

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Sampel daun paitan (*Tithonia diversifolia* Gray.) diambil disepanjang jalan Gombel Semarang.

Ekstraksi bahan uji dilakukan di Lab. Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA UNDIP, sedangkan pemeriksaan secara kualitatif kandungan senyawa kimia fraksi ekstrak daun paitan dan 'bioassay' antibakteri dilakukan di Lab. Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Biologi FMIPA UNDIP.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei - Agustus 1997.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan selama penelitian adalah tabung reaksi, jarum ose tumpul, erlenmeyer, gelas ukur, kaca obyek, mikroskop, pembakar spiritus, oven, inkubator, autoklaf, 'colony counter', blender, corong, kapas, kertas saring, 'rotary evaporator' atau 'rotavapor', timbangan Sartorius, cawan petri, pipet ukur, spektrofotometer spectronic 20, 'paper disk' dari kertas Whatman No. 42 berdiameter 1 cm, pinset, jangka sorong, 'beaker glass', pipet tetes dan pelat tetes porselin.

2. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan untuk penelitian adalah daun paitan (*T. diversifolia* Gray.) yang dipetik mulai daun no. 5-10 dari pucuk batang, biakan murni *Staphylococcus aureus*, medium Nutrient Agar, medium Nutrient Broth, alkohol 70%, aquades, pewarna Gram, minyak emersi, pelarut etanol 95% (C₂H₅OH) teknis, pelarut n-heksan (C₆H₁₄) teknis, pelarut kloroform (CHCl₃) teknis, Tween 80, raksa (II) klorida (HgCl₂), kalium iodida (KI), anhidrida asam asetat ((CH₃CO)₂COOH), asam sulfat pekat (H₂SO₄), ferri klorida (FeCl₃) dan amonium hidroksida (NH₄OH).

C. Cara Kerja

1. Fraksinasi Ekstrak Daun Paitan

Daun paitan dipilih yang baik dan dibersihkan dari kotoran kemudian dikeringanginkan. Selanjutnya dipotong kecil-kecil dan diblender hingga diperoleh serbuk kering atau simplisia sebanyak 1 kg (lihat Lampiran 01. pada Gambar 04.).

Simplisia dimaserasi dalam perkolator dengan pelarut n-heksan selama 3x24 jam pada suhu kamar. Maserat atau fraksi n-heksan cair yang dihasilkan ditampung dalam erlenmeyer. Maserat kemudian diuapkan dengan menggunakan 'rotavapor' untuk memisahkan senyawa dari pelarutnya, sehingga diperoleh fraksi ekstrak n-heksan kental yang merupakan fraksi ekstrak nonpolar.

Residu dari hasil ekstraksi dengan pelarut n-heksan dimaserasi dengan pelarut kloroform selama 3x24 jam pada suhu kamar. Maserat yang dihasilkan ditampung dalam erlenmeyer dan kemudian diuapkan dengan menggunakan 'rotavapor',

sehingga diperoleh fraksi ekstrak kloroform kental yang merupakan fraksi ekstrak semipolar.

Dengan cara yang sama, dilakukan pula fraksinasi terhadap residu dari fraksi kloroform cair dengan menggunakan pelarut etanol, sehingga diperoleh fraksi ekstrak etanol kental yang merupakan fraksi ekstrak polar.

Masing-masing fraksi ekstrak kental yang diperoleh dibiarkan sampai kering, untuk selanjutnya akan digunakan sebagai bahan uji (Harborne, 1987).

2. Pemeriksaan Secara Kualitatif Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Dari Masing-masing Fraksi Ekstrak Daun Paitan

2.1. Pemeriksaan Adanya Minyak Atsiri

Adanya minyak atsiri dari masing-masing fraksi ekstrak daun paitan dilakukan dengan cara : mengambil jaringan daun, kemudian diremas dan dideteksi dengan bau yang dihasilkan.

2.1. Pemeriksaan Adanya Triterpenoid dan Steroid

Sebanyak 0,5 gr fraksi ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml kloroform. Selanjutnya dipanaskan sebentar diatas penangas air sambil dikocok-kocok, kemudian langsung didinginkan. Larutan dipipet dan ditempatkan dalam pelat tetes porselin sebanyak 10 tetes, kemudian dibiarkan hingga kering. Setelah itu ditambahkan 5 tetes anhidrida asam asetat dan 1 tetes asam sulfat pekat.

Terbentuknya warna merah ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid, sedangkan terbentuknya warna biru menunjukkan adanya steroid (Harborne, 1987).

2.2. Pemeriksaan Adanya Saponin

Sebanyak 0,5 gr fraksi ekstrak dimasukkan dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 10 ml air. Dididihkan kira-kira 2-3 menit lalu didinginkan. Selanjutnya dikocok selama 10 detik.

Apabila timbul busa yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit, berarti menunjukkan adanya saponin (Harborne, 1987).

2.3. Pemeriksaan Adanya Fenol

Sebanyak 0,5 gr fraksi ekstrak dalam erlenmeyer yang ditambah dengan 10 ml air, dipanaskan hingga mendidih. Air rebusan dipipet dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan dengan 1% FeCl_3 .

Adanya senyawa fenol ditandai dengan terjadinya warna dari hijau sampai hitam (Harborne, 1987).

2.4. Pemeriksaan Adanya Alkaloid

Sebanyak 4 gr fraksi ekstrak ditambahkan kloroform secukupnya sambil diaduk. Selanjutnya ditambah 10 ml NH_4OH lalu disaring. Cairan hasil saringan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan H_2SO_4 2N sebanyak 10 tetes dan dikocok secara teratur. Cairan bagian atas yang terbentuk dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih dalam pereaksi Mayer menunjukkan adanya alkaloid dalam fraksi ekstrak tersebut.

Pereaksi Mayer dapat dibuat dengan cara mencampur 1,36 gr HgCl_2 dalam erlenmeyer 100 ml dengan larutan KI 5 gr dalam 10 ml yang kemudian

diencerkan sampai volumenya menjadi 100 ml. Pereaksi ini harus disimpan dalam botol berwarna gelap (Harborne, 1987).

3. Pembuatan Kultur Murni *Staphylococcus aureus*

Kultur murni *S. aureus* didapatkan dari koleksi biakan FNCC PAU UGM Yogyakarta. Kultur murni tersebut diinokulasikan pada Nutrient Agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, sebanyak 1 ose dari koloni yang tumbuh diinokulasikan lagi ke dalam Nutrient Broth dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Morfologi bakteri *S. aureus* dapat dilihat pada Gambar 06. dalam Lampiran 01.

4. Pembuatan Inokulum Bakteri *S. aureus*

Suspensi bakteri yang akan diujikan dalam 'bioassay' antibakteri mempunyai kerapatan 10^7 - 10^8 bakteri/ml, yang diperoleh dari suspensi bakteri berumur 24 jam dengan $T = 70\%$ pada $\lambda = 620$ Nm yang diukur dengan menggunakan alat spektrofotometer.

5. 'Bioassay' Antibakteri

Satu mililiter suspensi bakteri uji dengan $T = 70\%$ pada $\lambda = 620$ Nm ditanam pada 10 ml Nutrient Agar secara tuang ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat.

Dengan pinset steril, diambil 'paper disk' steril berdiameter 1 cm, kemudian dicelupkan dalam konsentrasi fraksi ekstrak yang dikehendaki selama 2 detik, setelah itu diangkat, dilalukan sebentar diatas pembakar spiritus dan diletakkan diatas Nutrient Agar berisi suspensi bakteri yang telah memadat dalam cawan petri. Pada setiap cawan petri diletakkan tiga buah 'paper disk' dari konsentrasi yang sama.

Macam konsentrasi yang dipakai adalah 0,5%, 1%, 3% dan 5% (b/v) fraksi ekstrak yang dilarutkan dengan aquades steril, setelah sebelumnya dicampur dengan Tween 80 terlebih dahulu. Dibuat pula untuk kontrol perlakuan dengan konsentrasi 0% dari masing-masing fraksi ekstrak. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengamatan dilakukan dengan mengukur daerah hambatan yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong.

D. Parameter Yang Diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah diameter daerah hambatan (dalam mm) dari masing-masing perlakuan yang diukur dengan menggunakan jangka sorong.

E. Model Analisa Data

Untuk menganalisa hasil penelitian dipergunakan Percobaan Faktorial, yaitu fraksi ekstrak (n-heksan, kloroform, etanol) dan konsentrasi (0,5%; 1%; 3%; 5%(b/v)) dengan rancangan dasar Rancangan Acak Lengkap. Ulangan dilakukan sebanyak tiga kali.

Data dianalisis dengan analisis sidik ragam kemudian dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) untuk mengetahui perlakuan mana yang menimbulkan beda nyata (Gaspersz, 1991; Srigandono, 1989).