

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang diperoleh dari *Edu Park* Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi dalam penelitian. Sampel yang digunakan adalah daun muda dari tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) dengan spesifikasi daun berwarna cokelat kemerahan. Daun yang akan digunakan adalah daun yang masih segar, dan terbebas dari hama dan penyakit. Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari di *Edu Park* Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jawa Tengah yang diambil pada bulan Januari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dari penelitian ini adalah uji aktivitas antibakteri ekstrak daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang biasa diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi dari ekstrak daun pucuk merah.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak daun pucuk merah terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 di media uji.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara cepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kondisi laboratorium, media yang digunakan dalam penelitian, kemurnian bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311, pemilihan daun pucuk merah, waktu panen, dan metode ekstraksi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun muda tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) adalah daun dari tanaman pucuk merah yang berada di pucuk daun, segar, sehat, dan bebas dari hama penyakit yang tumbuh di *Edu Park* Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun pucuk merah adalah serbuk yang diperoleh dari daun muda tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir dan dikeringkan dengan oven 40°C, lalu dibuat serbuk dan diayak dengan pengayak no 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun pucuk merah adalah hasil ekstraksi serbuk daun pucuk merah dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Keempat, ekstrak etil asetat daun pucuk merah adalah hasil ekstraksi serbuk daun pucuk merah dengan cara maserasi menggunakan pelarut etil asetat lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Kelima, ekstrak *n*-heksana daun pucuk merah adalah hasil ekstraksi serbuk daun pucuk merah dengan cara maserasi menggunakan pelarut *n*-heksanalalu dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Keenam, bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 yang diperoleh dari laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketujuh, uji aktivitas antibakteri adalah uji aktivitas secara difusi dan dilusi, dengan mengukur diameter zona hambat secara difusi dan menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) secara dilusi.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah spidol, penggaris, neraca analitik, jarum ose, cawan petri steril, kapas lidi steril, tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, *object glass*, incubator, kertas cakram ukuran 6 mm, mikropipet, autovortex mixer, gelas ukur, pipet volume, botol vial, autoklaf, oven, pinset, neraca analitik, bejana maserasi, Erlenmeyer, *waterbath*, *rotary evaporator*, *moisture balance*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.), bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311, etanol 70%, etil asetat, *n*-heksana, *Brain Heart Infusion* (BHI), HCl, aquadestilata, FeCl₃ 1%, larutan dragendroff, asam sulfat pekat, asam asetat, DMSO 5%, serbuk Mg, SIM, KIA, LIA, Sitrat, MHA, SSA, cat kristal violet, larutan lugol, larutan iodine, safranin, siprofloksasin, standar Mc Farland 0,5.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman berkaitan dengan ciri-ciri morfologi tanaman pucuk merah sesuai kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Tanaman pucuk merah diambil di *Edu Park* Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jawa Tengah.. Sampel yang digunakan adalah pucuk daun yang berwarna merah yang diambil dalam keadaan segar kemudian dicuci dan dikeringkan untuk dilakukan ekstraksi.

3. Pengeringan bahan

Daun pucuk merah yang telah dipilih dicuci dengan air dan dibersihkan dari kotoran yang menempel. Daun yang sudah bersih dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C.

4. Pembuatan serbuk simplisia

Daun pucuk merah yang telah kering kemudian diblender lalu diayak dengan ayakan nomor 40. Pembuatan serbuk bertujuan agar luas partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sehingga penyarian berlangsung secara efektif.

5. Pengukuran susut pengeringan serbuk daun pucuk merah

Pengukuran susut pengeringan dilakukan dengan cara menimbang serbuk daun pucuk merah sebanyak 2 gram kemudian diukur susut pengeringannya menggunakan alat *moisture balance* dengan suhu 105°C. Pengukuran susut pengeringan dilakukan sampai diperoleh bobot konstan yang dilakukan penimbangan sebanyak tiga kali. Kadar susut pengeringan memenuhi syarat dimana suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%.

6. Pembuatan ekstrak

Ekstraksi serbuk daun pucuk merah dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Serbuk daun pucuk merah ditimbang masing-masing sebanyak 400 gram lalu dimasukkan ke dalam bejana maserasi kemudian ditambahkan etanol 96%, etil asetat, dan *n*-heksana dalam bejana yang berbeda. Serbuk direndam dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia ke dalam bejana kemudian dituangi 75 bagian penyari, ditutup, dan dibiarkan selama 5 hari sambil nerulang-ulang diaduk. Setelah 5 hari diserkai dan diperas. Ampas ditambah cairan penyari 25 bagian sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian (DepKes RI 1986). Maserat dipisahkan dengan cara filtrasi, kemudian filtrat dengan ampas dipisahkan dengan menggunakan kain flanel dan kertas saring. Filtrat kemudian dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 40°C dan diuapkan dengan *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental daun pucuk merah.

7. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk memastikan agar ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri. Ekstrak yang telah dipekatkan diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol

ditandai dengan tidak terbentuknya bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 2006).

8. Identifikasi kandungan senyawa kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman yang akan diteliti.

8.1 Identifikasi flavonoid. Larutan hasil ekstraksi dimasukkan dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan serbuk Mg dan larutan HCl 2N. Campuran ini dipanaskan selama 5-10 menit. Setelah dingin disaring, filtrate ditambahkan dengan amil alcohol lalu dikocok kuat-kuat. Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning atau jingga pada lapisan amil alcohol (Robinson 1995).

8.2 Identifikasi alkaloid. Larutan hasil ekstraksi dibasakan dengan larutan ammonia 10% kemudian disari dengan kloroform. Ekstrak kloroform diasamkan dengan HCl 1N, kemudian bagian asam dipisahkan dan filtrate diuji dengan pereaksi dragendorff. Hasil positif ditandai dengan adanya kekeruhan atau endapan jingga kecoklatan. Jika ditambahkan dengan pereaksi mayer hasil positif akan terbentuk endapan putih kekuningan menyatakan adanya alkaloid (Harborne 1987).

8.3 Identifikasi saponin. Larutan hasil ekstraksi dididihkan selama 5 menit dalam penangas air. Setelah dingin kemudian disaring dan filtrate dikocok kuat-kuat dengan arah vertical selama 1-2 menit. Adanya senyawa saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa setinggi 1cm yang stabil setelah dibiarkan selama 1 jam atau pada penambahan 1 tetes HCl 0,1N (Harborne 1987).

8.4 Identifikasi fenolik. Larutan hasil ekstraksi dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan FeCl_3 dalam larutan etanol. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau, merah ungu, biru dan hitam (Robinson 1995).

9. Sterilisasi alat

Alat-alat gelas yang digunakan dicuci terlebih dahulu hingga bersih kemudian dibungkus dengan koran dan disterilkan dalam oven pada suhu 160°C

selama 2 jam. Jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. Media yang digunakan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan suspensi bakteri uji dilakukan dengan cara mengambil biakan murni dengan ose steril kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi steril yang sudah berisi 10 mL BHI (*Brain Heart Infusion*) secara aseptis. Kekeruhan suspensi bakteri disetarakan dengan larutan standar *Mc Farland* 0,5 kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dengan tujuan agar didiapatkan bakteri yang lebih banyak. Selanjutnya digunakan sebagai identifikasi.

11. Identifikasi bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311

11.1 Identifikasi dengan goresan. Biakan murni bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311 diambil dengan ose kemudian dimasukkan dalam tabung yang berisi BHI (*Brain Heart Infusion*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Identifikasi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dilakukan dengan cara bakteri uji diinokulasi pada media SSA (*Salmonella-shigella Agar*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Koneman *et al.* 1983).

11.2 Identifikasi dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan bakteri Gram negatif *S.typhi* ATCC 13311 menggunakan Gram A (cat Kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai pengintensif warna), Gram C (etanol : aseton = 1 : 1 sebagai peluntur warna) dan Gram D (Cat safranin sebagai penutup). Identifikasi diawali dengan membuat preparat bakteri uji *S.typhi* ATCC 13311. Preparat ditetesi pewarna Gram A sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Kelebihan pewarna dibuang dengan memiringkan kaca objek di atas bak pewarna. Pewarna Gram B ditetaskan sebanyak 2-3 tetes pada preparat dengan memiringkan kaca objek. Cuci dengan Gram C setetes demi setetes selama 3 detik atau sampai zat ungu kristal tidak tampak lagi. Tetesi dengan Gram D sebanyak 2-3 tetes selama 30 detik, buang kelebihan pewarna lalu bilas dengan air, tiriskan kaca objek dan serap kelebihan air dengan menekankan kertas serap di atasnya. Kemudian amati di bawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 100x dan lensa okuler dengan perbesaran 10x.

11.3 Identifikasi secara biokimia. Identifikasi secara biokimia dilakukan dengan menggunakan medium KIA, LIA, SIM, dan Sitrat.

Uji pada media KIA (*Kliger Iron Agar*), biakan bakteri diinokulasi dengan cara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pengujian pada media KIA bertujuan untuk uji fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan sulfide. Hasil positif pada *S.typhi* ATCC 13311 ditandai dengan bagian lereng berwarna merah maka ditulis K, bagian dasar berwarna kuning ditulis A, terbentuk warna hitam pada medium ditulis S(+) dan adanya gas ditandai dengan adanya keretakan pada medium dan terangkat keatas ditulis G(+) (Koneman *et al.* 1983).

Uji pada media LIA (*Lysine Iron Agar*), biakan bakteri diinokulasi dengan cara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pengujian biokimia pada media LIA bertujuan untuk menguji diaminasi lisin dan sulfide. Hasil positif pada *S.typhi* ATCC 13311 ditandai dengan bagian lereng akan berwarna ungu maka ditulis K dan medium berwarna hitam maka ditulis S(+) (Koneman *et al.* 1983).

Uji pada media SIM (*Sulfida Indol Motility*), biakan bakteri diinokulasi dengan cara tusukan dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pengujian pada media SIM bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfide, indol, dan motilitas bakteri. Hasil positif pada *S.typhi* ATCC 13311 ditandai dengan media berwarna hitam (uji sulfide), terbentuk cincin indol warna merah setelah ditambah reagen erlich (uji indol), dan terjadi pertumbuhan bakteri yang menyebar pada seluruh media (uji motilitas) (Koneman *et al.* 1983).

Uji pada media Sitrat, biakan bakteri diinokulasi dengan cara goresan dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pengujian pada media Sitrat bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Hasil positif pada *S.typhi* ATCC 13311 ditandai dengan media berwarna biru (Koneman *et al.* 1983).

12. Pengujian daya antibakteri dengan metode difusi

Masing-masing ekstrak yang diperoleh secara maserasi dilakukan pengujian secara difusi terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Pengujian dilakukan dengan mengambil biakan bakteri dalam media BHI dengan kapas lidi steril dan digoreskan pada medium MHA secara merata lalu didiamkan selama 10 menit agar suspensi biakan bakteri berdifusi kedalam media. Media MHA yang sudah berisi bakteri diletakkan 5 cakram masing-masing berukuran \pm 6 mm yang ditetesi menggunakan mikropipet sebanyak 10 μ L ekstrak daun pucuk merah menggunakan 4 seri konsentrasi yaitu 20%, 25%, 30%, dan 35%. Kontrol positif menggunakan disk antibiotik kloramfenikol dan kontrol negatif pelarut DMSO 5%, tween 80 10%, dan CMC Na 0,5% masing-masing dengan volume 10 μ l. Inkubasi dilakukan selama 18-24 jam pada suhu 37°C, lalu diamati terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar kertas cakram menandakan bahwa kandungan kimia memiliki daya hambat terhadap bakteri. Pengujian secara difusi dilakukan dengan 3 kali replikasi.

13. Pengujian daya antibakteri dengan metode dilusi

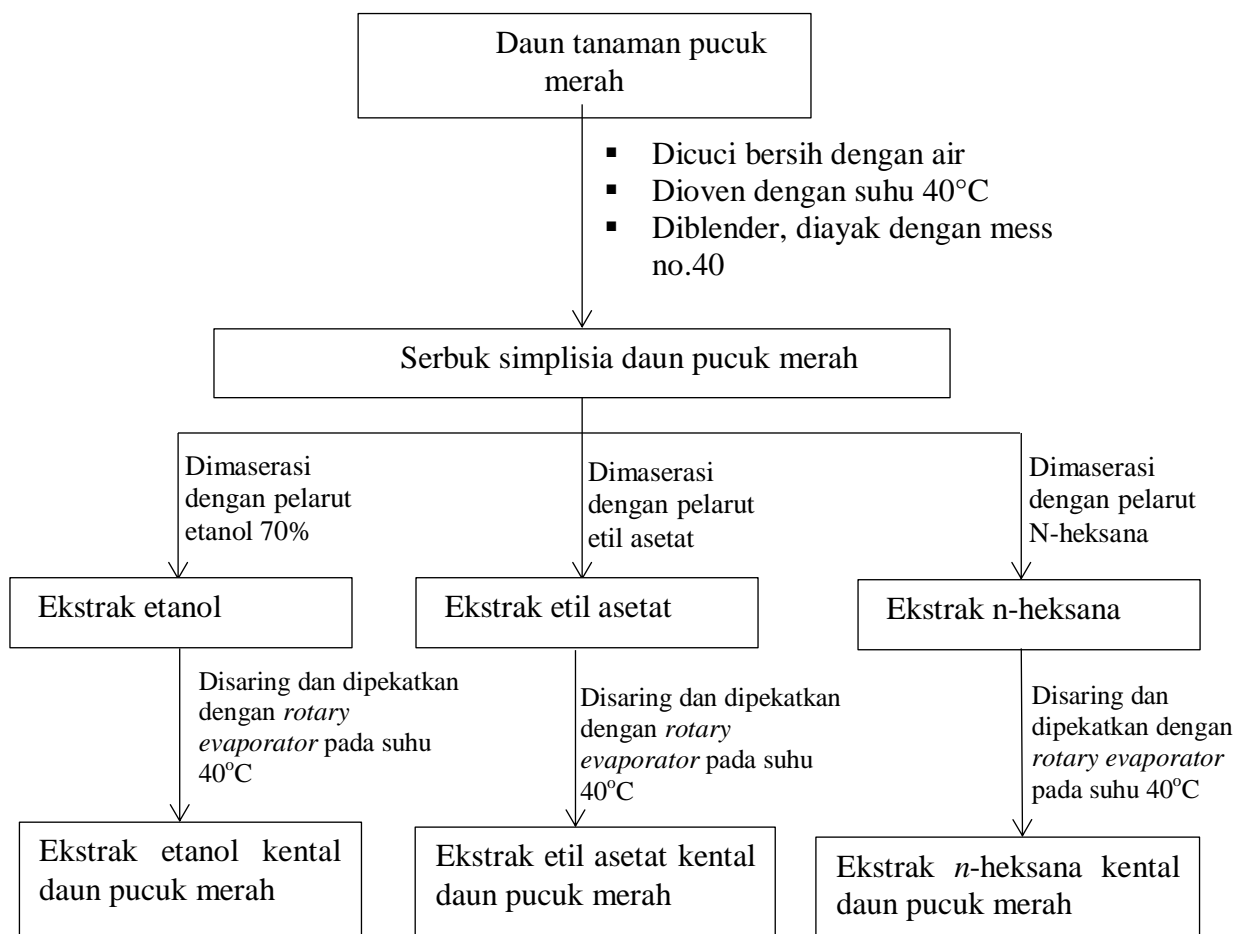
Metode dilusi dilakukan dengan cara memasukkan bahan uji kedalam masing-masing tabung reaksi kecuali tabung sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Metode dilusi menggunakan 8 tabung reaksi steril terdiri dari 6 tabung reaksi steril sebagai seri konsentrasi ekstrak teraktif dan 2 tabung reaksi steril sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Tabung reaksi sebagai kontrol positif diisi dengan 2 ml suspensi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311, sedangkan pada tabung reaksi steril kontrol negatif dimasukkan 2 ml ekstrak teraktif. Larutan stok dibuat seri konsentrasi menjadi 8 seri konsentrasi meliputi 30% ; 15% ; 7,5% ; 3,75% ; 1,875% ; 0,94% ; 0,468% ; 0,234%. Secara aseptis media BHI dimasukkan 1 ml pada tiap tabung seri konsentrasi kecuali tabung kontrol negatif dan kontrol positif. Dimasukkan 1 ml larutan stok dengan konsentrasi teraktif yang akan diuji pada tabung 1, kemudian dari tabung 1 dipipet 1 ml dimasukkan ke dalam tabung 2, kemudian dari tabung 2 dipipet 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung 3 begitu seterusnya sampai tabung 8 kemudian dibuang. Biakan bakteri sebanyak 1 ml di tambahkan ke tabung 1 sampai tabung 8. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Konsentrasi yang rendah pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang

mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM dari bahan uji. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media SSA untuk masing-masing bakteri uji. Bakteri yang sudah digoreskan pada media SSA diinkubasi pada 37°C selama 24-48 jam. Diamati ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media MHA yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

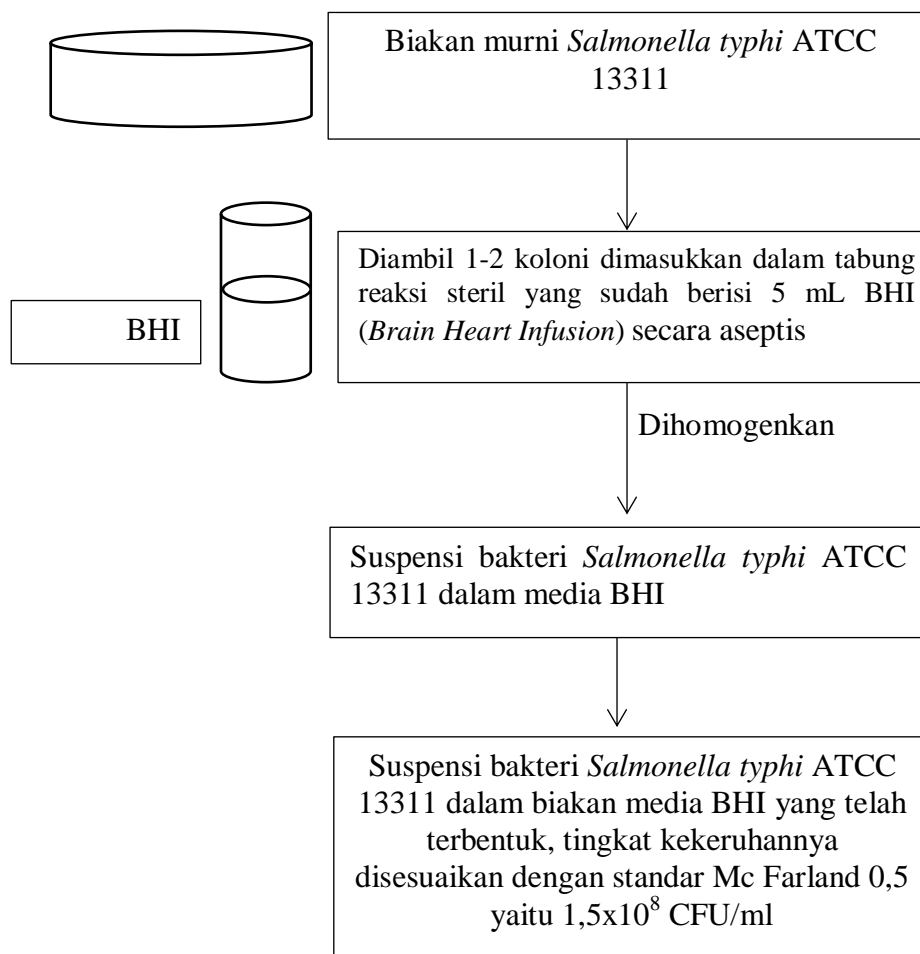
E. Analisis Hasil

Data aktivitas antibakteri masing-masing ekstrak yang diperoleh berupa nilai besarnya zona hambat atau zona bening dari konsentrasi ekstrak tanaman pucuk merah dalam milimeter. Besarnya nilai zona hambat atau zona bening yang dihasilkan dari kontrol positif dan perlakuan pada bakteri yang sama dianalisis dengan metode *Kolmogorv-Smirnov*. Hasil yang diperoleh jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan *analysis of varian* (ANOVA) dua jalan dengan tarif kepercayaan 95%, jika tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan metode uji non parametrik dengan metode uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya.

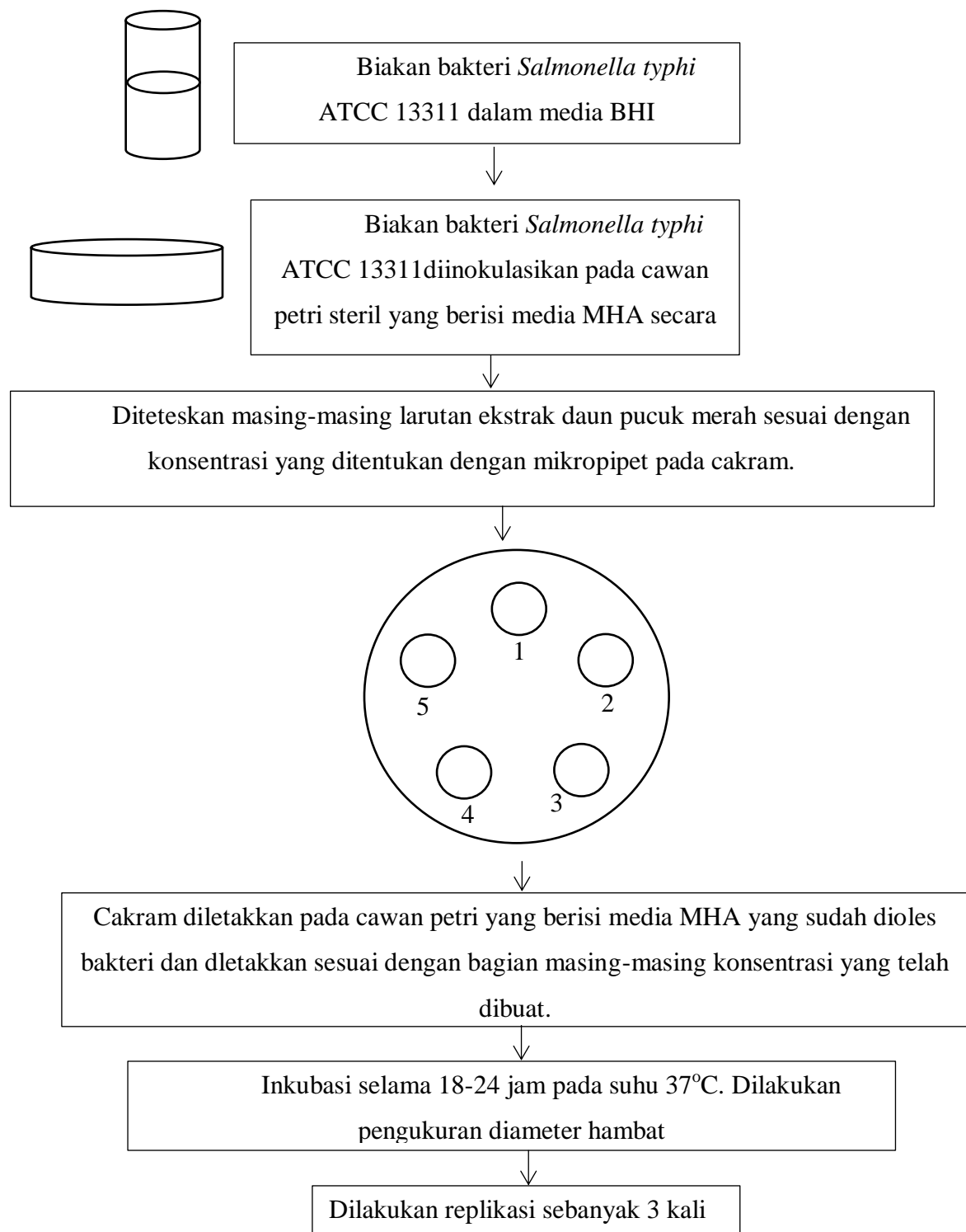
F. Skema Penelitian



Gambar 3. Skema ekstraksi daun pucuk merah.



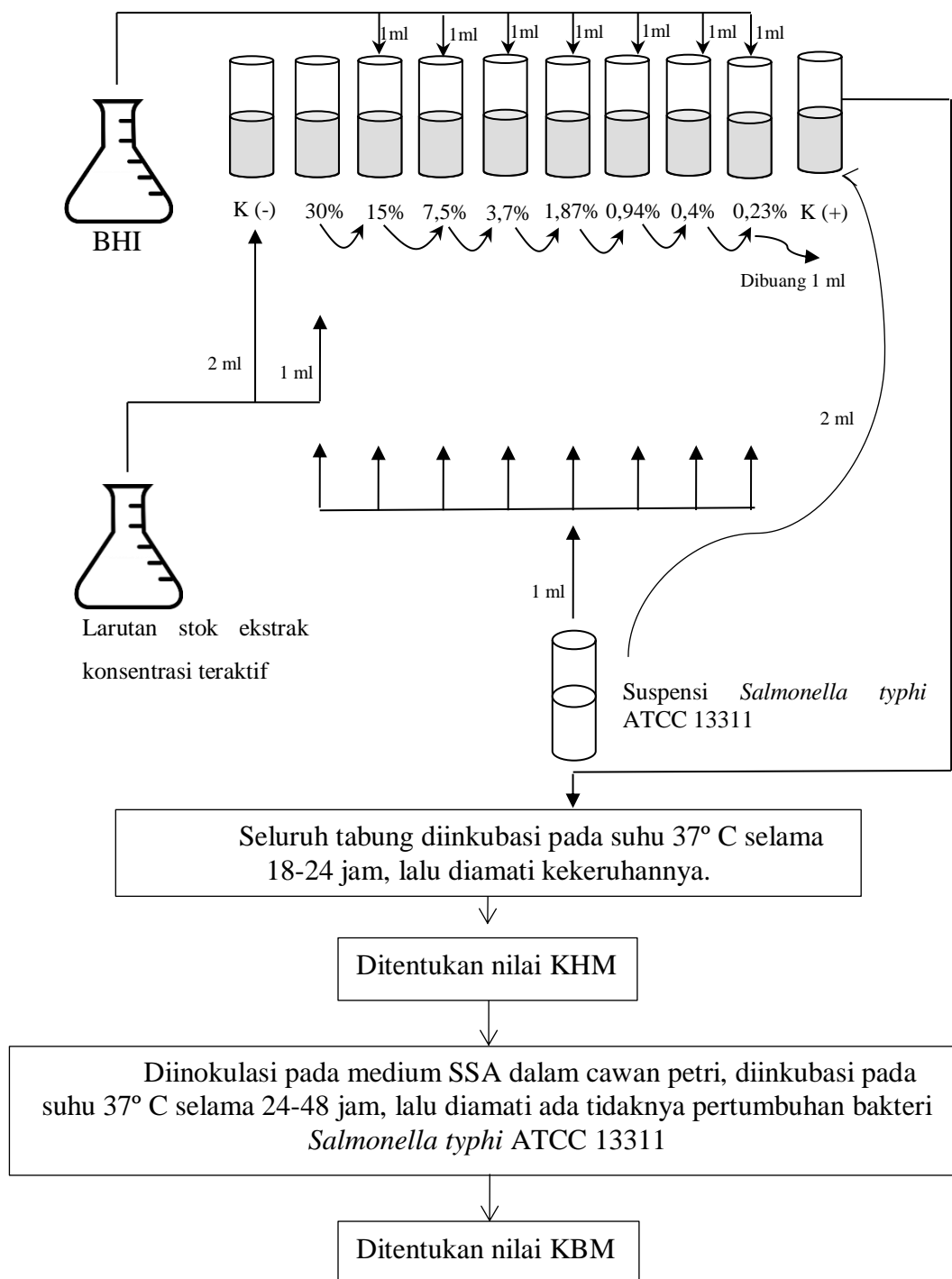
Gambar 4. Skema pembuatan suspensi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311



Keterangan:

(1) Kontrol positif disk skloramfenikol , (2) Kontrol negatif (3) Ekstrak etanol, (4) Ekstrak etil asetat, (5) Ekstrak n-heksana

Gambar 5. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi.



Gambar 6. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi.