

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang diperoleh dari Mojogedang, Karanganyar, Jawa Tengah.

##### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *Syzygium polyanthum* yang diperoleh dari Mojogedang, Karanganyar, Jawa Tengah dengan kondisi masih segar, tidak busuk, dan belum berubah warna. Daun salam *Syzygium polyanthum* yang diperoleh dari Mojogedang, Karanganyar, Jawa Tengah diambil secara acak, dipilih daun yang tidak terlalu muda juga tidak terlalu tua dengan kondisi masih segar, berwarna hijau dan bersih dari kotoran.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama adalah variabel yang membuat identifikasi dari semua variabel yang akan diteliti secara langsung. Variabel utama penelitian ini yaitu ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun salam.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun salam terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama utama memuat identifikasi dari semua variabel yang akan diteliti langsung. Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan menjadi beberapa macam, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun salam dengan berbagai konsentrasi.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang dipengaruhi oleh ekstraksi atau fraksinasi daun salam yang dilihat dari daya hambat dan daya bunuhnya.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, kondisi laboratorium (meliputi, inkas, alat dan bahan harus steril, media yang digunakan, tempat tumbuh tanaman, waktu panen, dan metode maserasi).

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun salam adalah bagian tanaman salam yang diperoleh dari daerah Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun salam adalah daun salam yang berbentuk butiran homogen dengan derajat halus yang sesuai dan kering.

Ketiga, ekstrak etanol 70% daun salam adalah hasil ekstraksi serbuk daun salam dengan pelarut etanol 70% secara remaserasi.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah fraksi dari ekstrak etanol 70% daun salam yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan sebagai pelarut non polar, kemudian dipekatkan dengan rotaevaporator sehingga didapat fraksi *n*-heksan.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksinasi dari air residu fraksi *n*-heksan dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar, kemudian dipekatkan dengan rotaevaporator sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah hasil fraksinasi dari residu etil asetat dengan menggunakan air sebagai pelarut polar, kemudian dipekatkan dengan *waterbath*.

Ketujuh, *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah bakteri gram negatif yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi untuk ekstrak etanol 70%, dan fraksi daun salam, sedangkan metode dilusi untuk fraksi teraktif dari daun salam.

Kesembilan, tujuan metode difusi adalah mengukur luas daerah hambatan pertumbuhan bakteri dengan kontrol negatif adalah DMSO 5% dan kontrol positif antibiotik kotrimoksazol, dan konsentrasi yaitu 50%, 25%, 12,5%.

Kesepuluh, tujuan metode dilusi adalah untuk menentukan nilai KHM dan KBM dengan konsentrasi : 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,5625%; 0,7813%; 0,3906%; 0,1959%; 0,0977% dengan kontrol negatif fraksi teraktif dan kontrol positif suspensi bakteri.

## C. Bahan dan Alat

### 1. Bahan

**1.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam diambil dari Karanganyar, Jawa Tengah.

**1.2 Bakteri uji.** Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922.

**1.3 Medium.** Media ini digunakan untuk menangkap atau menumbuhkan bakteri: BHI (*Brain Heart Infusion*), MHA (*Mueller Hinton Agar*), EA (*Endo Agar*), NA (*Nutrient Agar*), SIM, KIA, LIA dan Sitrat.

**1.4 Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%, *n*-heksan, etil asetat, aquadest steril, DMSO 5%, HCL 2N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, FeCl<sub>3</sub>, Serbuk Mg, larutan mayer, larutan dragendrof, safranin (gram D), alkohol (gram C), larutan kristal violet (gram A), dan larutan mordant (gram B).

### 2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat penyerbuk, ayakan no. 40, timbangan analitik, mikropipet, seperangkat alat vacum rotary evaporator, labu takar, gelas ukur, batang pengaduk, cawan penguap, seperangkat alat *moisture balance*, seperangkat alat *Sterling Bidwell*, autoklaf, inkubator, inkas, jarum ose, kapas lidi, tabung reaksi, rak tabung reaksi, oven, lampu spiritus, cawan petri, beaker glass, pipet ukur, penggaris, kertas saring, kain flannel, dan pinset.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman salam yang bertujuan untuk menghindari kemungkinan tercampurnya bahan dan

untuk mengidentifikasi apakah bahan yang diambil benar-benar tanaman salam, dengan mencocokkan ciri morfologi yang ada pada tanaman salam dengan acuan buku. Tanaman salam diidentifikasi di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, Karanganyar.

## **2. Pembuatan serbuk daun salam**

Pembuatan serbuk daun salam adalah dengan cara 10 kg daun salam dicuci bersih dengan air mengalir terlebih dahulu. Daun salam yang sudah bersih dikeringkan dan dioven dengan suhu 40°C, setelah kering segera diserbuk dengan mesin penyerbuk kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 sehingga didapatkan serbuk daun salam yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen. Penyerbukan ini bertujuan agar luas permukaan partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sehingga penyarian dapat langsung secara efektif.

## **3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun salam**

Penetapan susut pengeringan daun salam diuji menggunakan alat *moisture balance*. Suhu atau temperatur diatur yaitu sebesar 105°C dan waktu pengeringan secara manual hingga kering. Serbuk daun salam dimasukkan neraca timbang dengan posisi 0,00, lalu dimasukkan serbuk daun salam sebanyak 2 gram. Ditunggu sampai alat berbunyi menandakan hasil analisa telah selesai. Susut pengeringan memenuhi syarat dimana kadar air tidak boleh lebih dari 10%.

## **4. Pembuatan ekstrak etanol 70% daun salam**

Serbuk daun salam sebanyak 1000 gram kemudian dimasukkan ke dalam botol, dengan ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10 (Jurian *et al.* 2016). Campuran didiamkan selama 5 hari, dalam sehari digojog selama 1 jam. Maserat dan ampas dipisahkan, maserat yang didapatkan disaring, kemudian dipekatkan dengan evaporator sampai didapat maserat yang pekat.

## **5. Penetapan kadar air**

Penetapan kadar air ekstrak daun salam dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Metode ini dilakukan dengan cara menimbang ekstrak daun salam 20 gram dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan 125 ml pelarut

toluen, kemudian memasang alat *Sterling Bidwell*. Dipanaskan labu dengan hati-hati dengan api kecil, setelah mendidih api dibesarkan. Pemanasan dihentikan jika pada tetesan sudah tidak ada lagi air yang menetes. Kemudian diukur kadar airnya dengan menggunakan alat *Sterling Bidwell* dengan melihat volume pada skala alat tersebut. Kadar air dihitung dalam % v/b (Kementrian Kesehatan RI 2013).

#### **6. Penetapan kadar rendemen**

Persen rendemen diperoleh dari menimbang hasil ekstrak kemudian dibagi berat serbuk daun salam kering dan dikalikan 100%

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{berat serbuk daun salam (} \textit{Syzygium polyanthum} \text{)}} \times 100\%$$

#### **7. Tes bebas etanol ekstrak daun salam**

Uji bebas etanol daun salam dilakukan dengan cara esterifikasi etanol, dimana ekstrak ditambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, bila tidak ada bau ester berarti sudah tidak terdapat etanol (Praeparandi 2006).

#### **8. Fraksinasi ekstrak daun salam**

Ekstrak daun salam sebanyak 10 gram dilarutkan dengan 10 ml etanol dan 65 ml air, kemudian dimasukkan dalam corong pisah dan ditambahkan *n*-heksan dengan diekstraksi cair-cair sebanyak 3x masing-masing 75 ml. Fase *n*-heksan ditampung dipekatkan dengan vacuum rotary evaporator sehingga menjadi fraksi *n*-heksan. Fase air yang terbentuk selanjutnya diekstraksi cair-cair dengan pelarut etil asetat sebanyak 3x masing-masing 75 ml. Fase etil asetat yang didapat dipekatkan dengan vacuum rotary evaporator sehingga menjadi fraksi etil asetat dan residu air ditampung dalam wadah lalu dikeringkan dengan *waterbath* sehingga menjadi fraksi air.

#### **9. Identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi teraktif daun salam**

Identifikasi kandungan senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat pada daun salam. Pengujian kandungan

senyawa saponin, flavonoid, alkaloid, dan tanin dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi.

**9.1 Identifikasi saponin.** Serbuk, ekstrak, dan fraksi teraktif ditimbang sebanyak 0,1 gram lalu dilarutkan dalam air panas kemudian dikocok dengan kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan terbentuknya busa yang stabil setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit. Pada penambahan 1 tetes HCL buih tidak hilang (Setyowati *et al.* 2014).

**9.2 Identifikasi flavonoid.** Sebanyak 0,1 gram serbuk, ekstrak dan fraksi teraktif dilarutkan dalam etanol panas dan ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCL pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuk warna jingga (Setyowati *et al.* 2014).

**9.3 Identifikasi alkaloid.** Serbuk, ekstrak, dan fraksi teraktif ditimbang sebanyak 0,1 gram ditambah 1 ml HCl 2N dan 9 ml aquadestilata lalu dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian, masing-masing ditambah pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendroff. Hasil positif ditunjukkan terbentuk endapan putih, terbentuk warna coklat kemerahan, terbentuk warna jingga (Setyowati *et al.* 2014).

**9.4 Identifikasi tanin.** Serbuk, ekstrak, dan fraksi teraktif sebanyak 0,1 gram ditambahkan aquadest sampai terendam dan dipanaskan selama 3 sampai 5 menit lalu direaksikan dengan menambahkan  $FeCl_3$ . Perubahan warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Ramyashree *et al.* 2012).

## 10. Sterilisasi

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}C$  dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Cawan petri dan tabung reaksi disterilkan dengan oven pada suhu  $170^{\circ}-180^{\circ}C$  selama 1 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung dan sterilisasi inkas menggunakan alkohol (Suriawiria 2005).

## 11. Identifikasi bakteri *Escherichia coli*

**11.1 Identifikasi bakteri uji secara makroskopis.** Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasi pada media selektif EA (Endo Agar) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}C$ . Berdasarkan pengamatan koloni yang dihasilkan

berwarna merah dengan kilat logam yang permanen. Warna koloni merah disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* dan koliform memetabolisme laktosa menjadi aldehid dan asam sehingga aldehid bereaksi dengan fuksin. Aldehid akan melepaskan fuksin dari senyawa fuksin-sulfat kemudian akan mewarnai koloni merah dan akan terlihat berwarna seperti kilatan logam (Kartika *et al.* 2014).

### **11.2 Identifikasi mikroskopis bakteri uji dengan pewarnaan Gram.**

Pewarnaan dilakukan untuk meyakinkan bahwa bakteri tersebut golongan *Escherichia coli*. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat preparat ulasan yang difiksasi kemudian ditetesi kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai ulasan terwarnai, didiamkan selama kurang lebih 1 menit, kemudian dicuci dengan aquadest mengalir. Preparat lalu ditetesi mordant (lugol's iodine / Gram B), didiamkan selama kurang lebih 1 menit kemudian dicuci kembali dengan aquadest mengalir dan diangin-anginkan. Preparat dilunturkan dengan gram C (alkohol) sampai alkohol jatuh berwarna jernih, lalu dicuci dengan aquadest mengalir. Preparat ditetesi dengan gram D (safranin) dan ditunggu 45 detik kemudian preparat dicuci dengan aquadest mengalir setelah itu preparat dikeringkan dengan *tissue* yang ditempelkan disisi ulasan lalu didiamkan sampai mengering di udara dan diamati di bawah mikroskop (Volk & Weeler 1988).

**11.3 Identifikasi bakteri uji secara biokimia.** Identifikasi berdasarkan uji biokimia dengan menggunakan media SIM, KIA, LIA dan Sitrat. Pertama, media SIM (*Sulfida Indol Motility*). Biakan murni diinokulasi pada permukaan media dengan diinokulasi ditusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Uji sulfida positif bila media berwarna hitam. Uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah dengan reagen Erlich A dan B 5 tetes. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. Hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagella. Hasil positif *E.coli* ditunjukkan Sulfide negatif, Indol positif, Motility positif (-++) (Sri 2016).

Kedua, media KIA (*Kliger's Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi ditusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui sulfida, asam, dan gas. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, ada tidaknya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada bagian lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+). Pada bagian miring, jika bakteri dapat memfermentasi laktosa dan sakarosa, warna media berubah menjadi kuning. Hasil positif *E. coli* ditunjukkan (A/AKS<sup>+</sup>) (Sri 2016).

Ketiga, media LIA (*Lysin Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara ditusukkan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida dan deaminasi lisin. Selanjutnya diamati pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media menunjukkan uji sulfida positif. Hasil positif *E. coli* ditunjukkan (K/KS<sup>+</sup>) (Sri 2016).

Keempat, media Sitrat. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara ditusukkan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Bakteri yang memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon akan menghasilkan natrium karbonat yang bersifat alkali, sehingga adanya indikator brom thymol blue menyebabkan warna biru pada media. Uji ini positif bila media berwarna biru dan negatif jika media tetap berwarna hijau. Hasil positif *E. coli* ditunjukkan sitrat negatif (Sri 2016).

## **12. Pembuatan suspensi bakteri uji**

Bakteri diambil 2-3 koloni dari stock biakan suatu biakan *Escherichia coli* ATCC 25922 lalu dimasukkan dalam BHI 2 ml, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam kemudian diambil 100-200 µl masing-masing dimasukkan ke dalam tabung berisi 1 ml BHI, diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-5 jam, lalu diencerkan dengan NaCl 0,9% sampai kerapatan bakteri sama dengan standar McFarland 10<sup>8</sup> CFU/ml kemudian dimasukkan dalam media cair BHI sampai konsentrasi 10<sup>6</sup> CFU/ml (Sari *et al.* 2010).

### **13. Pengujian antibakteri daun salam secara difusi**

Ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang diperoleh diuji secara mikrobiologi dengan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Pengujian daya antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta. Metode yang digunakan yaitu difusi dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat kemudian diinokulasi ke dalam medium MHA (*Mueller Hinton Agar*) dengan metode perataan (*Spread Plate Method*) dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Uji difusi ini menggunakan metode cakram disk, dimana masing-masing cakram *disk* telah ditetesi sebanyak 20 µl, ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air, kotrimoksazol sebagai kontrol positif, dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif karena merupakan pelarut polaritas yang efektif melarutkan berbagai bahan kimia organik maupun anorganik, dengan menggunakan mikropipet. Konsentrasi fraksi dalam tiap petri masing-masing 50%, 25%, 12,5%. Pembuatan fraksi *n*-heksan dan etil asetat menggunakan pelarut DMSO 5%, sedangkan fraksi air dilarutkan dalam aquadest steril. Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya, setelah itu diukur diameter zona hambat sekitar cakram disk yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram disk menandakan bahwa kandungan kimia dari daun salam memiliki daya hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali.

### **14. Pengujian antibakteri daun salam secara dilusi**

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah suatu sediaan yang dapat membunuh bakteri uji. Metode ini menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 10 tabung steril secara aseptis. Metode ini dilakukan dengan memasukan bahan uji ke dalam masing-masing tabung reaksi kecuali satu tabung sebagai kontrol positif dan satu tabung lagi sebagai kontrol negatif.

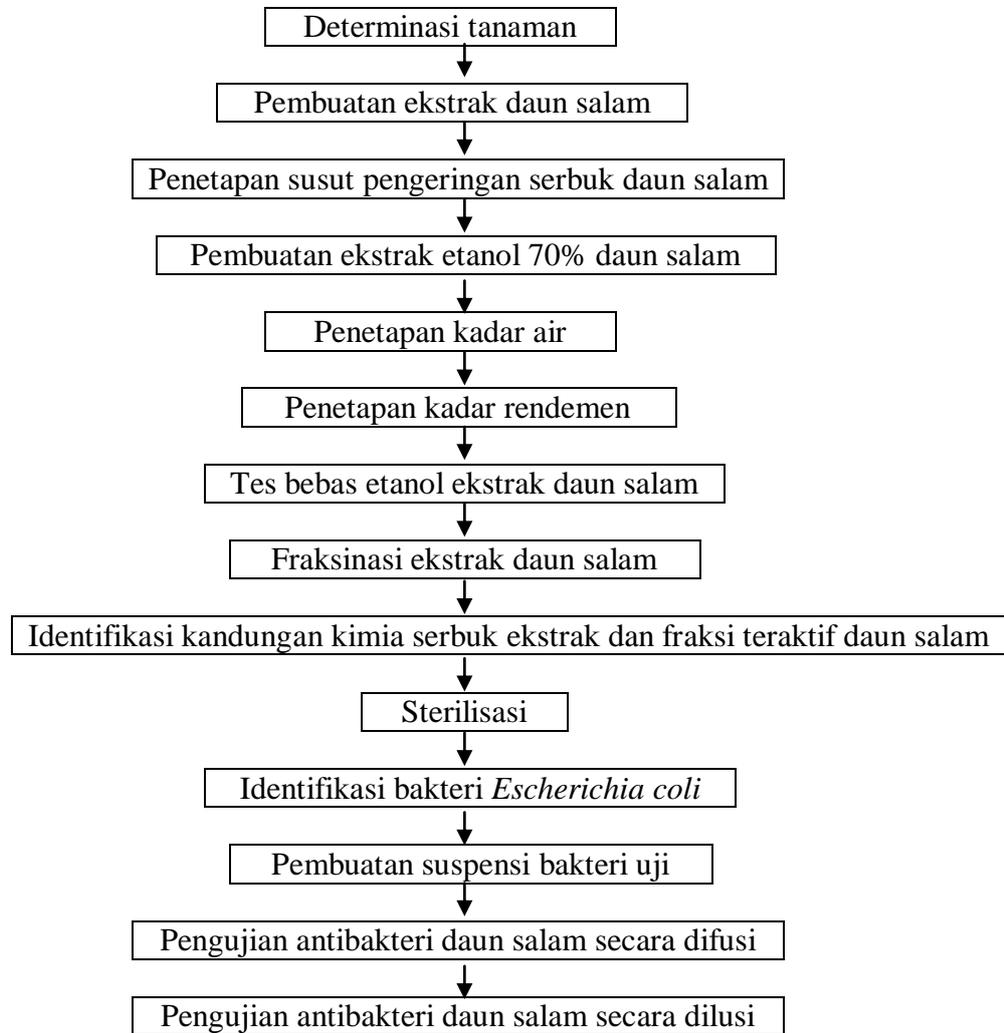
Pembuatan larutan stok fraksi teraktif menggunakan pelarut DMSO 5% karena merupakan pelarut polaritas yang efektif melarutkan berbagai bahan kimia organik maupun anorganik. Masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa

konsentrasi pengenceran yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,5625%; 0,7813%; 0,3906%; 0,1959%; 0,0977%. Medium BHI dimasukkan 0,5 ml ke dalam tabung uji ketiga sampai kesebelas secara aseptis, tabung kedua dan ketiga ditambahkan 0,5 ml fraksi teraktif, dari tabung ketiga diambil 0,5 ml dimasukkan ke dalam tabung keempat dan begitu seterusnya sampai tabung kesebelas, terakhir diambil 0,5 ml lalu dibuang. Suspensi bakteri dalam medium *Brain Heart Infusion* (BHI) dimasukkan ke dalam tabung uji sebanyak 0,5 ml. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam, lalu diamati kekeruhannya untuk menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif untuk masing-masing bakteri uji. Bakteri yang sudah digoreskan pada media selektif diinkubasi pada suhu kamar 37°C. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media EA (Endo Agar) yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh, pengujian dilakukan sebanyak 3 kali.

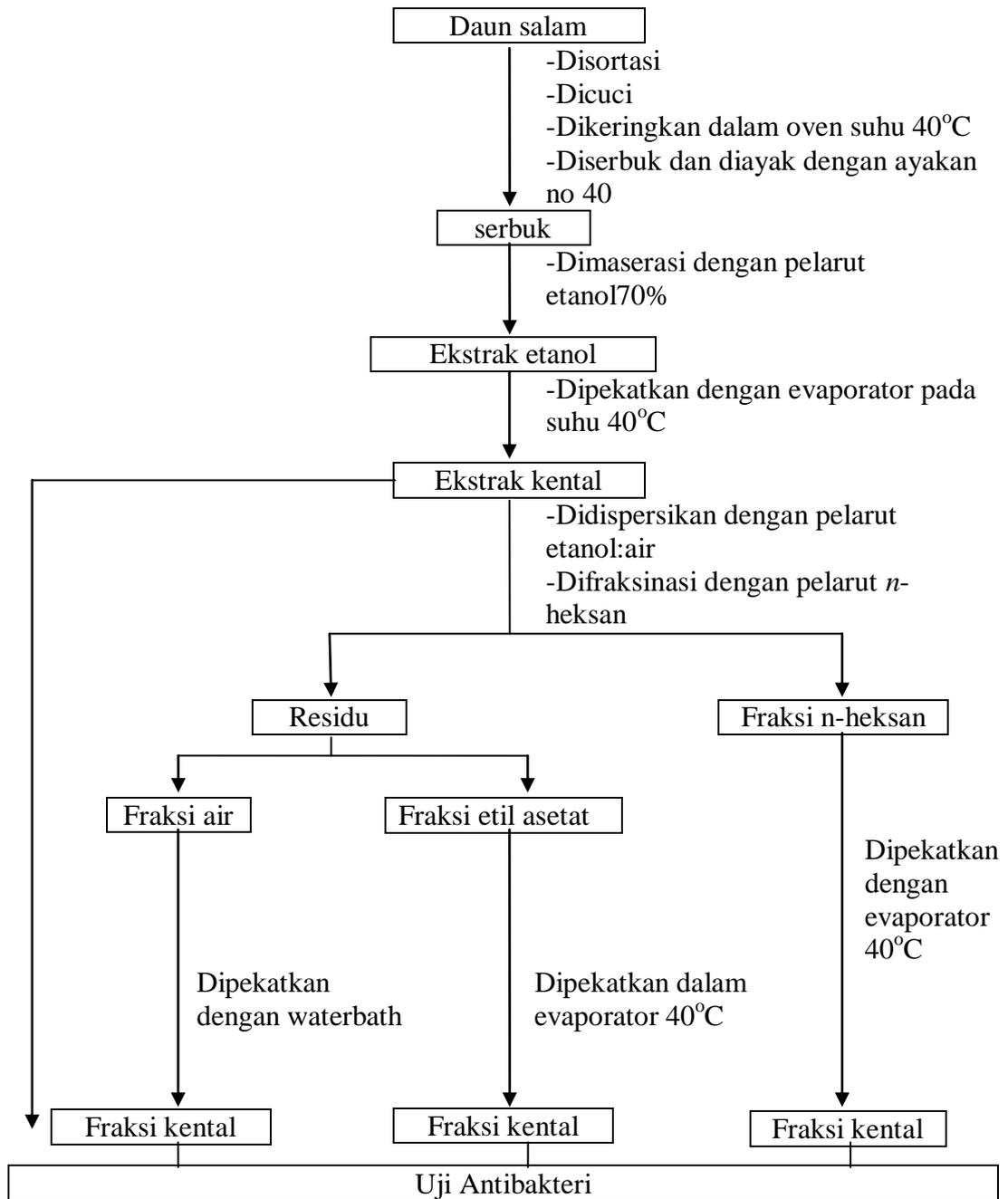
#### **E. Analisis Data**

Hasil uji aktivitas bakteri ekstrak daun salam terhadap *E. coli* menggunakan metode difusi yang dinyatakan dengan nilai zona hambat yang terbentuk. Hasil data yang diperoleh dianalisis menggunakan statistik metode One Way Anova.

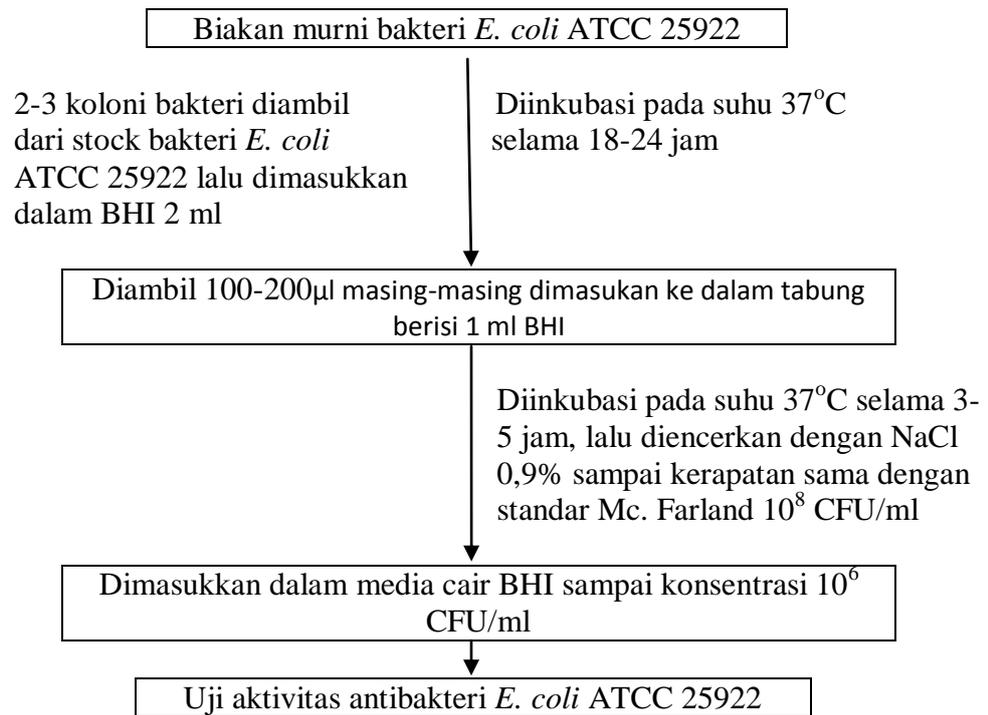
## F. Skema Jalannya Penelitian



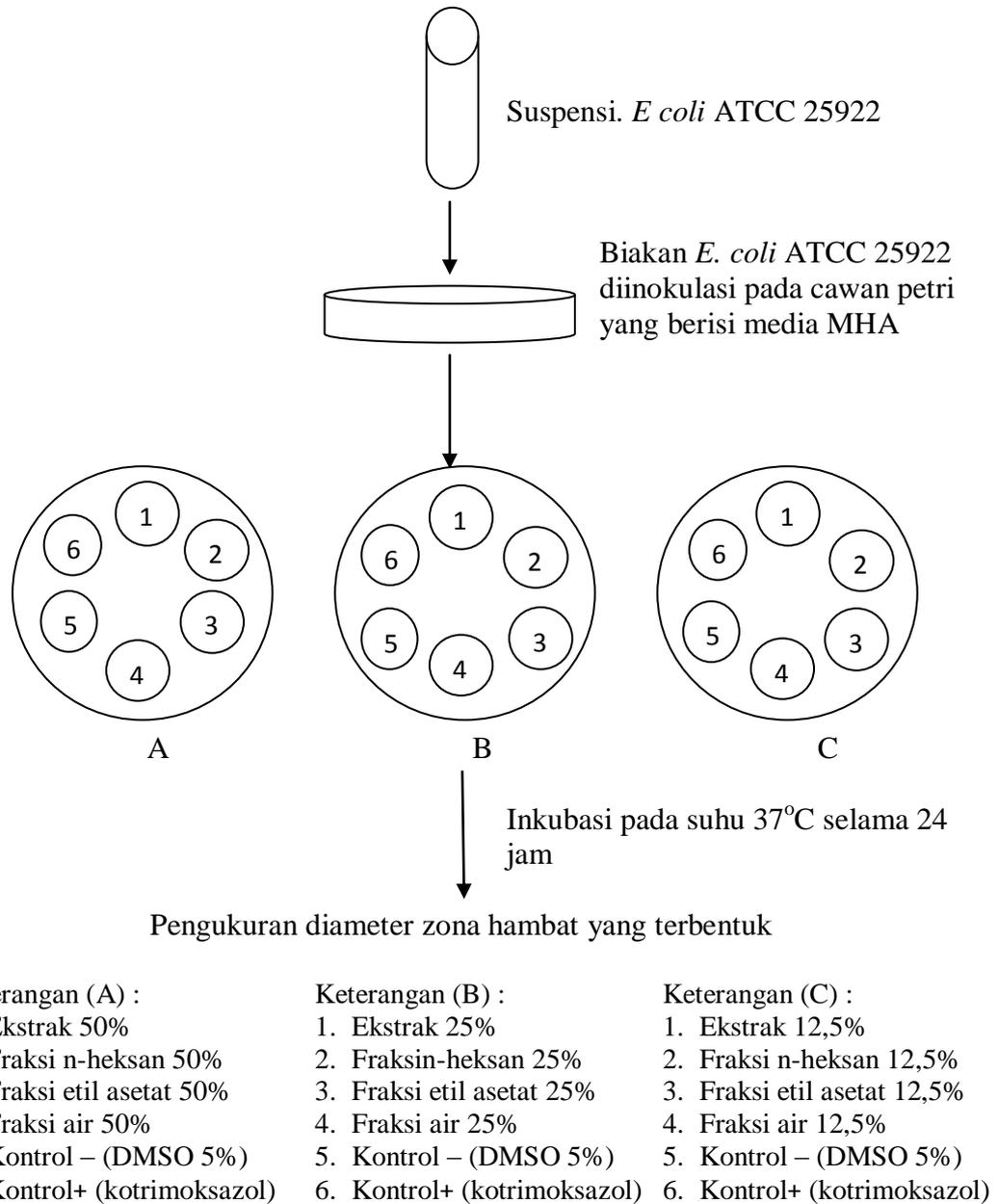
Gambar 3. Skema jalannya penelitian



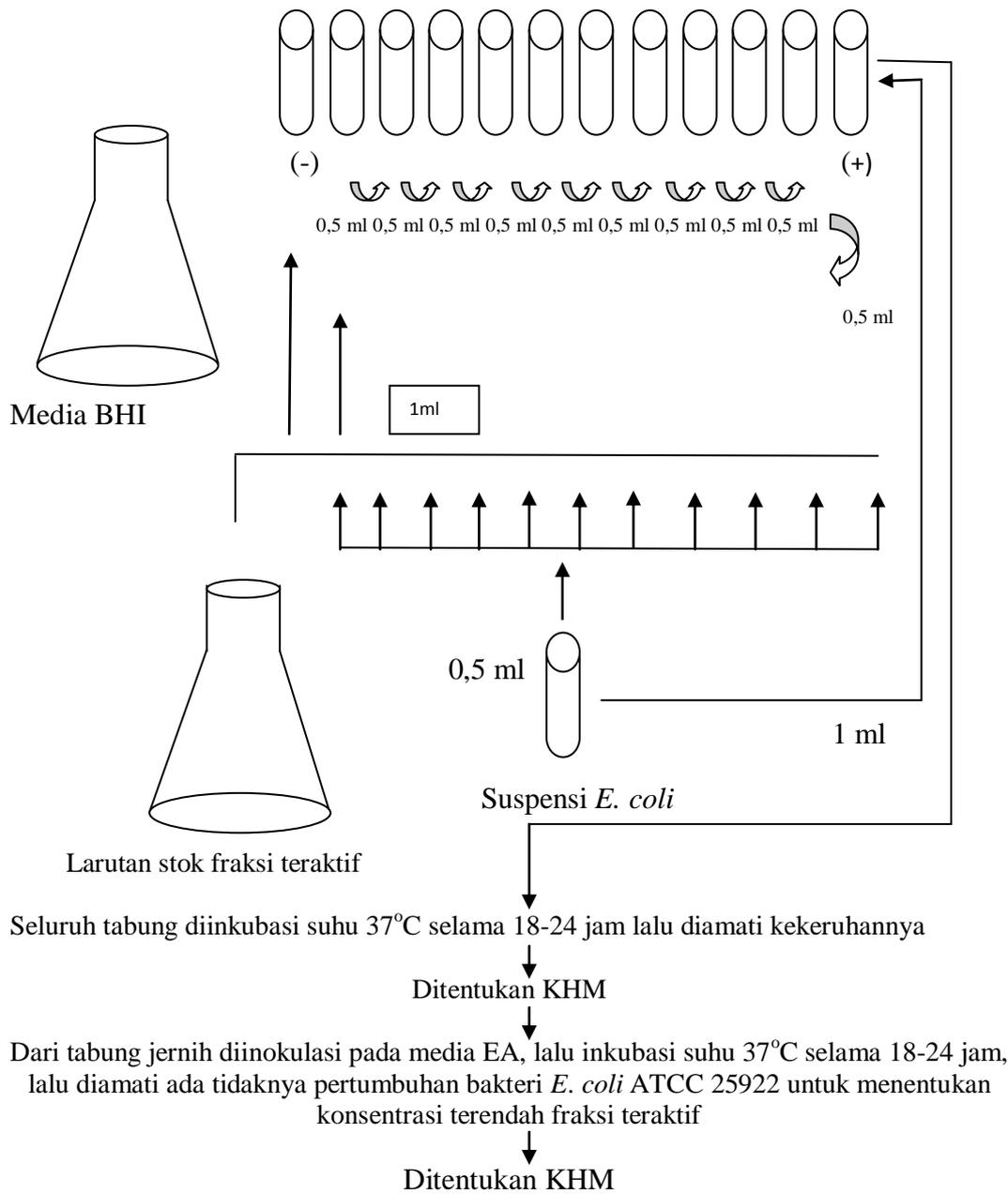
Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun salam



**Gambar 5.**Skema pembuatan suspensi bakteri



**Gambar 6.**Skema kerja uji aktivitas daun salam terhadap *E. coli* ATCC 25922 secara difusi



**Gambar 7.** Skema kerja uji aktivitas fraksi teraktif ekstrak daun salam terhadap *E. coli* ATCC 25922 secara dilusi