

BAB III BAHAN DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2017 sampai dengan bulan April 2017 di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Teknologi Kimia Industri.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) yang diperoleh dari pekarangan milik warga di daerah Laudendang, Kabupaten Deli Serdang Sumatera Utara. Media *Potato Dextrose Agar* (PDA), Media *Nutrien Agar* (NA), antibiotik *Cloramphenicol* dan *Nystatin*, Isolat mikroba *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-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ialah cawan petri, beaker glass, spatula, ose, gelas ukur, neraca analitik, saringan, tabung reaksi, inkubator, blankdisc, pinset, cotton bud, bunsen, kertas label, jangka sorong, autoklaf, kamera dan alat tulis.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian bersifat eksperimental dengan menggunakan metode kualitatif dan kuantitatif. Pengujian fitokimia secara kualitatif dan pengujian antimikrob ekstrak daun pandan wangi terhadap mikroorganisme *Escherichia coli*, *Shigella dysentriae* dan *Candida albicans*. Konsentarsi ekstrak yang digunakan yaitu 25%,

50%, 75%, 100% antibiotik pembanding *Cloramphenicol* dan *Nystatin* dengan ulangan sebanyak 4 kali. Parameter yang diamati yaitu diameter zona bening yang ditimbulkan oleh masing-masing konsentrasi ekstrak.

3.4 Prosedur Kerja

Pada penelitian ini yang akan dilakukan antara lain penyediaan ekstrak daun pandan wangi, uji fitokimia, pembuatan suspensi uji dan uji antimikroba.

3.4.1 Penyediaan Ekstrak Daun Pandan Wangi

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pandan wangi yang segar. Daun pandan wangi segar dipotong kecil-kecil, lalu dikeringkan dengan cara dijemur dipanas matahari. Kemudian daun pandan wangi yang telah kering digiling kemudian ditumbuk dan diayak dengan ayakan, lalu ditimbang sebanyak 100 gram. Sampel dimaserasi dengan etil asetat dan n-heksan dan didiamkan selama 3x24 jam dengan pergantian pelarut setiap 24 jam. Kemudian ekstrak disaring dan dipanasakan sehingga diperoleh ekstrak kasar etil asetat dan n-heksan daun pandan wangi, selanjutnya kedua ekstrak tersebut di skringing fitokimia.

3.4.2 Uji Fitokimia

Untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder dari ekstrak daun pandan wangi, 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 dimasukan 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 menunjukan uji positif untuk saponin.

3.4.3 Pembuatan Suspensi Uji

Pembuatan suspensi uji yaitu dengan mengambil koloni murni *Escherichia coli*, *Shigella dysentriae* dan *Candida albicans* yang sudah dikultur murni pada media *Nutrien Agar* (NA) untuk bakteri dan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) untuk jamur. Masing-masing 1 ose mikroba biakkan di suspensikan didalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml aquades dengan tingkat kekeruhan 10^8 CFU.

3.4.4 Uji Antimikroba

Ekstrak dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% masing-masing ditetaskan pada permukaan blankdisc sebanyak 10 μ l. Media NA dan PDA yang sudah steril dituang dalam cawan petri dibiarkan hingga memadat. Suspensi dengan kerapatan 10^8 CFU dicelupkan cotton bud. Cotton bud yang telah berisi suspensi, dioles pada permukaan media yang sudah memadat. Blankdisc yang sudah berisi ekstrak sampel dengan masing-masing konsentrasi diletakkan pada permukaan media yang sudah dioles mikroorganisme. Cawan uji diinkubasi 1 x 24 jam.

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian adalah diameter zona hambat masing-masing konsentrasi ekstrak daun pandan wangi terhadap mikroorganisme *Escherichia coli*, *Shigella dysentriae* dan *Candida albicans*. Data yang diukur adalah diameter zona hambat yang dimulai dari titik pusat hingga daerah terluar yang tidak ditumbuhi mikroba. Berdasarkan data tersebut maka data dianalisis statistik dengan *Rancangan Acak Lengkap* (RAL) dengan empat perlakuan dan empat ulangan, *Anova* dan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).