

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi merupakan semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tanaman senduduk bulu [*Clidemia hirta* (L.) D. Don] yang diperoleh dari daerah Bumi Makmur, Mesuji Raya, Kabupaten Ogan Komering Ilir, Sumatera Selatan.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan adalah daun senduduk bulu [*Clidemia hirta* (L.) D. Don] dengan spesifikasi daun berwarna hijau yang masih segar, dan terbebas dari hama dan penyakit. Pengambilan sampel diambil di daerah Bumi Makmur, Mesuji Raya, Kabupaten Ogan Komering Ilir, Sumatera Selatan yang diambil pada bulan Januari 2019.

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

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

Variabel utama dari penelitian ini adalah uji aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun senduduk bulu [*Clidemia hirta* (L.) D. Don] terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

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

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

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, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun senduduk bulu.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri

ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun senduduk bulu terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dimedia uji.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922, kondisi lingkungan laboratorium (meliputi kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, waktu panen, pemilihan daun, metode ekstraksi dan metode fraksinasi.

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

Pertama, daun senduduk bulu adalah daun dari tanaman senduduk bulu yang masih segar, sehat dan terbebas dari hama dan penyakit yang tumbuh di daerah Bumi Makmur, Mesuji Raya, Kabupaten Ogan Komering Ilir, Sumatera Selatan yang diambil pada bulan Januari 2019.

Kedua, daun senduduk bulu adalah daun dengan spesifikasi berwarna hijau dan berbulu halus pada permukaan daunnya.

Ketiga, serbuk daun senduduk bulu adalah daun senduduk bulu tua yang sudah dipetik kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, setelah itu daun yang sudah dicuci bersih dikeringkan menggunakan oven pada suhu 45°C, kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Keempat, ekstrak daun senduduk bulu adalah hasil ekstraksi dengan larutan penyari etanol 96% menggunakan metode maserasi. Hasil maserasi kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai bebas etanol.

Kelima, fraksi daun senduduk bulu adalah fraksi dari daun senduduk bulu segar yang dihasilkan dari proses fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air.

Keenam, fraksi *n*-heksana adalah fraksi dari ekstrak etanol daun senduduk bulu yang di fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut nonpolar, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi *n*-heksana.

Ketujuh, fraksi etil asetat adalah fraksinasi dari air residu fraksi *n*-heksana dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapat fraksi etil asetat.

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

Kesembilan, bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kesepuluh, uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi untuk ekstrak etanol dan fraksi daun senduduk bulu, sedangkan metode dilusi untuk fraksi teraktif dari daun senduduk bulu.

Kesebelas, tujuan metode difusi adalah untuk mengukur luas daerah hambatan pertumbuhan bakteri dengan kontrol negatif adalah DMSO 5% dan kontrol positif antibiotik siprofloksasin dan konsentrasi ekstrak dan fraksi yaitu: 20%; 10%; 5%.

Keduabelas, tujuan metode dilusi adalah untuk menentukan nilai KBM dan KHM dengan konsentrasi :20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,312%; 0,156%; 0,078%; 0,039%, dengan kontrol negatif fraksi teraktif dan kontrol positif suspensi bakteri.

## C. Bahan dan Alat

### 1. Alat.

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah bejana maserasi, erlenmeyer, *waterbath*, *rotary evaporator*, *moisture balance*, *Sterling Bidwell*, piknometer, chamber, corong pisah, corong kaca, ayakan no 40, jarum ose, tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, cawan petri steril, kapas lidi steril, *obyek glass*, inkubator, mikropipet, autovortex mixer, gelas ukur, pipet volume, botol vial, autoklaf, oven, pinset, neraca analitik, spidol dan penggaris.

### 2. Bahan.

**2.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan adalah daun senduduk bulu yang diambil pada bagian nomor 2 dari pucuk.

**2.2 Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%, *n*-heksana, etil asetat, air, DMSO 5%, kalium telurit 1%, hidrogen peroksida, pereaksi Lieberman Burchard, larutan mayer, larutan dragendrof, lartan sitroborat, larutan FeCl<sub>3</sub> 1%, asam asetat pekat, asam sulfat pekat, asam klorida pekat dan serbuk magnesium.

**2.3 Bakteri uji.** Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

**2.4 Medium.** Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *nutrient agar* (NA), *Endo Agar* (EA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Vogel Johnson Agar* (VGA), *Muller Hinton Agar* (MHA), KIA, LIA, SIM dan Citrat.

#### **D. Jalannya Penelitian**

##### **1. Determinasi tanaman senduduk bulu.**

Tahapan pertama penelitian adalah melakukan determinasi tanaman untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman senduduk bulu sesuai kepustakaan dan dibuktikan di bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.

##### **2. Pengambilan tanaman senduduk bulu.**

Tanaman senduduk bulu diambil dari daerah Bumi Makmur, Mesuji Raya, Ogan Komering Ilir, Sumatera Selatan. Sampel yang digunakan adalah daun yang diambil pada bagian nomor 2 dari pucuk kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan untuk dilakukan ekstraksi.

##### **3. Pengeringan daun senduduk bulu.**

Pembuatan ekstrak dimulai dengan daun senduduk bulu yang telah dipilih kemudian dicuci dengan air untuk dibersihkan dari kotoran yang menempel. Daun senduduk bulu yang sudah bersih, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C.

##### **4. Pembuatan serbuk simplisia daun senduduk bulu.**

Daun senduduk bulu yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender lalu diayak dengan ayakan nomor 40. Pembuatan serbuk

bertujuan agar luas partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sampai penyarian berlangsung secara selektif.

## **5. Pembuatan ekstrak etanol daun senduduk bulu.**

Ekstraksi serbuk daun senduduk bulu dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Caranya dengan menimbang 1000 gram serbuk kemudian dimasukkan ke dalam bejana lalu di tambahkan etanol 96%. Direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-kali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan cara filtrasi, kemudian pisahkan filtrat dengan ampas menggunakan kain flanel. Proses penyarian dilakukan pengulangan sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Filtrat kemudian dipekatkan menggunakan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 40°C dan diuapkan dengan *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental daun senduduk bulu (Kemenkes RI 2013).

## **6. Karakterisasi serbuk dan ekstrak daun senduduk bulu.**

**6.1 Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak.** Susut pengeringan adalah persentase senyawa yang menghilang selama proses pemanasan (tidak hanya menggambarkan air yang hilang, tetapi juga senyawa menguap lain yang hilang) (Handayani *et al.* 2017). Serbuk dan ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 2 gram pada pan aluminium yang telah disediakan pada alat *moisture balance*, kemudian dilakukan pemanasan sampel pada suhu 105°C dan ditunggu hingga pemanasan selesai, lalu catat hasil yang tertera pada alat *moisture balance* (Setyawati 2018).

**6.2 Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak secara destilasi.** Ekstrak dan serbuk dari suatu tumbuhan mengandung sejumlah air di dalamnya. Untuk mengetahui jumlah air tersebut maka dilakukan penetapan kadar air ekstrak. Kadar air merupakan banyaknya air yang terkandung dalam bahan yang dinyatakan dalam persen. Penentuan kadar air ini menggunakan metode destilasi toluen, dimana prinsip penentuan kadar air dengan destilasi adalah menguapkan air dengan pembawa cairan kimia yang mempunyai titik didih lebih tinggi dari pada air dan tidak dapat dicampur dengan air serta mempunyai berat jenis lebih

rendah dari pada air, salah satu zat kimia yang dapat digunakan adalah toluen (Suharti *et al.* 2017). Disiapkan 150 ml toluen kemudian dijenuhkan dengan 10 ml, lalu dikocok, dibiarkan memisah dan lapisan air dibuang. Ditimbang seksama sejumlah ekstrak daun senduduk bulu dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Dimasukkan toluen jenuh air ke dalam labu alas bulat, dipasang rangkaian alat dan dipanaskan labu selama 15 menit. Setelah semua air tersuling, bilas bagian dalam pendingin dengan toluen jenuh air dan dilanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dibaca volume air dan toluen memisah sempurna dan dihitung kadar air dalam % v/b (Depkes RI 2013).

**6.3 Penentuan bobot jenis ekstrak.** Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak 5% dalam pelarut etanol dengan alat piknometer. Digunakan piknometer kering, bersih dan telah di kalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru di didihkan pada suhu 25°C, kemudian dimasukkan ke dalam piknometer yang telah diisi hingga suhu 25°C (Utami *et al.* 2016).

## **7. Uji bebas etanol.**

Ekstrak yang telah dipekatkan kemudian diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak dilarutkan dengan asam sulfat dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asam asetat dan ditutup dengan kapas, selanjutnya dipanaskan sampai mendidih. Kemudian diidentifikasi bau ester pada kapas, jika ekstrak tidak mengandung etanol maka tidak tercium bau ester (Raymon *et al.* 2016).

## **8. Fraksinasi.**

Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 10 gram ekstrak etanol daun senduduk bulu kemudian disuspensi dengan air sebanyak 75 ml lalu dipartisi dengan *n*-heksana 75 ml dan di replikasi sebanyak tiga kali menggunakan corong pisah. Lapisan *n*-heksana selanjutnya dikumpulkan dan dipekatkan dengan *vaccum rotary evaporator*, filtrat *n*-heksana yang kering ini selanjutnya disebut fraksi *n*-heksana. Lapisan air sisa partisi dengan *n*-heksan kemudian dipartisi lagi dengan 75 ml etil asetat dan di replikasi sebanyak tiga kali. Lapisan etil asetat dipisahkan dan dipekatkan dengan *vaccum rotary evaporator* dan diperoleh fraksi

etil asetat. Lapisan air diuapkan di atas *waterbath* sampai kental, yang kemudian disebut fraksi air. Fraksi yang didapat masing-masing ditimbang untuk mendapat persen rendemen terhadap bobot awal (Sari & Turahman 2018).

## **9. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol daun senduduk bulu.**

Identifikasi kandungan *senyawa* kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam daun senduduk bulu. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa golongan flavonoid, saponin, tanin dan steroid/triterpenoid.

**9.1. Identifikasi flavonoid.** Menimbang sebanyak 1 mg ekstrak dan serbuk kemudian dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50%. Tambah serbuk Mg dan 4-5 tetes HCL pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid (Sukmawati *et al.* 2014).

**9.2. Identifikasi tanin.** Menimbang sebanyak 1 mg serbuk dan ekstrak daun senduduk bulu, kemudian tambahkan dengan 1-2 tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Positif mengandung tanin jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua (Sukmawati *et al.* 2014).

**9.3. Identifikasi saponin.** Menimbang 1 mg ekstrak dan serbuk daun senduduk bulu, kemudian ditambahkan aquadestilata (1:1) sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambah HCl 1 N. Busa yang terbentuk dapat bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm, maka ekstrak dan fraksi daun senduduk bulu positif mengandung saponin (Sukmawati *et al.* 2014).

**9.4. Identifikasi steroid/triterpenoid.** Menimbang 1 mg ekstrak dan serbuk daun senduduk bulu, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform dan ditambah 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran tersebut ditambah 1-2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Hasil positif triterpenoid ditunjukkan adanya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut, sedangkan hasil positif steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan (Sukmawati *et al.* 2014).

## 10. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan suatu proses untuk membebaskan alat dan media dari mikroba yang tidak digunakan. Seluruh alat yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan dan disterilkan dahulu. Alat seperti gelas ukur, tabung reaksi dan erlenmeyer ditutup dengan kapas. Cawan petri dibungkus dengan perkamen semuanya dimasukkan kedalam plastik tahan panas dan seluruh media pembenihan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit dengan tekanan 1,5 Atm. Jarum ose disterilkan dengan nyala api bunsen.

## 11. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 diambil dari biakan murni media *Nutrient Agar* (NA), kemudian masing-masing diambil kurang lebih 2 ose dari koloni yang sama dan ditanam dalam tabung reaksi yang berisi 5 mL media *Brain Heart Infusion* (BHI) lalu didinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Tabung yang sudah diinkubasi tersebut kekeruhannya disesuaikan dengan standar MC Farland 0,5 yang dianggap setara dengan  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL. Tujuan suspensi bakteri supaya jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

## 12. Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**12.1 Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan cawan gores.** Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasi pada media VJA yang telah ditetesi 3 tetes kalium telurit 1% dalam cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan koloni berwarna hitam, karena *Staphylococcus aureus* dapat mereduksi telurit menjadi metalik telurit. Adanya *fenol red* maka medium di sekitar koloni berwarna kuning, hal ini disebabkan karena *Staphylococcus aureus* dapat memfermentasi manitol (Jawetz *et al.* 2007).

**12.2 Identifikasi pewarnaan mikroba.** Dilakukan pewarnaan gram dengan cara membuat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi kemudian ditetesi Kristal Violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, kemudian didiamkan sampai kurang lebih 1 menit. Preparat



dicuci dengan aquadest mengalir lalu tetesi mordant (*lugol, s iodone*/Gram B), didiamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C (alkohol) dan didiamkan kurang lebih selama 30 detik, lalu ditetesi dengan Gram D (safranin) dan didiamkan sebentar. Selanjutnya dicuci dengan aquadest mengalir kemudian preparat dikeringkan dengan kertas tisu yang ditempelkan pada sisi ulasan kemudian didiamkan sampai mengering di udara dan selanjutnya diamati dengan mikroskop (Volk & Wheller 1988). Didapatkan Gram positif pada *Staphylococcus aureus* bila sel bakteri terbentuk coccus atau bulat, susunan bergerombol seperti anggur yang berwarna ungu.

**12.3 Uji katalase.** Pengujian dilakukan dengan menggunakan bakteri yang ditanam pada medium nutrient agar cair dengan penambahan 2 tetes hydrogen peroksida 3%. Pengujian ini menggunakan  $2\text{H}_2\text{O}_2$  3% yang merupakan salah satu hasil respirasi aerobik bakteri, dimana hasil respirasi tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri karena bersifat toksik bagi bakteri itu sendiri sehingga komponen ini dipecah agar tidak bersifat toksik lagi. Saat respirasi salah satu komponen yang dihasilkan adalah  $2\text{H}_2\text{O}_2$ . Hasil dinyatakan positif bila terbentuk pembentukan gelembung udara disekitar koloni, timbulnya gelembung menandakan bahwa *Staphylococcus aureus* memiliki enzim katalase yang dapat memecah  $2\text{H}_2\text{O}_2$  menjadi  $\text{H}_2$  dan  $\text{O}_2$  (Jawetz *et al.* 2001).

**12.4 Uji koagulase.** Pengujian dilakukan menggunakan plasma darah manusia atau kelinci dan diberi asam sitrat yang telah diencerkan (1:5) ditambah dengan 1 ose biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ , lalu diamati adanya gumpalan setelah 4 jam atau lebih. Hasil positif ditunjukkan jika tabung uji dibalik gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung (Jawetz *et al.* 2001).

### **13. Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922.**

**13.1 Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 secara makroskopis.** *Escherichia coli* diinokulasikan pada media selektif *endo agar* (EA) dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Koloni yang dihasilkan berwarna merah dengan kilat logam permanen, warna koloni merah disebabkan karena *Escherichia*

*coli* dan koliform memetabolisme laktosa menjadi aldehid dan asam sehingga aldehid bereaksi dengan fuchsin. Aldehid akan melepaskan fuchsin dari senyawa fuchsin-sulfat kemudian akan mewarnai koloni merah dan akan terlihat berwarna seperti kilatan logam (Kartika *et al.* 2014).

**13.2 Identifikasi pewarnaan mikroba.** Dilakukan pewarnaan gram dengan cara membuat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi kemudian ditetesi Kristal Violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, kemudian didiamkan sampai kurang lebih 1 menit. Preparat dicuci dengan aquadest mengalir lalu tetesi mordant (*lugol, s iodone*/Gram B), didiamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C (alkohol) dan didiamkan kurang lebih selama 30 detik, lalu ditetesi dengan Gram D (safranin) dan didiamkan sebentar. Selanjutnya dicuci dengan aquadest mengalir kemudian preparat dikeringkan dengan kertas tisu yang ditempelkan pada sisi ulasan kemudian didiamkan sampai mengering di udara dan selanjutnya diamati dengan mikroskop (Volk & Wheller 1988). Didapatkan gram negatif pada *Escherichia coli* bila sel bakteri berbentuk batang lurus dengan warna bakteri ialah merah.

**13.3 Identifikasi fisiologis biokimia.** Pertama, Media *Kliger Iron Agar* (KIA) digunakan untuk Identifikasi dengan cara bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tujuan dari identifikasi ini adalah untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Hasilnya adalah media berwarna kuning (ditulis A), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), sulfida negatif yaitu tidak terbentuk warna hitam pada media (ditulis S<sup>-</sup>). Hasil positif dapat ditulis A/AG S<sup>-</sup>.

Kedua, Media *Lysin Iron Agar* (LIA) digunakan untuk identifikasi dengan cara biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasilnya ialah media bagian atas berwarna ungu (ditulis K), dasar berwarna ungu (ditulis K), dan sulfida negatif yaitu tidak terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S<sup>-</sup>). Hasil dapat di tulis K/K S<sup>-</sup>.

Ketiga, Media *Sulfida Indol Motility* (SIM) digunakan untuk identifikasi dengan cara biakan bakteri *Escherichia coli* diinokulasi pada media dengan cara tusukan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji sulfida negatif ialah tidak terdapat warna hitam pada media, uji indol positif ialah terbentuk warna merah pada media atas setelah ditambahkan dengan reagent Erlich, uji motilitas positif ditunjukkan adanya pertumbuhan bakteri yang menyebar dimedia, sehingga hasil ditulis (-) (+) (+).

Keempat, Media Citrat digunakan untuk identifikasi dengan cara biakan murni bakteri diinokulasi dengan cara digoreskan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Hasil uji positif bila media berwarna biru (Jawetz *et al.* 1986).

#### **14. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi dan dilusi.**

Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun senduduk bulu dibuat masing-masing konsentrasi, kemudian diuji secara mikrobiologi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

**14.1 Uji aktivitas antibakteri secara difusi.** Metode difusi yang digunakan adalah metode difusi cakram (Disc). Metode ini menggunakan suatu cakram kertas saring (paper disc) yang berfungsi tempat menampung zat antimikroba. Zat antimikroba yang akan diuji dibuat masing-masing konsentrasi ekstrak dan fraksi yaitu 20%; 10%; 5%; serta kontrol positif (siprofloksasin) dan kontrol negatif (DMSO). Kertas cakram tersebut kemudian diletakkan pada cawan petri yang telah terisi media MHA dan sudah diinokulasi bakteri uji, replikasi dilakukan sebanyak tiga kali. Lalu cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, kemudian lakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram menandakan bahwa kandungan kimia daun senduduk bulu memiliki daya hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Fraksi teraktif yang didapat kemudian diuji dengan metode dilusi.

**14.2 Uji aktivitas antibakteri secara dilusi.** Metode dilusi dilakukan dengan menggunakan 1 deretan tabung reaksi yang terdiri dari 12 tabung steril, 2 tabung steril digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif, dan 10 tabung reaksi steril digunakan sebagai seri pengenceran. Pada setiap tabung tersebut mempunyai konsentrasi yang berbeda-beda yaitu 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625; 0,312%; 0,156%; 0,078%; 0,039%. Suspensi bakteri dalam medium BHI dimasukkan kedalam masing-masing tabung reaksi uji secara aseptis kecuali tabung pertama (kontrol negatif). Kontrol negatif berisi 1 mL bahan uji dan kontrol positif berisi 1 mL suspensi bakteri uji. Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diamati kekeruhannya. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah dari ekstrak dan fraksi teraktif tidak ada koloni bakteri yang tumbuh pada media VJA untuk *S.aureus* dan media EA untuk *E.coli*. KHM ditunjukkan dengan cara menentukan konsentrasi terendah larutan uji dari tabung yang jernih. Tabung yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Selanjutnya diamati ada atau tidaknya koloni pada media selektif.

## **15. Identifikasi golongan senyawa pada fraksi teraktif secara Kromatografi**

### **Lapis Tipis (KLT).**

Fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun senduduk bulu dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, totolkan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari sisi bawah lempeng KLT. Lapsi chamber dengan kertas saring. Chamber dijenuhkan dengan fase gerak yang sesuai, ditandai dengan kertas saring terbatas semuanya. Setelah totolan kering, lempeng KLT dimasukkan ke dalam chamber yang sudah dijenuhkan, elusi dilakukan sampai jarak tertentu. Lempeng KLT diangkat dan di angin-anginkan hingga kering, kemudian deteksi noda di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm serta pereaksi tertentu. Bercak yang terdeteksi kemudian ditentukan nilai Rfnya dan penampakan warnanya.

**15.1 Identifikasi tanin.** Identifikasi adanya senyawa tanin dilakukan dengan KLT, fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase geraknya menggunakan *n*-Heksana : etil asetat (6:4). Pereaksi semprot yang digunakan FeCl<sub>3</sub> 1% dan baku pembanding yang digunakan adalah asam galat. Reaksi positif ditunjukkan

dengan terbentuknya noda berwarna hitam pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm (Kusumo *et al.* 2017).

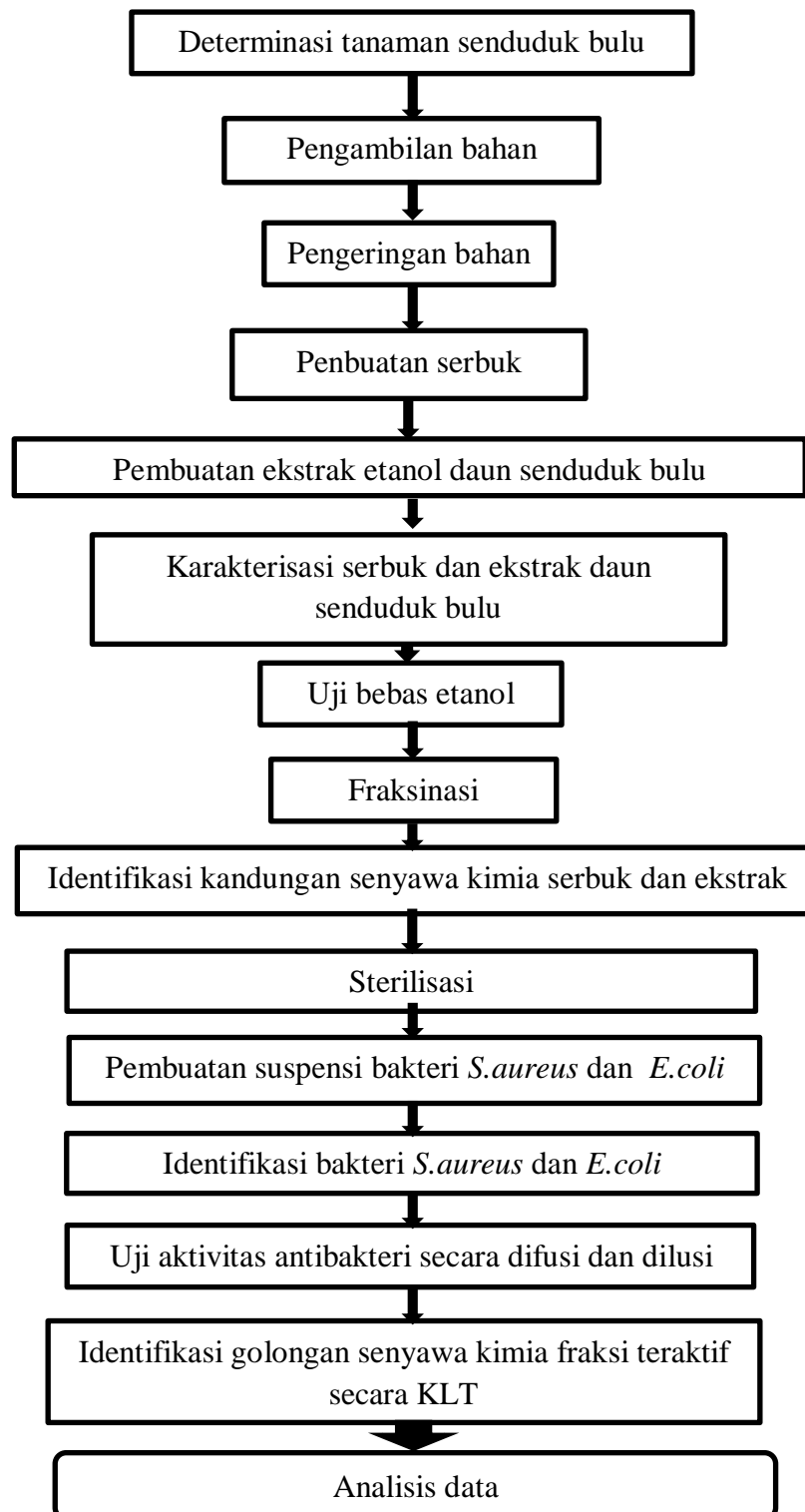
**15.2 Identifikasi flavonoid.** Identifikasi ini menggunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak yang digunakan butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5) dengan penampak noda uap amoniak. Pada sinar UV 254 nm memberi peredaman, UV 366 nm terbentuk fluoresensi dan terdapat noda hijau muda, merah muda atau hijau. Terjadi perubahan warna hijau setelah diuapi amoniak, dengan baku pembanding yang digunakan rutin dan kuersetim (Koirewoa *et al.* 2012).

**15.3 Identifikasi steroid.** Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF<sub>254</sub> dengan fase gerak yang digunakan kloroform : metanol (9:1) dengan penyemprot Lieberman Burchard disertai pemanasan pada suhu 105°C selama 5 menit serta baku pembanding yang digunakan Stigmaterol. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya noda berwarna hijau atau biru (Yuda *et al.* 2017).

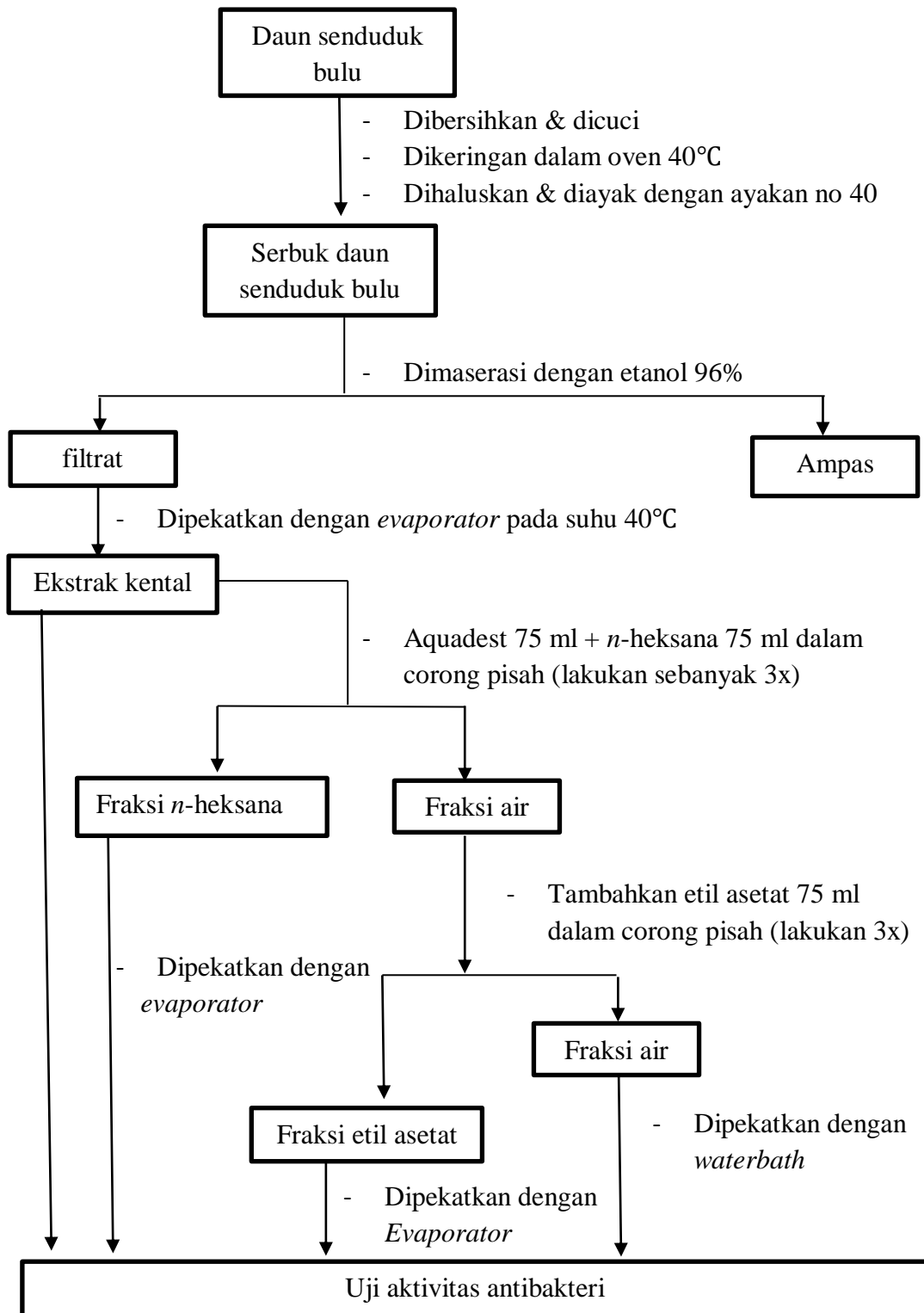
#### **E. Analisis Data**

Data yang diperoleh dari metode pengujian aktivitas antibakteri berupa nilai besarnya zona hambat atau zona bening dari konsentrasi ekstrak dan fraksi teraktif dari daun senduduk bulu dalam satuan milimeter. Nilai zona hambat dan zona bening yang dihasilkan dari kontrol positif dan perlakuan pada bakteri yang sama. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *two way* ANOVA dan dilanjutkan uji Tukey.

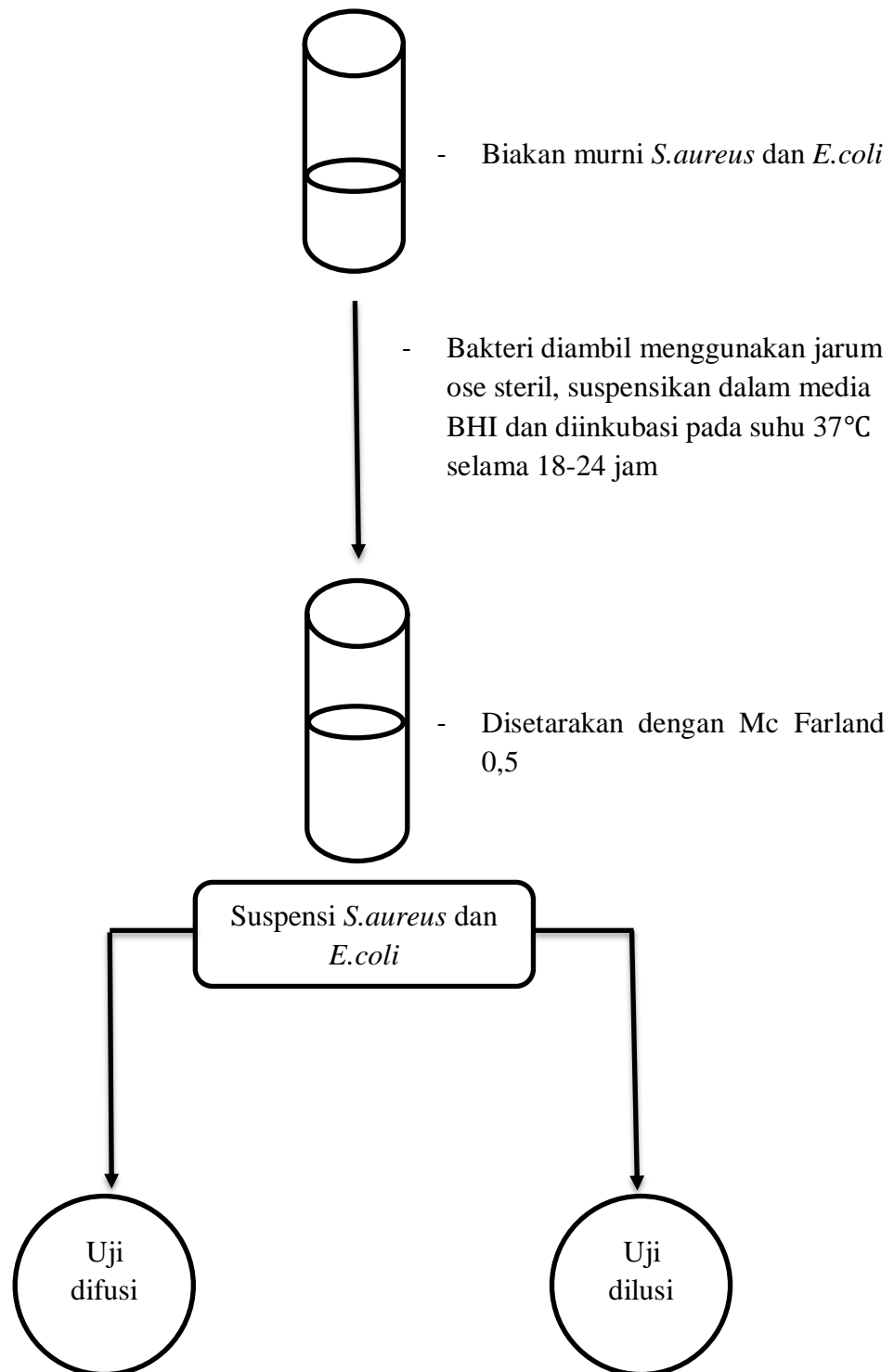
### F. Skema Jalanya Penelitian



Gambar 2. Skema jalanya penelitian secara menyeluruh.

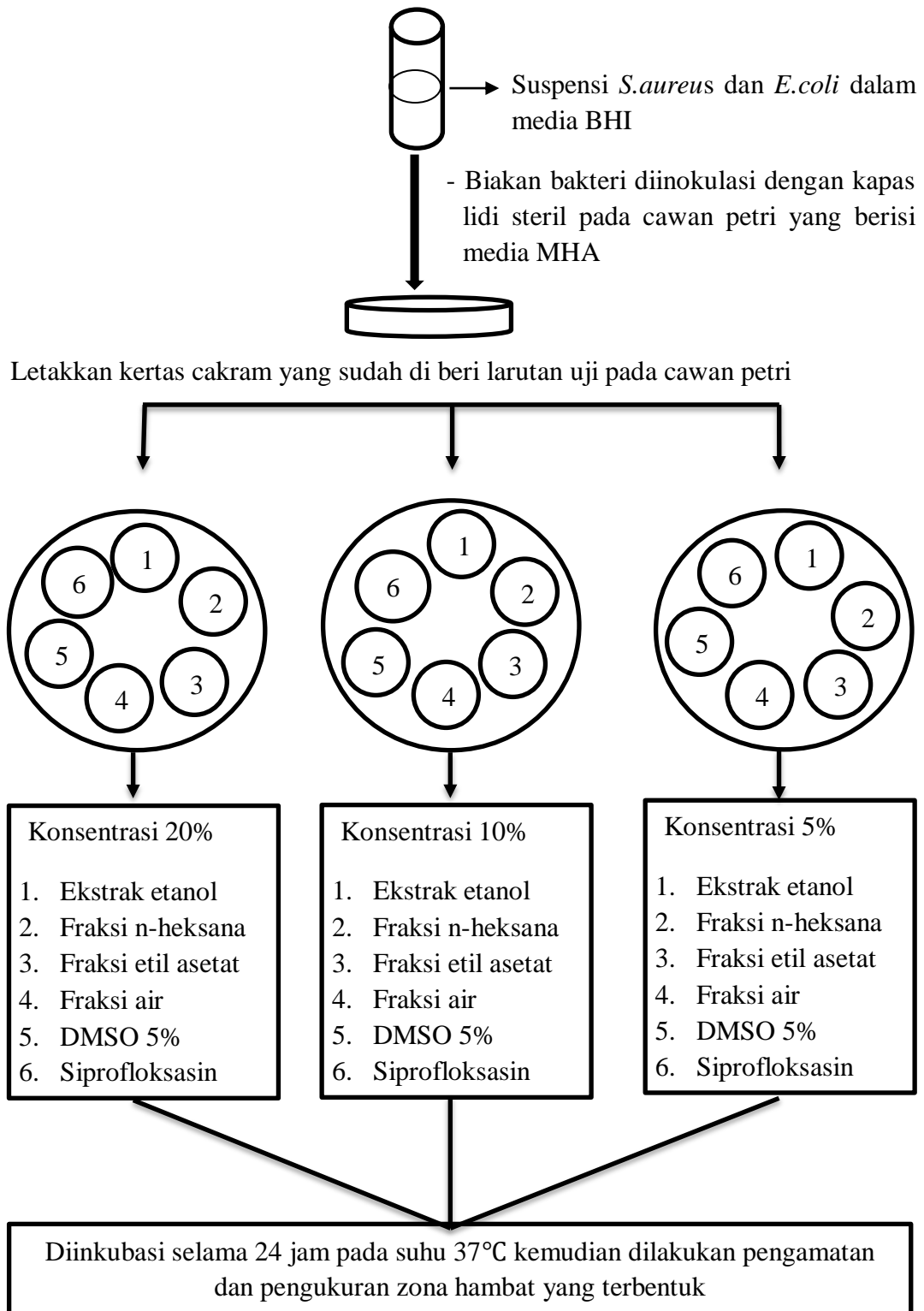


Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak dan fraksi daun senduduk bulu [*Clidemia hirta* (L.) D. Don]

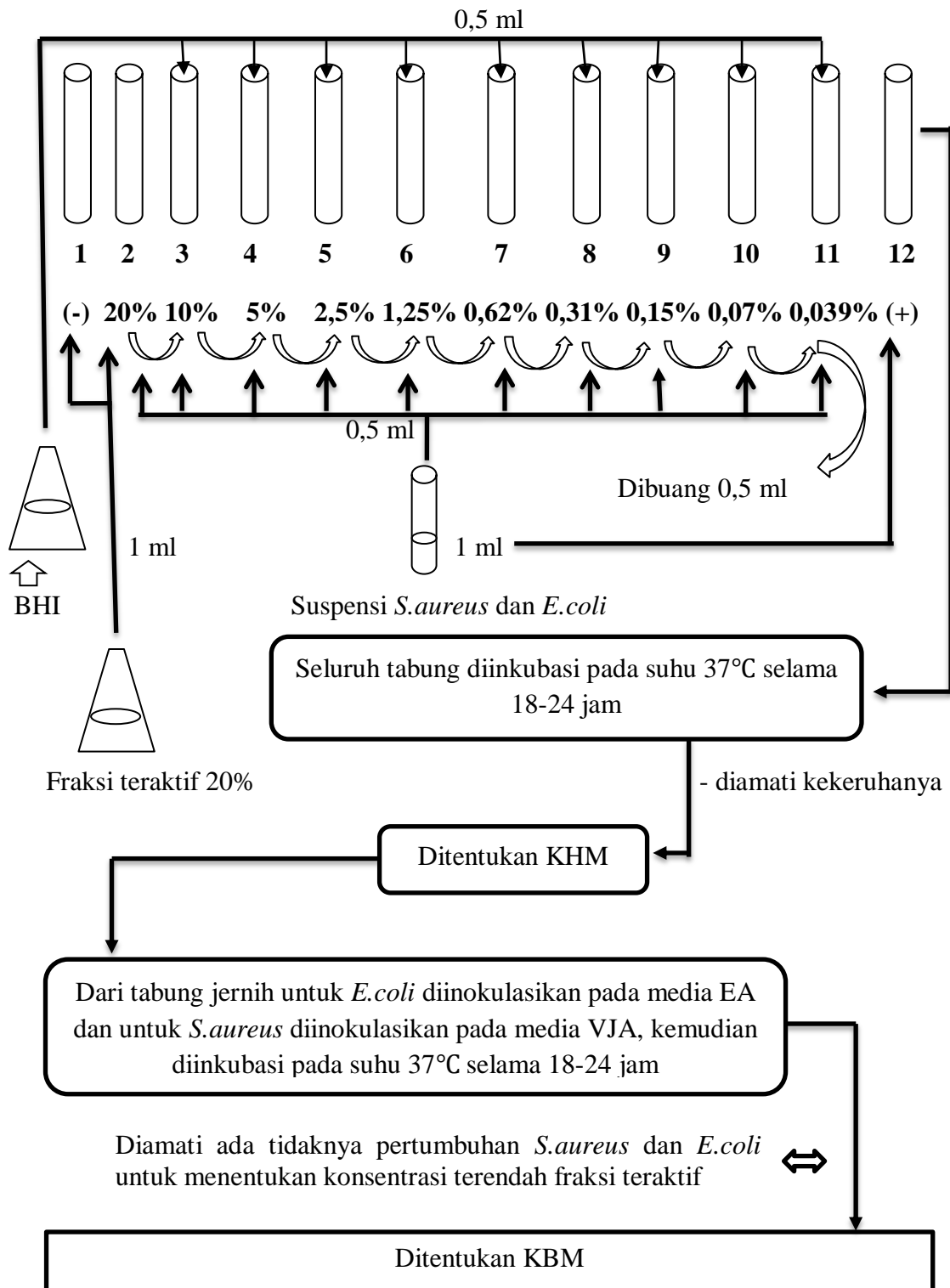


Gambar 4. Skema pembuatan suspensi bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.





Gambar 5. Skema pengujian antibakteri dengan metode difusi terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.



Gambar 6. Skema pengujian antibakteri dengan metode dilusi terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.