

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

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

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) yang didapat dari daerah Ngawi pada bulan Januari 2019.

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

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tanaman sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) yang diambil dengan memilih daun yang bagus, berwarna hijau kemerahan, segar dan tidak terkena hama dari daerah Ngawi. Determinasi tanaman sirih merah dilakukan di Laboratorium B2P2TOOT Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah.

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

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

Variabel utama adalah infusa yang diperoleh dari daun tanaman sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) dengan pelarut aquadest.

Variabel utama yang kedua adalah efek antibakteri dari infusa tanaman sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* . Efek antibakteri dilihat dengan mengamati adanya kekeruhan pada seri pengenceran.

## 2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel terkendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat.

**Variabel bebas** dalam penelitian ini adalah infusa daun sirih merah dengan konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,5626%; 0,7812%.

**Variabel terkendali** dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa*, kondisi laboratorium (meliputi : kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian.

**Variabel tergantung** dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* setelah perlakuan dengan infusa daun sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) di media uji.

## 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sirih merah yang muda dan segar berwarna hijau kemerahan yang ditanam di daerah Ngawi dipetik secara acak, lalu dicuci bersih dimaksudkan agar kotoran yang menempel dapat hilang,

Kedua, Setelah itu daun sirih merah ditimbang untuk mengetahui berat keseluruhan.

Ketiga, daun sirih merah kemudian di rajang sesuai ukuran yang di inginkan.

Keempat, rajangan dari daun sirih merah sebanyak yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir yang dimaksudkan agar kotoran yang menempel dapat hilang, dimasukkan dalam panci infus kemudian ditambahkan pelarut aquadest 500 ml.

Kelima, bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* dalam bakteri uji yang diambil satu ose dari biakan murni kemudian distandarkan dengan Mc. Farlan 0,5 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Keenam, uji aktivitas antibakteri adalah uji untuk mengetahui pertumbuhan bakteri yang menggunakan metode dilusi dengan membuat seri pengenceran dengan konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,5626%; 0,7812% terhadap *Brain Heart Infusion* dan *Pseudomonas aeruginosa*, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Ketujuh, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan tabung yang sedikit keruh.

Kedelapan, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terkecil yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri setelah diinokulasi pada media *Natrium Agar*.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi sumuran dengan melihat diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dalam media uji.

## **C. Bahan dan Alat**

### **1. Bahan**

Bahan sampel yang digunakan adalah daun sirih merah yang diperoleh dari daerah Ngawi, Jawa Timur. Bakteri uji yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium, *Brain Heart Infusion* (BHI), *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA), *Natrium Agar*, Mc. Farland 0,5. Larutan untuk uji kandungan kimia pada tumbuhan asam klorida, pereaksi bouchardat LP, pereaksi mayer, serbuk mg, larutan alkohol, pelarut amil alcohol, besi (III) klorida, dan sudan III. Pelarut yang di gunakan adalah aquadest.

### **2. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat timbang analisa yang mempunyai ketelitian baca minimum 0,1 mg dan daya muat maksimal 100 g, panci infus, flakon, tabung reaksi, gelas ukur, alas bulat, pinset, inkubator, corong kaca, penangas air, pembakar spirtus, inkas, autoklaf, oven, mikroskop, dan *object glass*. Cawan Petri, Jarum ose, Beker glass 1000ml, Beker glass, Kapas, Inkubator, Hot plate dan stirrer, Mikropipet 100µl, Mikropipet 1000µl, Erlenmeyer 1000 ml.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Identifikasi tanaman**

Tahap pertama penelitian ini adalah melakukan identifikasi tanaman daun sirih merah yang bertujuan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan

bahan, serta menghindari kemungkinan tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Tanaman daun sirih merah diidentifikasi di Laboratorium Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.

## **2. Pembuatan infusa daun sirih merah**

Pembuatan infusa daun sirih merah yaitu 100 gram daun sirih merah dimasukkan ke dalam panci infus kemudian ditambahkan aquadest 500 ml lalu dipanaskan di atas penangas air pada suhu 90°C selama 15 menit sambil sesekali diaduk. Infus diserkai selagi panas melalui kain flannel kemudian dipekatkan di atas penangas air hingga mencapai volume 100 ml. Skema pembuatan infusa daun sirih merah dapat dilihat di Gambar 1.

## **3. Identifikasi infusa daun sirih merah**

Identifikasi infusa daun sirih merah secara organoleptis diamati bentuk, warna, dan bau.

## **4. Identifikasi kandungan kimia infusa daun sirih merah**

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk mengetahui kandungan kimia yang terkandung dalam infusa daun sirih merah. Identifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, dan tanin dibuktikan di Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.

**4.1 Identifikasi Alkaloid.** Infusa ditambah dengan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit kemudian didinginkan dan disaring. Pindahkan 3 tetes filtrat pada kaca arloji kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat LP dan pereaksi Mayer LP. Jika dengan Bouchardat LP terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam dengan Mayer LP terbentuk

endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam methanol pekat, maka ada kemungkinan terdapat alkaloid (Depkes RI, 1977).

**4.2 Identifikasi Flavonoid.** Infusa ditambah air panas kemudian dididihkan selama 15 menit dan disaring untuk serbuk, tambahkan serbuk Mg, larutan alcohol: asam klorida (1:1) dan pelarut amil alcohol. Campur dan kocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah, reaksi positif ditunjukkan adanya warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alcohol (Depkes RI, 1989).

**4.3 Identifikasi Tanin.** Infusa ditambah 50 ml air panas kemudian dididihkan selama 15 menit dan saring. Hasil yang diperoleh sebanyak 5 ml ditambahkan 3 tetes besi (III) klorida. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman (Depkes RI, 1989).

**4.4 Identifikasi Saponin.** Sebanyak 10 ml air panas dalam tabung reaksi didinginkan kemudian ditambahkan 0,5 gram ekstrak simplisia dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 - 10 cm. Penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Depkes RI 1977).

## **5. Sterilisasi**

Media agar yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat dari gelas disterilkan dengan oven pada suhu 170°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. Sterilisasi inkas menggunakan formalin (Suriawiria, 1985).

## 6. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* dalam biakan murni diambil 1 ose steril kemudian dimasukkan secara aseptis kedalam tabung reaksi steril yang sudah berisi 5 ml BHI (*Brain Heart Infusion*) yang distandarkan dengan Mc. Farland 0,5 yaitu setara dengan  $10^8$  CFU/ml, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:1000, selanjutnya digunakan uji aktivitas.

## 7. Identifikasi suspensi bakteri uji dengan cara makroskopis.

Suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diinokulasi pada media *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni yang dihasilkan berwarna hijau dan berfluoresensi (Volk dan Wheller, 1988).

## 8. Uji Biokimia

**8.1 SIM (*Sulfide Indol Motilitas*).** Biakan murni bakteri diinokulasi pada permukaan media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji adanya sulfida indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif bila berwarna hitam. Uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah reagen Ehrlich. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media.

**8.2 KIA (*Kliger Iron Agar*).** Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, terdapatnya

gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada bagian lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas yang ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+).

**8.3 LIA (*Lysin Iron Agar*).** Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi lisin dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna coklat (ditulis R). Berwarna ungu yang berarti suasanaanya basa (ditulis K), berwarna kuning yang berarti suasanaanya asam (ditulis A) disertai terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+).

**8.4 Sitrat.** Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Uji ini positif bila media berwarna biru.

## **9. Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram.**

Suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diambil dari media biakan menggunakan jarum ose yang telah dipijarkan, lalu diratakan diatas *object glass*. Larutan zat warna kristal violet diteteskan sebanyak 2 sampai 3 tetes dan didiamkan selama 3 menit. Preparat diberikan akuades mengalir dan dikeringkan. Larutan lugol diteteskan dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Larutan alkohol diberikan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air

mengalir dan dikeringkan. Larutan safranin diberikan selama 3 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Minyak imersi diberikan diatas kaca preparat bakteri. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x100 kali. Bakteri positif golongan *Pseudomonas aeruginosa* bila sel bakteri berwarna merah.

#### **10. Pengujian antibakteri**

Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode dilusi atau seri pengenceran menggunakan 1 deretan tabung reaksi yang terdiri atas 10 tabung. Konsentrasi infusa teraktif adalah 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,5626%; 0,7812%; kontrol (-) dan kontrol (+) *Brain Heart Infusion* (BHI) yang digunakan dimasukkan pada tiap tabung sebanyak 0,5 ml.

Kedua, pengisian infusa daun sirih merah, tabung 1 hanya diisi larutan infusa teraktif sebanyak 1 ml + BHI. Tabung 2 dan tabung 3 diisi juga 1 ml infusa daun sirih merah dan ditambah dengan BHI, sebanyak 1 ml dari tabung 3 dimasukkan dalam tabung 4, dihomogenkan. Perlakuan yang sama juga dikerjakan untuk masing-masing tabung berikutnya sampai dengan tabung 9, kemudian 1 ml dari tabung 9 dibuang. Suspensi bakteri 1 ml yang telah disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 *Pseudomonas aeruginosa* yang telah di encerkan 1:1000 ditambah pada semua tabung kecuali tabung 1, tabung 1 sebagai kontrol negatif yang berisi larutan infusa teraktif, sedangkan tabung 10 sebagai kontrol positif biakan sebanyak 1 ml + BHI.

Ketiga, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan mengamati adanya kekeruhan pada seri pengenceran dari sejumlah tabung yang

telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, tabung dengan larutan jernih setelah tabung keruh terakhir merupakan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

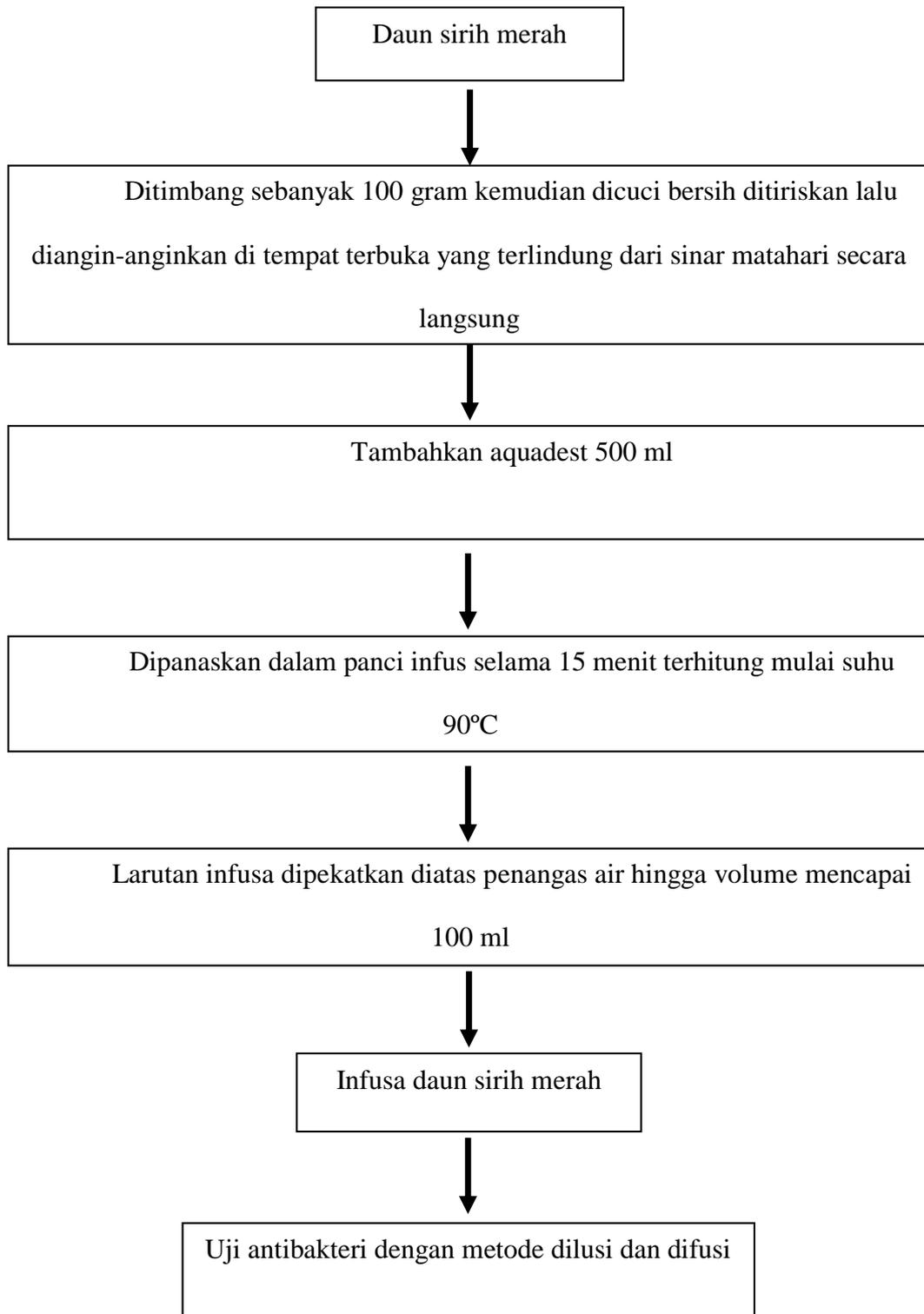
Keempat, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan menggosokkan larutan dari sejumlah tabung yang hasilnya jernih pada medium Natrium Agar kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dan diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri, maka merupakan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

Kelima, uji aktivitas antibakteri dengan metode sumuran untuk mengetahui adanya daya hambat dari infusa daun sirih merah dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, kontrol (-), kontrol (+). Penelitian ini menggunakan cawan petri yang berisi NA.

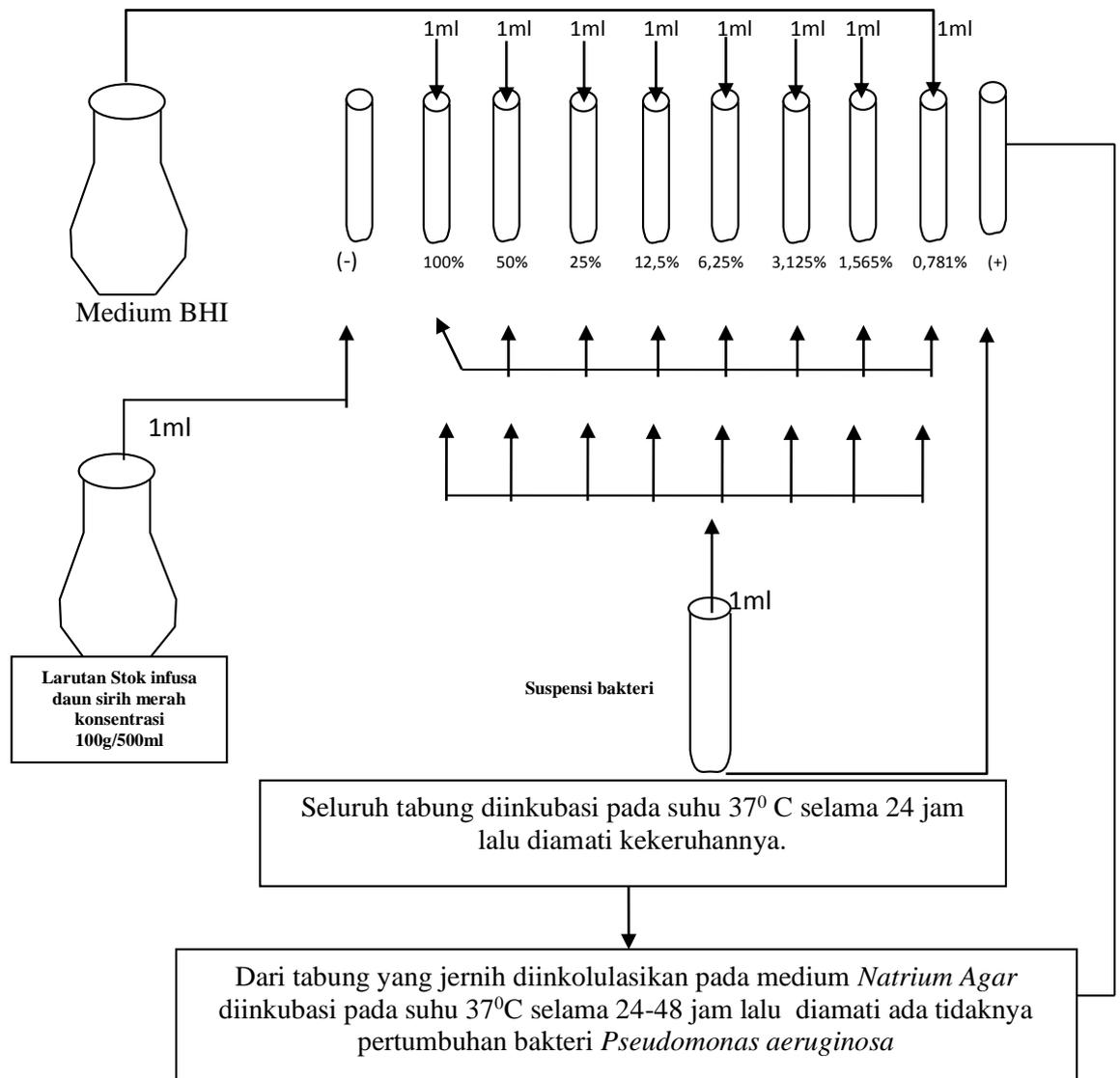
Keenam, bakteri diambil dari media BHI dengan menggunakan kapas lidi steril sebanyak satu kali kemudian dioleskan pada cawan petri yang berisi NA tersebut dan tunggu sampai bakteri berdifusi pada media.

Ketujuh, dibuat lubang sumuran pada cawan yang berisi media NA dengan membuat 5 lubang sumuran, kemudian pada setiap lubang sumuran ditetesi dengan masing-masing konsentrasi dan kontrol (-), kontrol (+). Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

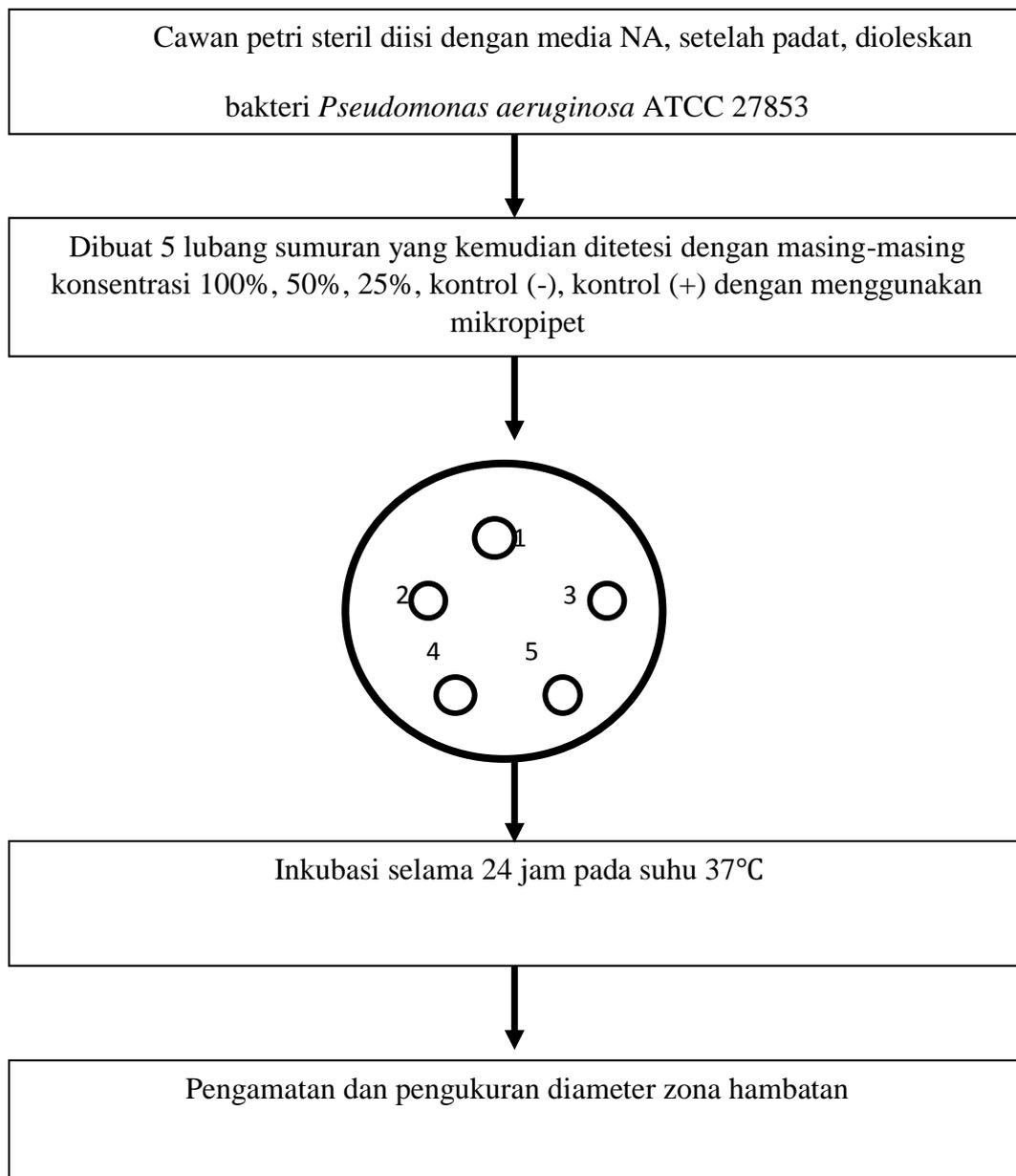
Kedelapan, diamati zona hambat yang terbentuk kemudian diukur dengan menggunakan penggaris, hasil dari pengukuran tersebut dijumlahkan dan dibagi dengan banyaknya pengukuran untuk mendapatkan besarnya zona hambat yang terbentuk.



**Gambar 1.** Skema Pembuatan infusa daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav)



Gambar 2. Skema pengujian aktivitas antibakteri infusa daun sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode dilusi



**Gambar 3.** Skema pengujian aktivitas antibakteri infusa daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode difusi