

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan peneliti adalah *true experimental design* ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao* L.). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao* L.) dari Kabupaten Bengalon memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*.

B. Subjek dan Objek penelitian

Dalam penelitian ini subjek yang digunakan adalah bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Serta objek pada penelitian ini yaitu ekstrak kulit buah coklat yang diambil dari Kabupaten Bengalon yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari-April 2022 di Laboratorium Kimia, Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Kimia Bahan Alam Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

D. Definisi Operasional

1. Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Kulit Buah Coklat (*Theobroma cacao* L.)

Aktivitas antibakteri dari ekstrak kulit buah coklat terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* diuji dengan menggunakan alat *mikro reader* dengan menggunakan *microplate* yang sudah berisi bakteri dan ekstrak yang sudah diinkubasi selama 24 jam, yang kemudian didapatkan hasil pengujian dalam bentuk data.

2. Konsentrasi Ekstrak kulit Buah Coklat (*Theobroma cacao* L.)

Konsentrasi ekstrak kulit buah coklat sudah ditetapkan dan dibagi menjadi beberapa konsentrasi. Pengukuran dari konsentrasi ekstrak dilakukan dengan menggunakan alat mikropipet agar mendapatkan konsentrasi yang diinginkan.

3. Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah tablet ciprofloxacin 500 mg yang sudah dibuat menjadi larutan, dengan menggunakan mikropipet.

4. Kontrol negatif

Kontrol negatif yang digunakan pada penelitian ini adalah suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

5. Lama Inkubasi

Lama inkubasi didalam inkubator yang dibutuhkan yaitu selama 24 jam setelah dimasukkannya kedalam *microplate*.

6. Media Pertumbuhan Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

Media pertumbuhan yang digunakan ada 2 jenis yaitu media padat dan media cair, media padat menggunakan media NA dan media cair menggunakan media NB.

E. Alat dan Bahan penelitian

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam melakukan penelitian ini antara lain: *Rotary Evaporator*, *waterbath*, pipet tetes, pipet volume, seperangkat alat gelas (*Pyrex*), spatula, timbangan analitik, *microtiter plate flat-bottom polystyrene 96 wells*, *mikroplate reader*, autoclave, jarum ose, cawan petri, tabung reaksi, Bunsen, LAF, mortar dan alu, gelas ukur, micropipet, *hot plate*, cawan porselen, laptop, oven, blender, autoklaf.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, aquades, kulit buah kakao, etanol 96%, serbuk Mg, Hcl pekat, pereaksi dragendorff, media agar NA, media NB, ciprofloxacin HCl 500 mg.

F. Metode Pengumpulan Data

1. Penyiapan sampel

a. Determinasi

Determinasi kulit buah coklat dilakukan di Laboratorium Kehutanan Universitas Mulawarman.

b. Penyiapan Sampel

Kulit buah coklat yang sudah diambil lalu dibersihkan, kemudian dikeringkan. Kemudian setelah kering kulit buah kakao dijadikan serbuk dan siap untuk diekstraksi.

c. Ekstraksi Kulit Buah Coklat

Kulit buah coklat yang sudah diserbukkan kemudian diambil dan ditimbang sebanyak 200 Gram, kemudian dimaserasi menggunakan etanol 96% sebanyak 2 liter selama 3 x 24 jam, proses maserasi dilakukan sebanyak 2 kali. Selanjutnya isolat yang didapat disaring dan difiltrat, lalu dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental kulit buah kakao.

2. Uji Fitokimia

a. Uji saponin

Aquadest dihangatkan sebanyak 20 ml menggunakan *hot plate*, kemudian ekstrak kulit buah coklat ditimbang sebanyak 0,5 g. selanjutnya ekstrak yang sudah ditimbang ditambahkan dengan aquadest yang sudah dihangatkan sebanyak 10 ml didalam cawan porselen, setelah tercampur dimasukkan kedalam tabung reaksi dan digojok selama 30 detik, kemudian amati jika terbentuk busa maka positif mengandung saponin (Pallawagau *et al.*, 2019).

b. Uji tanin

Aquadest dihangatkan terlebih dahulu menggunakan *hot plate* sebanyak 20 ml dan ekstrak kulit buah coklat ditimbang sebanyak 1 gr. Kemudian ekstrak kulit buah coklat ditambahkan dengan aquadest hangat sebanyak 10 ml didalam cawan

porcelain. Jika sudah tercampur kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dengan diteteskan FeCl_3 sebanyak 5 tetes, jika terjadi perubahan warna hijau kehitaman atau biru maka positif mengandung tanin (Kumalasari & Andiarna, 2020).

c. Uji alkaloid

Ekstrak kulit buah coklat ditimbang terlebih dahulu sebanyak 0,5 g, kemudian ditambahkan $\text{HCl} 2\text{N}$ sebanyak 1 ml dan ditambahkan aquadest sebanyak 9 ml, selanjutnya diletakkan di atas *waterbath* untuk dipanaskan selama 2 menit. Kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diteteskan pereaksi dragendorff sebanyak 3-5 tetes. Jika terdapat endapan berwarna merah atau terjadi perubahan warna menjadi jingga maka positif mengandung alkaloid (Astuti et al., 2021).

d. Uji flavonoid

Ekstrak kulit buah coklat ditimbang terlebih dahulu sebanyak 0,5-1 g, kemudian ditambahkan etanol 96% lalu dipanaskan menggunakan *waterbath* selama 2 menit. Kemudian pindahkan ke dalam tabung reaksi dengan ditambahkan serbuk mg sebanyak 0,1 g dan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Jika terjadi perubahan warna menjadi hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat maka positif mengandung flavonoid (K. Khotimah, 2016).

3. Uji aktivitas Antibakteri Dengan Metode Mikrodilusi

a. Pembuatan Media Agar Na

Nutrient Agar (NA) diambil sebanyak 1,4 g dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan dilarutkan dalam 70 mL aquadest, dilakukan sebanyak 2 kali. Kemudian diaduk dan dipanaskan menggunakan *hot plate* untuk media tercampur secara merata. Selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C , lalu ditunggu hingga suhu hangat ($40-45^\circ\text{C}$),

kemudian NA dituangkan kedalam cawan petri dan didiamkan sampai memadat.

b. Pembuatan Media Nb

Sebanyak 0,16 g media Nutrient broth (NB) dimasukkan ke dalam *beaker glass* dilarutkan dalam aquadest sebanyak 200 mL, diaduk dan dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* agar media tercampur secara merata. Selanjutnya media yang sudah dibuat dimasukkan kedalam autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C, lalu ditunggu hingga suhu hangat (40-45°C), kemudian NB dituangkan kedalam cawan petri dan didiamkan sampai memadat.

c. Pembuatan larutan stok

Dilarutkan setiap 0,01 gr sampel dengan etanol sebanyak 100 µg dan aquadest 900 µg. untuk mendapatkan konsentrasi 1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,13% dilakukan pengenceran dengan cara sampel yang sudah ditambahkan dengan etanol dan aquadest diambil sebanyak konsentrasi yang sudah ditentukan kemudian ditambahkan aquadest hingga menjadi 1000 µg.

d. Pengujian antibakteri

Pengujian antibakteri dilakukan dengan menggunakan *microtiter plate-bottom polystyrene 96 wells* dengan konsentrasi dari ekstrak antara lain 1%, 0,5%, 0,25%, 0,13% b/v. Setelah dimasukkan ekstrak dengan konsentrasi yang sudah ditentukan lalu diinkubasi didalam inkubator dengan suhu 37°C selama 2

G. Jadwal penelitian

Tabel 3.1. Jadwal Penelitian

		BULAN					
No.	Jenis Kegiatan	JAN	FEB	MAR	APR	MEI	JUN
1.	Identifikasi sampel						
2.	Pengambilan sampel						
3.	Pengolahan data						
4.	Penyusunan hasil dan pembahasan						
5.	Seminar/ ujian hasil						