

## IV. METODOLOGI

### A. Lokasi dan waktu penelitian

#### A.1. Lokasi penelitian

- Ekstraksi bahan uji dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA UNDIP.
- Pengujian antibakteri di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA UNDIP.

#### A.2. Waktu penelitian pada bulan November 1997 – Maret 1998.

### B. Alat dan Bahan

#### B.1. Alat yang digunakan

Mesin penggiling (blender), kertas saring, rotavapor, autoklaf, timbangan, gelas ukur, erlenmeyer, inkubator, jarum ose, petridish, tabung reaksi dan rak, pipet ukur, oven, paper dish (Whatman 542) diameter 1 cm, pembakar spiritus, kapas, jangka sorong, colony counter, pipet tetes, kertas pH, pinset, mikroskop, gelas benda, perkolator, spektrofotometer Spektronic 20.

#### B.2. Bahan.

Daun lamtoro (*Leucaena glauca Bth*) diambil dari Desa Kaligowong Kecamatan Wadaslintang Kabupaten Wonosobo. Daun diambil dengan perbandingan setengah bagian tua, yang berwarna hijau tua dan setengah bagian muda, yang berwarna hijau muda dan kadang-kadang masih kuncup. Biakan murni *Streptococcus pyogenes* ATCC 12138 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10701 diperoleh dari Perum BioFarma

Bandung, medium Nutrien cair, medium Nutrien Agar , aquadest, pelarut etanol, pelarut kloroform, alkohol 70 %  $\text{FeCl}_3$  1%, minyak imersi, xylol, Gram A (kristal violet), Gram B (larutan iodine), Gram C (alkohol), Gram D (safranin), NaOH 1%, Tween 80, Reagen Meyer (1,3 gr  $\text{HgCl}_2$  dilarutkan dalam 60 ml air . 5 gr KI dilarutkan dalam 10 ml air. Kedua larutan tadi dicampurkan dan ditambah air sampai 100 ml).

### C. Cara kerja

#### C.1. Persiapan Alat dan Bahan

Tahap persiapan meliputi pencucian alat, pembuatan medium dan sterilisasi medium. Untuk pipet dan cawan petri disterilkan dengan oven, sedangkan medium dan paper disk disterilkan dengan autoklaf.

#### C.2. Cara Pembuatan Medium.

Medium Nutrien Agar dibuat dengan menimbang Nutrien Agar (Difco) seberat 28 gram dilarutkan dalam 1000 ml aquadest dengan cara dididihkan pada hot plate stirer. Medium Nutrien Broth dibuat dengan melarutkan 8 gram Nutrien Broth (Difco) dalam 1000 ml aquadest. pH dibuat 7. Medium-medium yang telah dibuat tersebut kemudian disterilkan dengan autoklaf pada temperatur  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit.

#### C.3. Pembuatan Suspensi Bakteri

Biakan bakteri ditanam pada NA miring dan diinkubasikan pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Diambil satu ose biakan tersebut dan diinokulasikan kedalam medium NB, diinkubasikan selama 24 jam. Dari biakan dalam medium NB diencerkan sampai

diperoleh T 50 % pada panjang gelombang 620 nm untuk *Streptococcus pyogenes* dan 540 nm untuk *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan spektrofotometer Spectronic 20, sehingga didapatkan kerapatan bakteri uji  $10^7 - 10^8$ .

#### C.4. Fraksinasi ekstrak daun lamtoro (Harborne, 1987)

Daun lamtoro setelah dibersihkan dari kotoran-kotoran ikutan kemudian dikeringanginkan sampai kareng. Selanjutnya digiling dengan mesin penggiling hingga diperoleh serbuk kering atau simplisia.

Sebanyak 1 kg simplisia diperkolasi dalam perkolator dengan pelarut kloroform selama 3 X 24 jam pada suhu kamar. Perkolat yang dihasilkan ditampung dalam erlenmeyer. Perkolat kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotavapor untuk memisahkan senyawa dari pelarutnya sehingga diperoleh fraksi ekstrak semipolar kental.

Ampas dari perkolat atau fraksi sisa I diperkolasi dengan pelarut etanol selama 3 X 24 jam pada suhu kamar. Perkolat yang dihasilkan ditampung dalam erlenmeyer dan selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan rotavapor sehingga diperoleh fraksi polar kental.

Masing-masing fraksi ekstrak kental, selanjutnya dilarutkan dengan aquadest untuk memperoleh konsentrasi yang akan dicoba yaitu 25%, 50%, 75% dan 100% (b/v). Untuk fraksi kloroform ditambah tween 80.

### C.5. Uji Antibakteri (Pelczar, 1993)

Diinokulasikan 1 ml kultur bakteri uji yang mempunyai kerapatan  $10^7 - 10^8$  sel per ml pada 15 ml agar secara tuang kedalam cawan petri. Kemudian diratakan dan dibiarkan memadat. Paper disk steril berdiameter 1 cm yang telah dicelupkan kedalam larutan ekstrak diletakkan diatas permukaan media lempeng agar, yang telah memadat. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 25%, 50%, 75% dan 100% pada pelarut aquadest steril dan fraksi kloroform ditambahkan tween 80 (untuk larutan 10 ml digunakan tween 80 5 tetes). Sebagai kontrol digunakan aquadest dan tween 80. Setelah itu diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .

Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter daerah hambatan (DDH) yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong.

### C.6. Deteksi senyawa flavonoid dan alkaloid pada ekstrak

- Deteksi Senyawa Flavonoid.

1 ml ekstrak, ditambah dengan 25 tetes  $\text{FeCl}_3$  1%, apabila terbentuk warna hijau, merah, ungu, atau warna hitam yang kuat berarti menandakan terdapat flavonoid.

- Deteksi senyawa Alkaloid.

1 ml ekstrak ditambah 25 tetes reagen Meyer. Terdapatnya alkaloid ditandai dengan timbulnya endapan berwarna putih.

#### D. Parameter yang diamati

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah diameter daerah hambatan (DDH) dari masing-masing perlakuan pada setiap cawan yang diukur dengan menggunakan jangka sorong.

#### E. Model Analisa Data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan 2 faktor perlakuan ( $2 \times 4$ ) dan diulang 3 X, pada 2 bakteri uji.

Data diuji kenormalan dan homogenitasnya, jika data normal maka dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan Uji Wilayah Ganda Duncan pada taraf 5%. Jika data tidak normal dan homogen maka data dianalisis dengan analisis non parametrik Uji Wilcoxon pada taraf kepercayaan 0,05 (Daniel, 1989)

Tabel 01. Tabulasi macam perlakuan

	K1	K2	K3	K4
E1	E1-1	E1-2	E1-3	E1-4
E2	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Keterangan :

E1 : Fraksi ekstrak kloroform

E2 : Fraksi ekstrak etanol

K1 : Konsentrasi fraksi ekstrak 25% (b/v)

K3 : Konsentrasi fraksi ekstrak 75 % (b/v)

K2 : Konsentrasi fraksi ekstrak 50% (b/v)

K4 : Konsentrasi fraksi ekstrak 100 % (b/v)