabung reaksi ditetesi dengan tiga tetes larutan FeCl_3 1%. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Harborne, 1987).

3) Uji Alkaloid

Pada pengujian ini dilakukan dengan cara filtrat sebanyak 6 ml dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi berbeda, masing-masing sebanyak 2 ml. Pada tabung pertama ditambahkan tiga tetes pereaksi mayer, pada tabung reaksi kedua ditambahkan tiga tetes pereaksi dragendorff, dan pada tabung reaksi ketiga ditambahkan tiga tetes pereaksi bouchardat. Hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan.

4) Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara filtrat sebanyak 2 ml ditambahkan dengan air panas tiga tetes. Kemudian filtrat dikocok kuat selama beberapa menit dan didiamkan beberapa menit. Terbentuknya busa yang stabil menandakan sampel positif terdapat saponin (60-120 detik).

5) Uji Terpenoid

Pada pengujian ini, filtrat sebanyak 2 ml dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan reagen Bouchardat sebanyak tiga tetes lalu diamati perubahan yang terjadi.

3.6.5 Sterilisasi Alat

Peralatan yang akan digunakan untuk uji antibakteri terlebih dahulu disterilkan antara lain gelas arloji, pipet ukur, sendok, cawan petri, pinset, jarum ose, kapas lidi, tabung reaksi dan erlenmeyer. Sterilisasi alat dilakukan dengan cara sterilisasi panas kering dengan suhu 170°C selama 1 jam dan sterilisasi panas pijar menggunakan nyala api bunsen.

3.6.6 Pembuatan Media

1) Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA) (Jawetz, et al, 2017)

Pembuatan media MHA dilakukan dengan melarutkan 4,94 gram dalam 130 ml aquadest, kemudian dipanaskan media hingga larutan homogen. Selanjutnya dimasukkan larutan media MHA ke dalam erlenmeyer untuk kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Media yang telah siap dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak 20 ml dan ditunggu hingga media memadat sebelum dilakukan pengujian.

2) Pembuatan Media Nutrient Broth (NB)

Pembuatan media NB dilakukan dengan melarutkan 0,455 gram dalam 35 ml aquadest, kemudian diaduk hingga larutan homogen. Selanjutnya dimasukkan larutan media NB ke dalam erlenmeyer untuk kemudian disterilisasi basah menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

3) Pembuatan Media Pengencer NaCl 0,85%

Pembuatan media NaCl 0,85% dilakukan dengan melarutkan 0,85 gram NaCl dalam 100 ml aquadest, kemudian diaduk hingga larutan homogen. Selanjutnya dimasukkan larutan NaCl 0,85% ke dalam erlenmeyer untuk kemudian disterilisasi basah menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

4) Persiapan Kontrol Uji Daya Hambat

Pada pengujian daya hambat akan digunakan dua jenis kontrol yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian ini adalah kloramfenikol dengan konsentrasi 1 mg/ml (Depkes RI, 1995). Langkah pertama, dibuka cangkang kapsul kloramfenikol terlebih dahulu. Kemudian ditimbang sebanyak 5 mg serbuk kloramfenikol menggunakan neraca analitik dan dilarutkan dalam 5 ml aquadest. Sedangkan kontrol negatif yang digunakan pada pengujian ini adalah aquadest.

5) Pembuatan Mc Farland 0,5

Mc farland 0,5 digunakan sebagai pembanding tingkat kekeruhan biakan bakteri dalam media cair. Larutan Mc farland 0,5 dibuat dengan cara dipipet sebanyak 0,05 ml larutan BaCl₂1% dan dipipet larutan H₂SO₄1% sebanyak 9,95 ml kemudian dihomogenkan.

3.6.7 Peremajaan Bakteri *Escherichia coli*

Peremajaan bakteri *Escherichia coli* dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri menggunakan jarum ose steril kemudian dilarutkan dalam larutan NB secara aseptis. Kemudian inkubasi media NB yang telah diinokulasi bakteri selama 1x24 jam pada suhu 37°C.

3.6.8 Pembuatan Suspensi Bakteri *Escherichia coli*

Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri menggunakan jarum ose steril dari media NB kemudian

dilarutkan dalam 5 ml larutan NaCl 0,85% secara aseptis sampai tingkat kekeruhan suspensi bakteri sama dengan standar Mc Farland 0,5.

3.6.9 Pengujian Daya Hambat

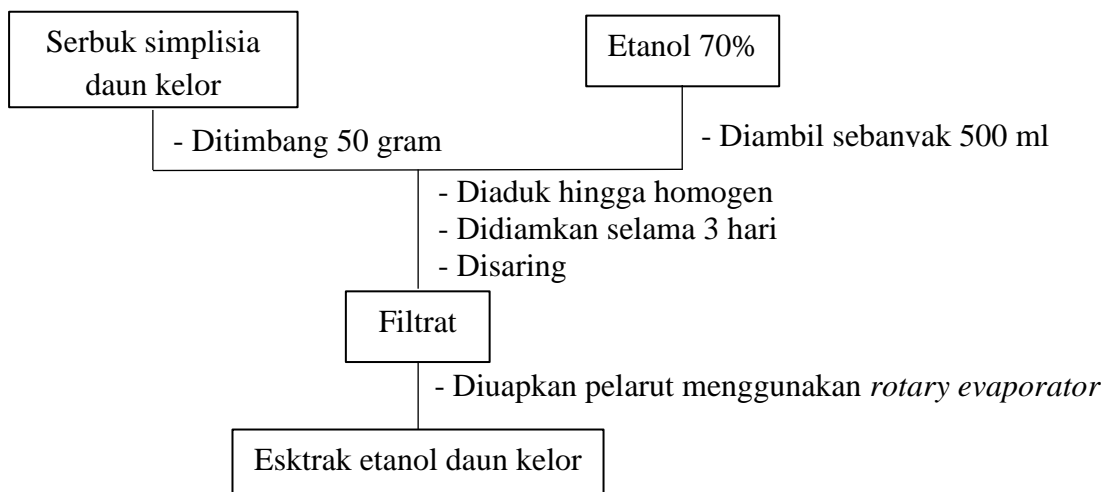
Pada uji daya hambat ekstrak daun kelor akan digunakan metode difusi agar. Tahapan uji dimulai dengan diinokulasi suspensi bakteri *Escherichia coli* pada media Mueller Hinton Agar (MHA) yang telah memadat menggunakan kapas lidi steril. Selanjutnya disiapkan kertas cakram yang akan digunakan menggunakan kertas saring. Dari kertas saring tersebut direndam selama ± 10 menit ke dalam masing-masing cawan petri steril berisi kontrol positif yaitu kloramfenikol, kontrol negatif yaitu aquadest dan variasi konsentrasi ekstrak etanol dan infusa dengan konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%. Setelah perendaman, ditanam kertas cakram pada media Mueller Hinton Agar (MHA) yang telah diinokulasi bakteri menggunakan pinset steril. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam dengan posisi cawan terbalik. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.

3.7 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah zona diameter hambat (mm) dari ekstrak daun kelor terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Penyajian data pada penelitian ini dalam bentuk tabel. Selanjutnya data akan dianalisis secara statistik menggunakan uji Kruskal Wallis.

3.8 Diagram Alir Pembuatan Ekstrak Daun Kelor

3.8.1 Maserasi Simplisia Daun Kelor



3.8.2 Infundasi Simplisia Daun Kelor

