

BAB III

BAHAN DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2017 sampai dengan bulan April 2017 di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Teknologi Kimia Industri, Medan

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ubi jalar (*Ipomoea batatas* L) yang diperoleh dari pekarangan milik sendiri di kuala tanjung, Batu Bara. Media *Potato Dextrose Agar* (PDA), Media *Nutrien Agar* (NA), antibiotik *Cloramphenicol* dan *Nystatin*, Isolat bakteri *Escherichia coli*, *Shigella dysentriae* dan *Candida albicans*. Bahan kimia yang digunakan antara lain etil asetat, HCl, n-heksan, dimetilsulfuoksida (DMSO), Mg, FeCl₃, I₂, amil alkohol, CH₃COOH, H₂SO₄ dan aquades steril.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Cawan Petri, beaker glass, spatula, jarum ose, gelas ukur, neraca analitik, pisau, saringan, mortal, tabung reaksi, inkubator, kertas cakram, pinset, bunsen, kertas label, autoclave, kamera.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan metode kualitatif dan kuantitatif. Pengujian fitokimia secara kualitatif dan pengujian antimikrob secara kuantitatif. Konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 25%, 50%, 75%, 100%. Antibiotik pembanding *Cloramphenicol* dan *Nystatin* dengan

ulangan sebanyak 4 kali. Parameter yang di amati yaitu diameter zona hambat yang ditimbulkan oleh masing-masing konsentrasi ekstrak.

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Preparasi Ekstrak Daun Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L)

Sampel yang diteliti adalah daun ubi jalar (*Ipomoea batatas* L) yang segar sebanyak 600 gr, diambil di kuala tanjung, Kabupaten Batu Bara Sumatera Utara. Pengambilan sampel dilakukan tanpa membandingkan dengan daerah lain. Daun dijemur sampai kering. Setelah kering sampel dihaluskan dengan cara ditumbuk hingga diperoleh serbuk kering atau yang disebut simplisia, setelah itu ditimbang sebanyak 100 gram Simplisia daun ubi jalar dimaserasi dengan merendamnya di dalam pelarut etil asetat selama 3 hari. Maserat yang diperoleh kemudian disaring sehingga diperoleh filtrat dan ampas. Filtrat yang diperoleh dipisahkan dengan rotavapor sehingga terpisah pelarut dan ekstrak kental tumbuhan selanjutnya dilakukan pengenceran sehingga diperoleh ekstrak sampel dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%. Hal yang sama dilakukan untuk ekstraksi menggunakan n-heksan.

3.4.2 Skrining Fitokimia

Untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder dari ekstrak daun ubi jalar maka dilakukan uji fitokimia yang terdiri atas flavonoid, alkaloid, triterpen, tanin dan saponin.

1. Uji Senyawa Flavonoid

Pada uji senyawa flavonoid yaitu 1 gram sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan pada sampel berupa serbuk Magnesium 0,1 mg dan 0,4 ml amil alkohol (campuran HCL 37% dan etanol 95% dengan volume yang sama) dan 4 ml alkohol. Sampel dikocok dan diamati perubahan yang terjadi, terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid.

2. Uji Senyawa Alkaloid

Sebanyak 1 gram sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 10 ml HCl 2 N dan dipanaskan pada penangas air sampai bening, setelah bening diambil 2 ml dan ditambah 4 tetes I₂. Terbentuknya kekeruhan menunjukkan adanya alkaloid.

3. Uji Senyawa Triterpenoid

Sebanyak 5 ml sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 2 tetes CH₃COOH dan 1 tetes H₂SO₄. Sampel dikocok dan diamati perubahan yang terjadi, terbentuknya warna hijau atau ungu menunjukkan adanya triterpenoid.

4. Uji Senyawa Tanin

Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 10 ml aquadest dan 1 tetes FeCl₃. Terbentuknya warna biru atau hijau menunjukkan adanya tanin.

5. Uji Senyawa Saponin

Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 10 ml aquades lalu dikocok kuat selama 30 detik dan terbentuk busa permanen

lebih dari 10 menit dengan penambahan 2 tetes HCl 2 N. Maka menunjukkan uji positif untuk saponin.

3.4.3 Kultur Isolat

Pembuatan suspensi uji yaitu dengan mengambil koloni murni *Escherichia coli*, *Shigella dysentryae* dan *Candida albicans* yang sudah dikultur murni pada media *Nutrient Agar* (NA) dan *Potato Dextrose Agar* (PDA). Masing-masing satu ose bakteri biakkan di suspensi didalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml aquades dengan tingkat kekeruhan 10^8 CFU

3.4.4 Uji Daya Hambat Ekstrak Pelarut Terhadap Mikroba Patogen

Isolat mikroorganismenya yang berumur 1x24 jam dibuat dalam bentuk suspensi dengan kerapatan sel 10^8 CFU. Ekstrak dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% masing-masing diteteskan pada permukaan cakram kosong sebanyak 10 μ l.

Media NA dan PDA yang sudah steril dituang dalam cawan petri dibiarkan hingga memadat. Suspensi dengan kerapatan 10^8 CFU diteteskan / dicelupkan *Cutton bud. Cutton bud* yang telah berisi suspensi, dioles pada permukaan media yang sudah memadat. Kertas cakram yang sudah berisi ekstrak sampel diletakkan pada permukaan media yang sudah dioles dengan mikroorganismenya. Cawan uji diinkubasi 1x24 jam dan dilakukan pengamatan selama 3 hari.

3.5 Pengukuran Diameter Zona Hambat

Pengukuran diameter zona hambat ekstrak terhadap mikroorganismenya *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* dan *Candida albicans* yaitu dengan melihat

adanya zona bening pada diameter disc masing-masing konsentrasi. Diameter zona hambat yang terbentuk dapat diukur dengan jangka sorong menurut metode Kirby-baurier of Susceptibility Test (Cappucino, 1999). Jika diameter zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi ekstrak dapat mengimbangi antibiotik pembanding, mengindikasikan bahwa ekstrak dapat dijadikan sebagai alternatif antimikrob dalam menghambat pertumbuhan mikroorganismenya.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian adalah diameter zona hambat masing-masing konsentrasi ekstrak terhadap mikroorganismenya *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* dan *Candida albicans*. Berdasarkan data tersebut maka data dianalisis statistik dengan Anova dan uji Duncan Multiple Range Test (DMRT).