

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirsak dan daun alpukat yang diperoleh di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak dan daun alpukat. Daun sirsak dan daun alpukat yang diambil adalah bagian daunnya berwarna hijau tua, dipilih yang segar dan tidak layu. Daun sirsak dan daun alpukat diambil pada bulan Desember saat pohon belum berbuah.

B. Variel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah kandungan senyawa metabolik sekunder seperti flavonoid, alkaloid dan tannin pada daun sirsak dan daun alpukat serta kombinasinya.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri senyawa metabolik sekunder dari daun sirsak dan daun alpukat serta kombinasinya 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 terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini daun sirsak, daun alpukat dan kombinasi keduanya dengan perbandingan (1:1, 1:3, 3:1).

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311, sterilisasi, suhu, kondisi peneliti, kondisi laboratorium, media dan metode penelitian.

Variabel terikat dari penelitian ini adalah aktivitas antibakteri daun sirih dan daun alpukat serta kombinasi keduanya dengan dilihat diameter zona hambat.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sirih (*Annona muricata* L.) yang diambil secara acak di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah, dengan ciri-ciri populasi dan sampel warna daun hijau tua, tidak terlalu tua atau tidak terlalu muda, segar dan bebas penyakit.

Kedua, daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang diambil secara acak di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah, dengan ciri-ciri populasi dan sampel warna daun hijau tua, tidak terlalu muda, segar dan bebas penyakit.

Ketiga, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *Salmonella typhi* ATCC 13311 dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Keempat, perbandingan ekstrak kombinasi daun sirih dan daun alpukat adalah (1:1, 1:3, 3:1)

Kelima, kontrol positif dalam penelitian ini adalah larutan antibiotik kloramfenikol 30 µg diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret.

Keenam, kontrol negatif dalam penelitian ini adalah larutan Tween 80 10% diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Ketujuh, diameter zona hambat adalah daerah hambatan jernih yang mengelilingi sumuran yang berisi sampel uji dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kondensor dan dandang besar, lampu spiritus, jarum ose tangkai panjang, cawan petri steril, kapas lidi steril, inkubator, mikropipet, mikroskop, gelas ukur, pipet volume steril, deck

glass, objek glass, botol vial steril, inkas, autoklaf, oven, pinset, alat *moisture balance*, neraca analitik dan jangka sorong.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain daun sirsak, etanol 70%, tween 80 10%, kloramfenikol 30 µg/disk, alumunium foil, kertas saring, kapas, plastik tahan panas, antiseptik, spiritus, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, kalium iodida (KI), seng (Zn), magnesium (Mg), asam klorida (HCl) pekat, asam asetat (CH₃COOH) glasial, H₂SO₄ pekat, kloroform (CH₃Cl), karbol kristal ungu, akuades, media Nutrient Agar (NA), media Mueller-Hinton agar (MHA), media *Brain Heart Infusion* (BHI), media agar Salmonella Shigella (SS), media Simmons Citrate Agar (SCA), media MIO (Motility-Indole-Ornithine), standar Mc. Farland 0,5.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan Simplisia

Daun sirsak dan daun alpukat diambil dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun yang diambil dari keduanya adalah yang berwarna hijau tua, daun tidak rusak dan tidak kering. Kedua daun dicuci dengan air yang mengalir sampai bersih yang ditandai dengan tidak adanya debu dan kotoran yang menempel pada daun.

2. Determinasi tanaman

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan identifikasi daun sirsak dan daun alpukat. Identifikasi ini digunakan untuk memastikan kebenaran sesuai dengan ciri morfologi, makroskopis dan mikroskopis tanaman yang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Sebelas Maret, Surakarta.

3. Pembuatan serbuk

Pembuatan serbuk dilakukan dengan cara yaitu pertama daun sirsak dan daun alpukat dicuci dengan air bersih mengalir agar terbebas dari debu dan kotoran. Daun yang telah dicuci kemudian ditiriskan dan dikeringkan dengan oven selama kurang lebih 5 hari. Daun diserbuk kemudian diayak dengan mesh

nomer 40 agar didapat derajat kehalusan serbuk yang relative homogen. Hasil serbuk dari pengayakan kemudian disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat yang selanjutnya akan digunakan untuk penelitian.

4. Pembuatan larutan ekstrak etanol daun sirsak

Ekstraksi serbuk daun sirsak dengan menggunakan metode maserasi. Serbuk daun sirsak dan daun alpukat masing-masing 500 gram dimasukkan kedalam botol coklat besar kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 3750 ml ditutup dan direndam selama 5 hari dengan pengocokkan berulang, bagian ampas dibilas dengan sisa pelarut. Sari yang diperoleh dipekatkan dengan evaporator sampai didapat ekstrak kental. Pelarut etanol 70% yang masih tertinggal diuapkan didalam oven.

5. Pembuatan larutan ekstrak etanol daun alpukat

Ekstraksi serbuk daun alpukat dengan menggunakan metode maserasi. Serbuk daun sirsak dan daun alpukat masing-masing 500 gram dimasukkan kedalam botol coklat besar kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 3750 ml ditutup dan direndam selama 5 hari dengan pengocokkan berulang, bagian ampas dibilas dengan sisa pelarut. Sari yang diperoleh dipekatkan dengan evaporator sampai didapat ekstrak kental. Pelarut etanol 70% yang masih tertinggal diuapkan didalam oven.

Persen rendemen diperoleh dari menimbang bahan dengan rumus berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat serbuk}} \times 100\%$$

6. Pembuatan ekstrak kombinasi bahan uji daun sirsak dan daun alpukat

6.1 Kombinasi serbuk daun sirsak dan daun alpukat 1:1. Serbuk daun sirsak 250 gram dan daun alpukat 250 gram dimasukkan dalam botol coklat dengan 3750 ml pelarut etanol 70% perbandingan 1:7,5 yaitu 1 bagian simplisia dimasukkan dalam 7,5 bagian cairan penyari, kemudian direndam selama 5 hari. Ekstrak yang diperoleh disaring dan dipekatkan dengan alat *Rotary evaporator* dengan suhu 65°C.

6.2 Kombinasi serbuk daun sirsak dan daun alpukat 1:3. Serbuk daun sirsak 125 gram dan daun alpukat 375 gram dimasukkan dalam botol coklat dengan 3750 ml pelarut etanol 70% perbandingan 1:7,5 yaitu 1 bagian simplisia

dimasukkan dalam 7,5 bagian cairan penyari, kemudian direndam selama 5 hari. Ekstrak yang diperoleh disaring dan dipekatkan dengan alat *Rotary evaporator* dengan suhu 65°C.

6.3 Kombinasi serbuk daun sirsak dan daun alpukat 3:1. Serbuk daun sirsak 375 gram dan daun alpukat 125 gram dimasukkan dalam botol coklat dengan 3750 ml pelarut etanol 70% perbandingan 1:7,5 yaitu 1 bagian simplisia dimasukkan dalam 7,5 bagian cairan penyari, kemudian direndam selama 5 hari. Ekstrak yang diperoleh disaring dan dipekatkan dengan alat *Rotary evaporator* dengan suhu 65°C.

7. Penetapan susut pengeringan serbuk daun sirsak dan daun alpukat

Penetapan susut pegeringan serbuk daun sirsak dan daun alpukat dilakukan dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Suhu yang digunakan adalah 105°C dan waktu pengeringan selama 15 menit, kemudian dimasukkan daun sirsak dan daun alpukat sebanyak 2 gram dalam neraca timbang. Tanda proses selesai hingga terdengar suara atau bunyi dari alat yang digunakan. Catat nilai susut pengeringan masing-masing serbuk daun sirsak dan alpukat yaitu tidak boleh lebih dari 10%.

8. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara uji esterifikasi menggunakan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, hasil bebas etanol dalam ekstrak daun sirsak dan daun alpukat ditandai dengan adanya bau ester yang khas dari etanol.

9. Sterilisasi

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan beaker glass disterilkan dalam oven disuhu 170-180°C selama 2 jam, sedangkan alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemijaran.

10. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam daun sirsak dan daun alpukat berupa flavonoid, alkaloid, tannin dan saponin dengan suatu pereaksi

10.1. Identifikasi flavonoid. Uji flavonoid dilakukan dengan menimbang 1 gram ekstrak ditambah dengan serbuk Mg, 0,2 ml HCL pekat dan beberapa tetes amilalkohol. Larutan dikocok dan dibiarkan memisah. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah coklat (Yunita 2009).

10.2. Identifikasi alkaloid. Uji alkaloid dilakukan dengan menimbang 2 gram ekstrak ditambah 5 ml larutan amoniak dan 5 ml kloroform, kemudian larutan dicampur dan dipanaskan, dikocok dan disaring. Asam sulfat 2N ditambahkan pada filtrate kemudian dikocok. Bagian atas filtrate diuji dengan pereaksi *Mayer*, *Wagner* dan *Dragendroff*. Hasil positif *Mayer* ditandai dengan endapan putih. Hasil positif *Wagner* ditandai dengan endapan coklat. Hasil positif *Dragendroff* ditandai dengan endapan merah jingga (Yunita 2009).

10.3. Identifikasi tannin. Uji tannin dilakukan dengan melarutkan 80 mg ekstrak pada 50 ml air panas, disaring, filtrate pada tabung reaksi ditambahkan pereaksi $FeCl_3$ dan *Stiasny* beberapa tetes. Filtrat yang terbentuk berwarna biru tinta atau kehitaman menunjukkan tannin galat, tetapi jika filtrat ditambahkan dengan pereaksi *Stiasny* dan asam klorida (2:1) dipanaskan 30 menit, kemudian terbentuk endapan merah berarti menunjukkan hasil positif tannin katekol (Apriyuslim *et al.* 2015).

10.4. Identifikasi saponin. Uji saponin dilakukan dengan memasukkan serbuk sampel pada tabung reaksi yang telah berisikan aquadest 10 ml, kemudian dikocok dan ditambahkan satu tetes larutan asam klorida 2N dan didiamkan. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya busa stabil dengan ketinggian 1-3 cm selama 30 detik (Charyadie *et al.* 2014).

11. Identifikasi golongan senyawa kimia secara KLT

Pemisahan senyawa flavonoid pada plat KLT menggunakan plat silika ($G_{60}F_{254}$) plat silika sebagai fase diam dibuat ukuran 1 cm x 10 cm dengan pencil, penggaris dan cutter, kemudian dibuat tanda 1 cm dari tepi bagian bawah dan 0,5 cm dari tepi bagian atas plat (diberi tanda pada bagian bawah sebagai posisi awal penotolan). Plat KLT silika gel diaktivasi dengan cara dioven suhu 60-80°C selama 60 menit untuk menghilangkan kadar air yang ada pada plat KLT. Fase gerak yang bisa digunakan dapat berupa hampir semua jenis pelarut atau

campuran pelarut dan dalam penelitian ini digunakan campuran pelarut yang bertujuan agar lebih efektif dalam memisahkan setiap komponen senyawa kimia yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda-beda. Sebelum digunakan *chamber* lebih dahulu dijenuhkan menggunakan fase gerak selama 20-30 menit, penjenruhan dilakukan untuk menyamakan tekanan uap pada seluruh bagian benjana (Latifah 2015).

Identifikasi senyawa-senyawa yang terpisah pada kromatografi lapis tipis dapat menggunakan harga Rf (*Retardation factor*) yang menggambarkan jarak yang ditempuh oleh suatu komponen terhadap jarak keseluruhan, dengan rumus :

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh zat terelusi}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

12. Pembuatan suspensi bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311

Bakteri murni *Salmonella typhi* ATCC 13311 diambil satu ose steril kemudian dimasukkan secara aseptis dalam tabung reaksi steril yang sudah berisi 5 ml BHI (*Brain Heart Infusion*) keaprmudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, selanjutnya digunakan untuk identifikasi.

13. Identifikasi bakteri *Salmonella typhi* ATCC

Identifikasi bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311, biakan bakteri diinokulasikan pada media selektif *Salmonella Shigella Agar* (SSA) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

13.1 Pewarnaan gram. Pewarnaan Gram negatif *Salmonella typhi* menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama) ditunggu ± 3 menit kemudian dibilas dengan air mengalir. Gram B (lugol iodine sebagai pengintensif warna) ± 1 menit kemudian dibilas dengan air mengalir. Gram C (etanol : aseton 1:1 sebagai peluntur warna) kemudian dibilas dengan air mengalir. Gram D (cat safranin sebagai penutup) ± 1 menit kemudian dibilas. Bakteri dinyatakan Gram negatif apabila berwarna merah dibawah mikroskop.

13.2 Uji biokimia.

a. Media LIA. Media ditimbang sebanyak 3,2 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian ditambahkan 100 ml akuades pada media dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* sambil dipanaskan di atas *hot plate*

hingga mendidih. Media disterilkan dengan autoklaf. Media sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dibiarkan pada posisi miring selama 24 jam, kemudian dimasukkan ke dalam lemari pendingin, selanjutnya diamati pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna merah (Anggraini *et al.* 2016).

b. Media SC. Media ditimbang sebanyak 4,5 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian ditambahkan 200 ml akuades pada media dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* sambil dipanaskan di atas *hot plate* hingga mendidih. Media disterilkan dengan autoklaf. Media sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dibiarkan pada posisi miring selama 24 jam, kemudian dimasukkan ke dalam lemari pendingin. Uji ini negative bila media berwarna biru, dan hasil positif jika terbentuk warna hijau (Anggraini *et al.* 2016).

c. Media KIA. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfide. Selanjutnya diamati pada bagian dasar jika terbentuk gas serta warna hitam pada media. Uji positif bila lereng berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G), sulfida positif adanya warna hitam pada media (ditulis S+). Hasil positif dapat dituliskan yaitu A/A S- (Anonim 2012).

d. Media SIM. Biakan murni bakteri diinokulasi pada permukaan media dengan cara inokulasi tusukan dan diinkubasi selama 24jam pada suhu 37C. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji adanya sulfida indol dan motilitas bakteri. Uji sulfide positif bila ada warna hitam, uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambahkan reagen *Erhlich* A dan B. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media (Rahmi *et al.* 2014).

14. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi

Metode difusi digunakan untuk menentukan luas zona diameter hambat terhadap bakteri uji. Metode ini mempunyai keuntungan dibandingkan metode lain yaitu lebih ekonomis, sederhana dan mudah dibuat.

Metode difusi dilakukan pada cawan petri steril yang berisi media MHA (*Muller Hinton Agar*) dan membuat sumuran yang mengandung larutan uji. Pertama mengambil biakan bakteri dalam media BHI yang sudah dibandingkan dengan *Mc Farland* 0,5 menggunakan kapas lidi steril. Bakteri diinokulasi pada medium MHA secara perataan, lalu didiamkan 10 menit agar suspensi biakan terdifusi ke media. Bagian sumur A diisi ekstrak daun sirsak, bagian B diisi ekstrak ekstrak daun alpukat, bagian 1 diisi larutan kombinasi (1:1), bagian 1 diisi larutan kombinasi (1:3), bagian 1 diisi larutan kombinasi (3:1), bagian (-) diisi larutan tween 80 10% sebagai kontrol negatif dan bagian (+) diisi disk antibiotik kloramfenikol sebagai kontrol positif. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri sekitar sumuran menandakan bahwa kandungan kimia dari bahan uji memiliki daya hambat terhadap bakteri. Pengujian ini dilakukan dengan 3 kali replikasi.

E. Bioautografi

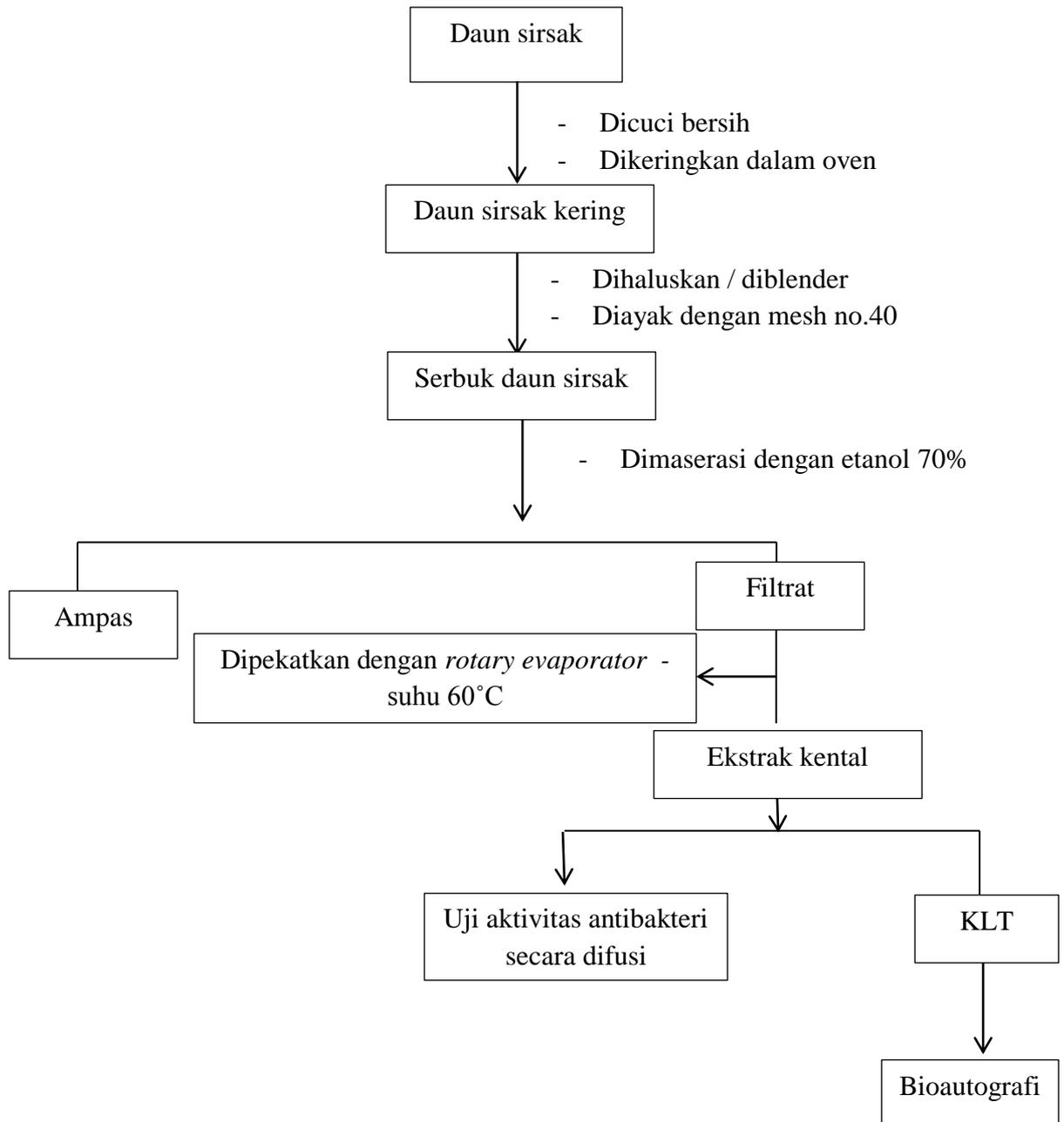
Bioautografi dilakukan untuk mendeteksi adanya senyawa aktif lain yang belum terdeteksi dan mempunyai aktivitas sebagai antibakteri dari kombinasi ekstrak daun sirsak dan daun alpukat. Kromatogram yang telah dielusi masing-masing diletakkan selama 20 menit pada permukaan media MHA (*Mueller Hinton Agar*) dalam cawan petri yang telah diinokulasi dengan 200 µL suspensi bakteri *Salmonella typhi* yang telah dibuat setara dengan 1,5x10⁸ CFU/ml. Kromatogram kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 30 menit, setelah itu kromatogram dilepas dari media dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil analisis sebagai antibakteri dinyatakan dengan terbentuknya zona jernih pada area kromatogram sebagai zona hambatnya.

F. Analisis hasil

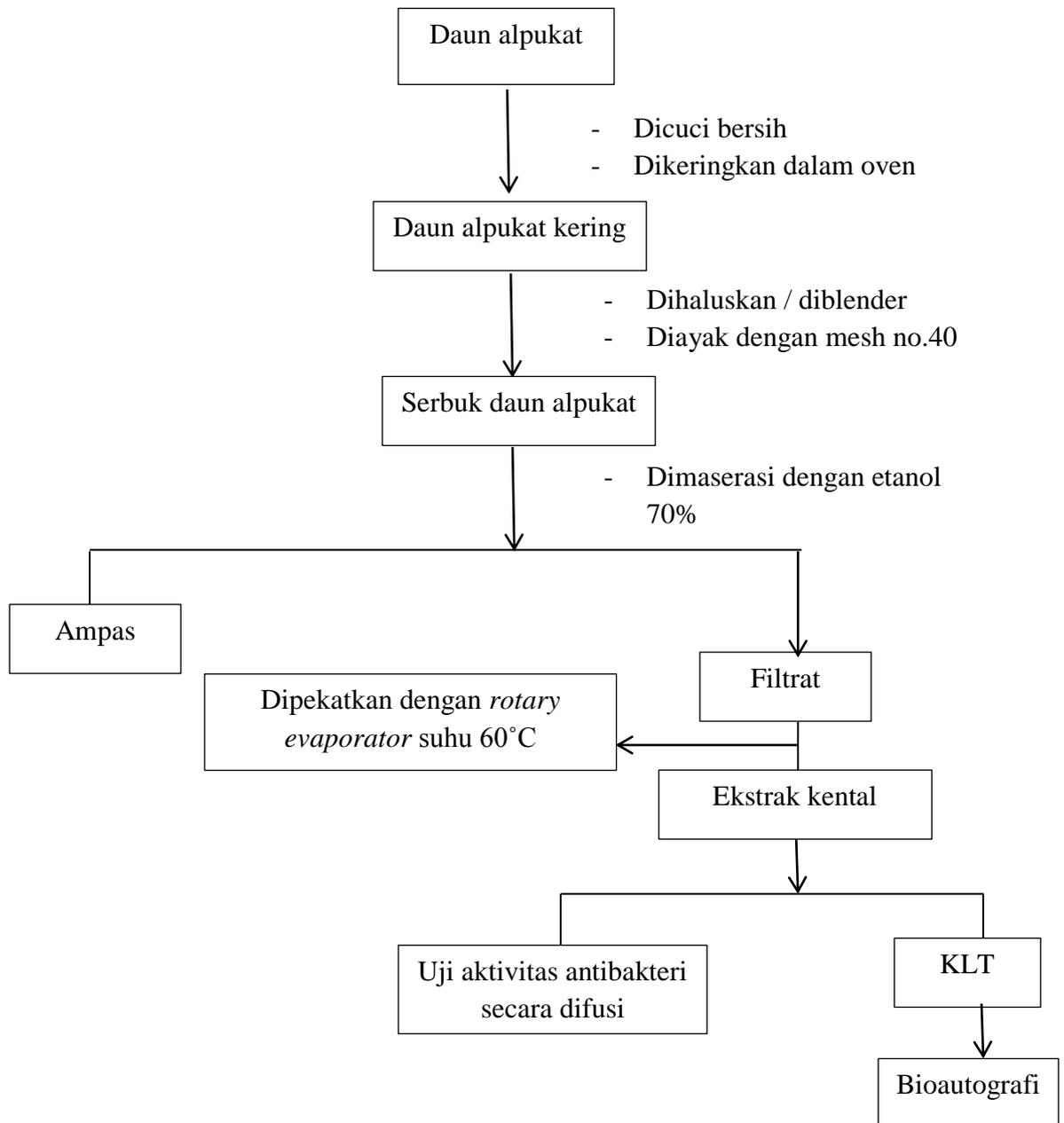
Data hasil penelitian dianalisis dengan mengukur daerah hambat dari ekstrak daun sirsak, ekstrak daun alpukat dan kombinasi keduanya (1:1), (1:3), (3:1) terhadap pertumbuhan bakteri uji *Salmonella typhi*. Analisis dilanjutkan menggunakan *software* SPSS 17 untuk melihat apakah data tersebut terdistribusi

normal atau tidak dengan menggunakan *One-Sampel Kolmogorof-Smirnov*, sedangkan jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA).

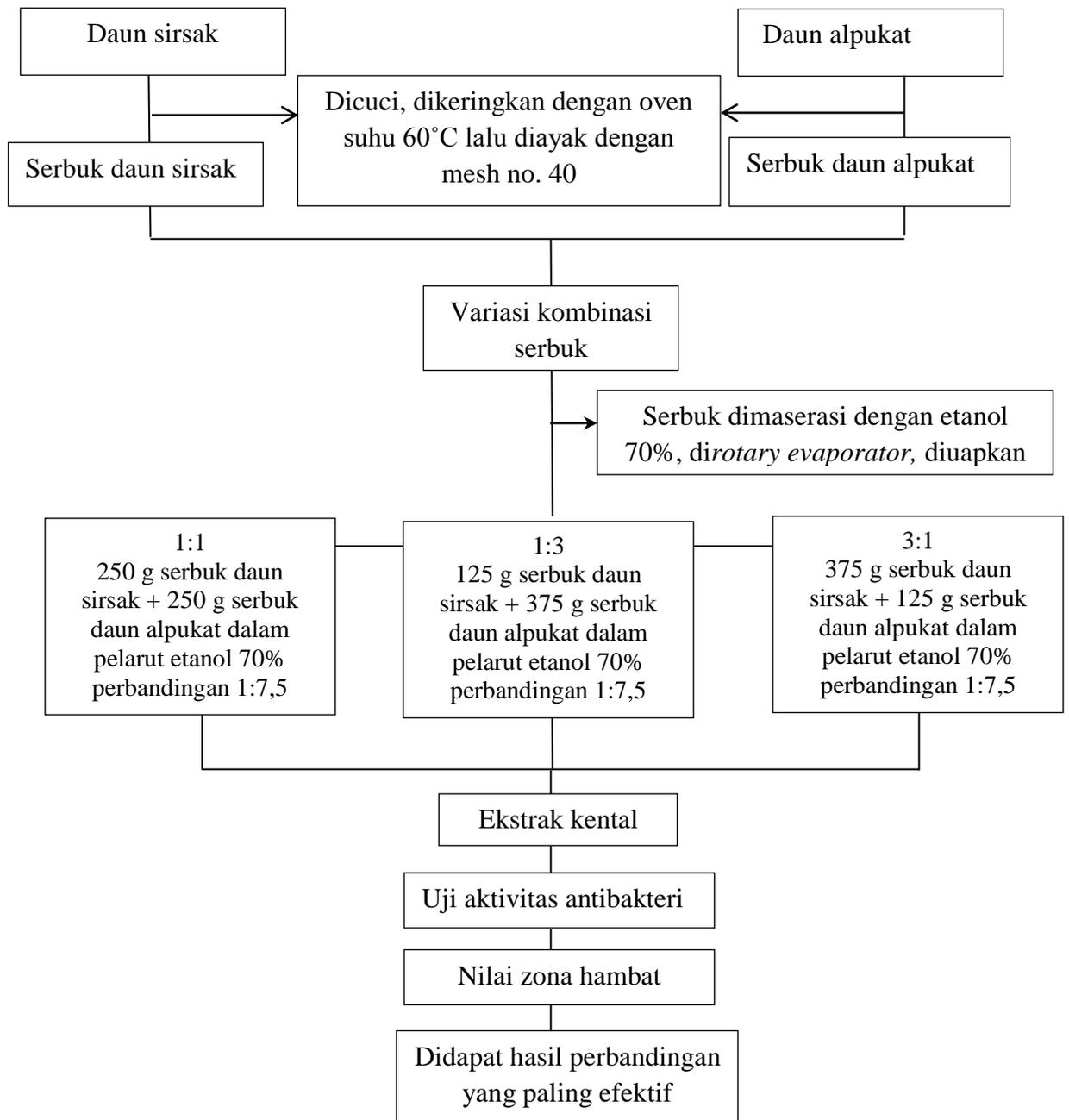
G. Skema Jalannya Penelitian



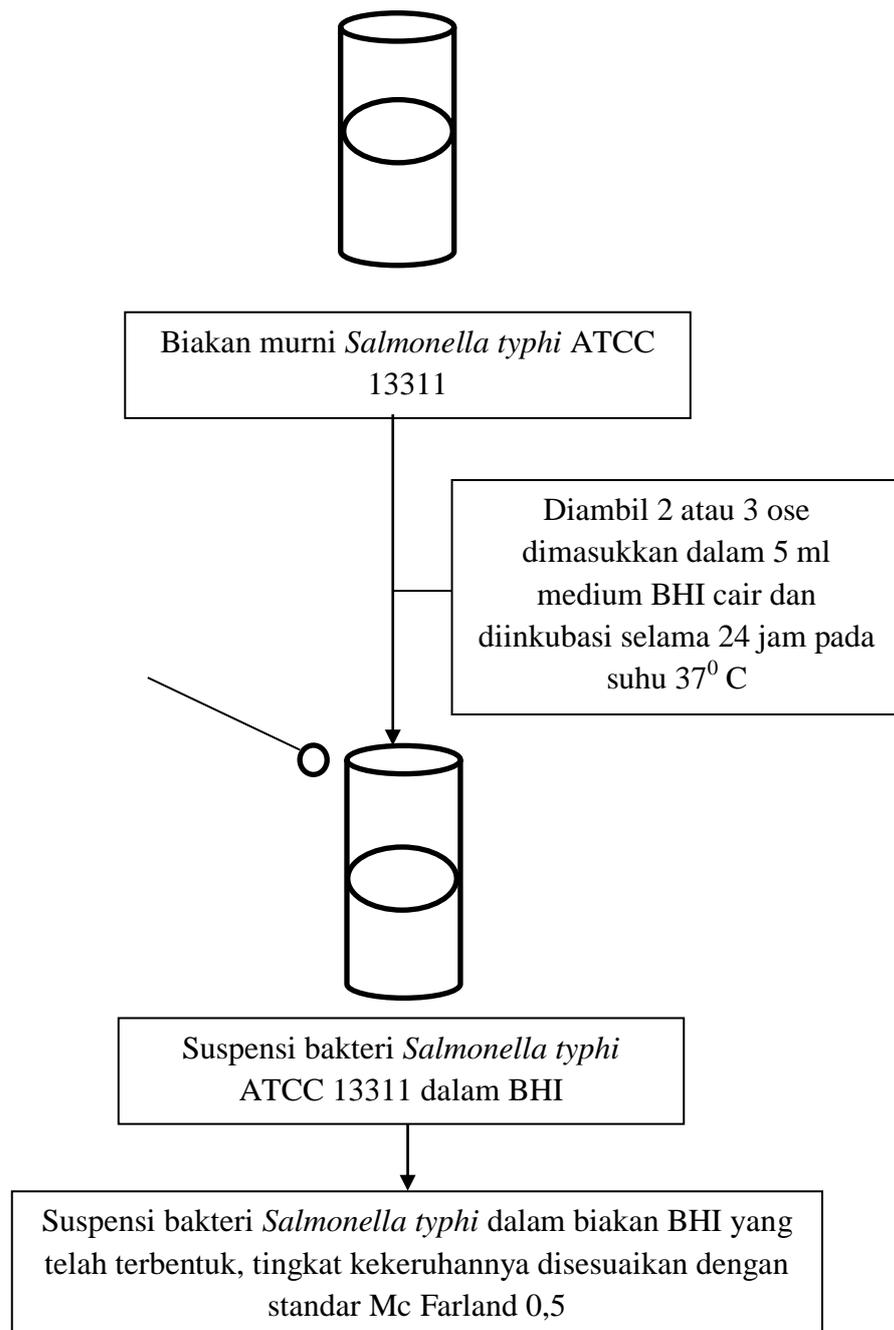
Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak daun sirsak dan uji aktivitas antibakterinya



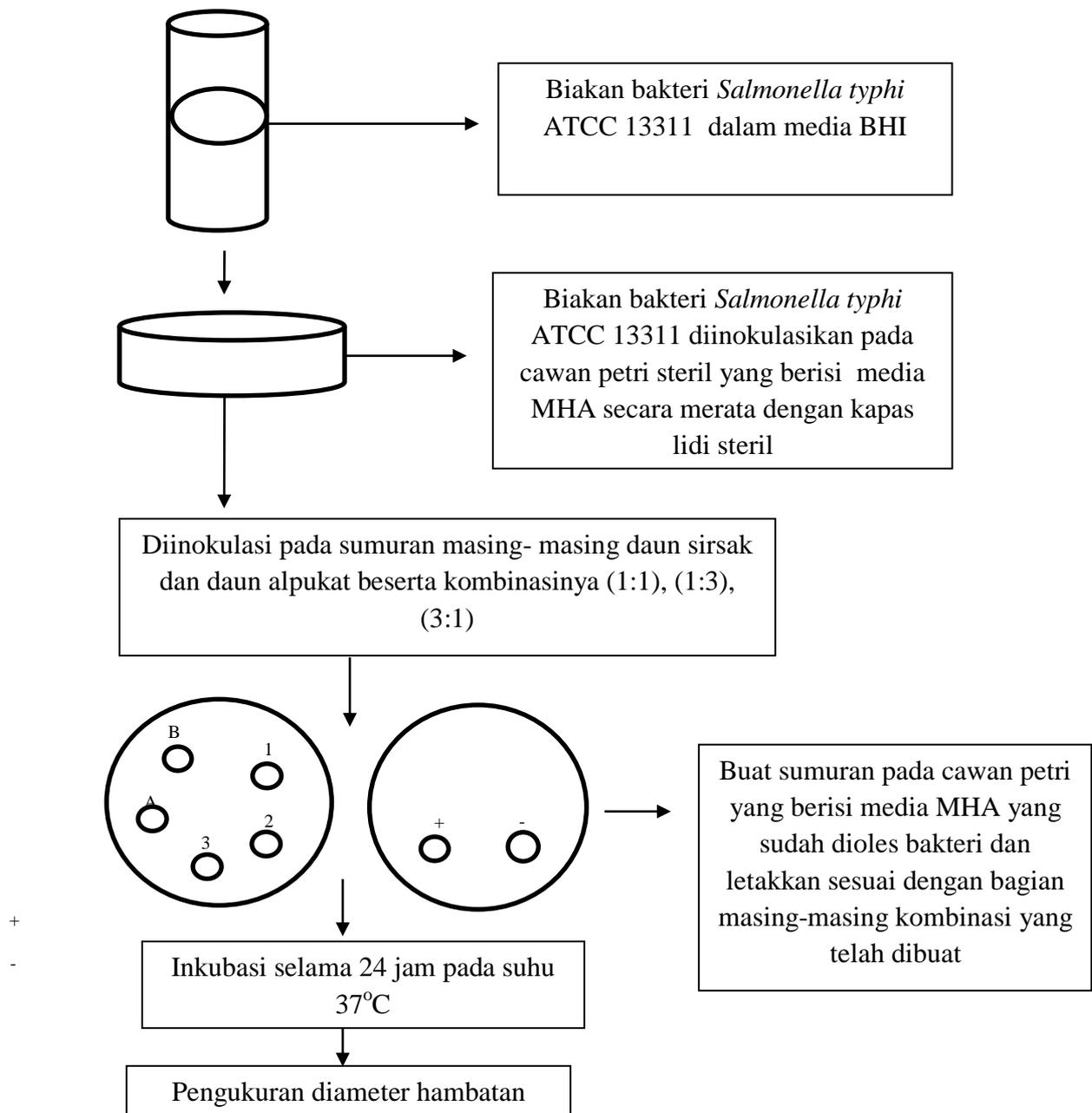
Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak daun alpukat dan uji aktivitas antibakterinya



Gambar 3. Skema pembuatan kombinasi daun sirsak dan daun alpukat serta uji antibakterinya



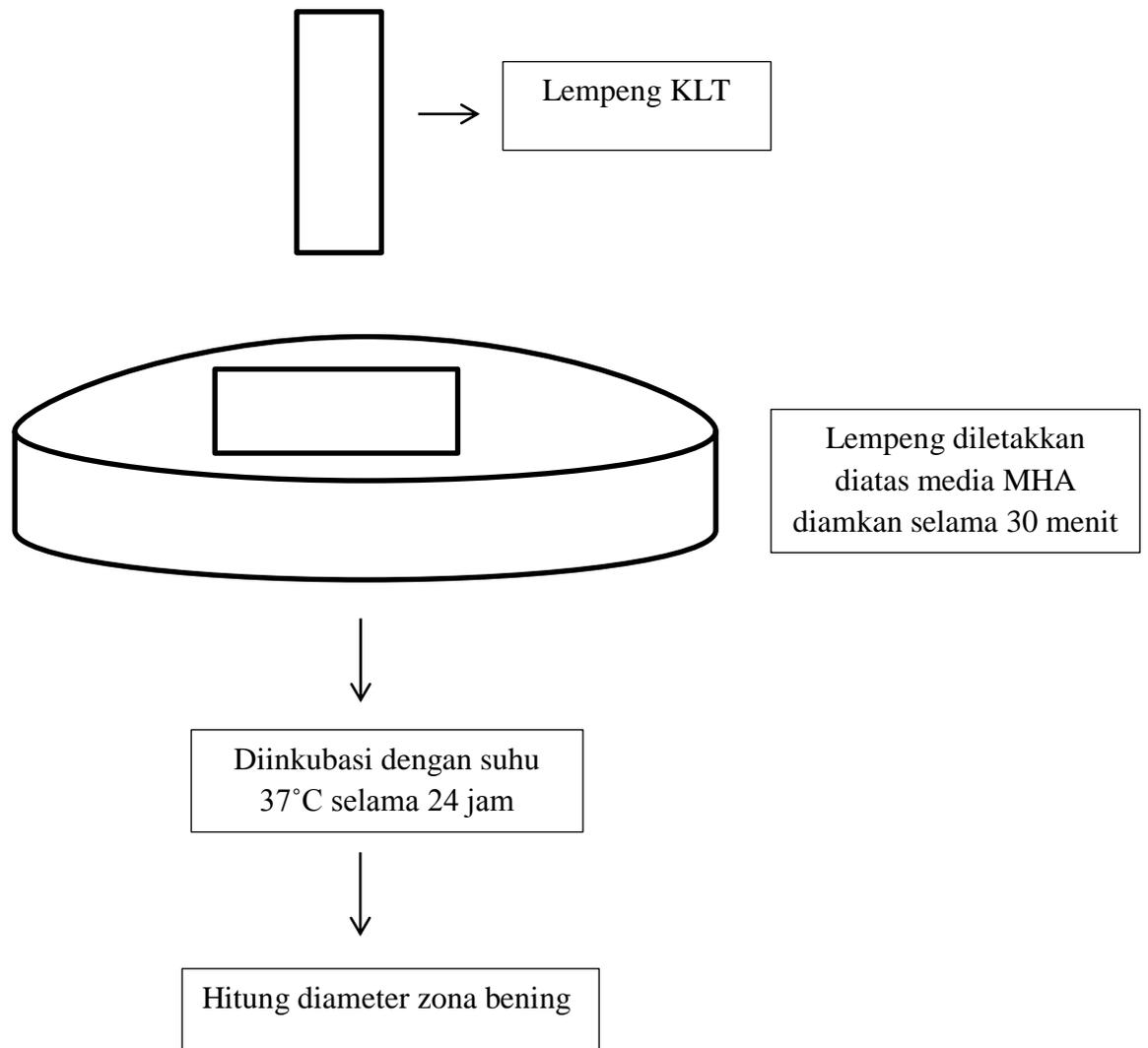
Gambar 4. Skema pembuatan suspensi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311



Keterangan:

(A) Sampel ekstrak daun sirsak, (B) Sampel ekstrak daun alpukat, (1) Kombinasi ekstrak daun sirsak dan daun alpukat(1:1), (2) Kombinasi ekstrak daun sirsak dan daun alpukat (1:3), (3) Kombinasi ekstrak daun sirsak dan daun alpukat (3:1), (+) Kontrol positif antibiotik kloramfenikol, (-) Kontrol negatif tween 80 10%.

Gambar 5. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi



Gambar 6. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode bioautografi

