

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yaitu semua objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan bawang putih (*Allium sativum* L.). Bawang putih diambil dari daerah Karanganyar, Jawa Tengah dan daun jambu mete diambil dari desa Mojosongo, Surakarta Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.), dengan ciri-ciri daun berwarna hijau dan dalam kondisi yang bebas dari penyakit, diambil secara acak dengan memilih helaian daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau, segar, bebas dari hama, dan dipanen pagi hari diperoleh dari daerah Surakarta, Jawa Tengah. Umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) diambil secara acak dengan memilih umbi bawang putih yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna putih kekuningan, segar, bebas dari hama, dan dipanen siang hari diperoleh dari daerah Karanganyar, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah ekstrak etanol 96% dari daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.).

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak dengan perbandingan 1:1, 1:3 dan 3:1 dari daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361.

Variabel utama ketiga adalah aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol 96% dari daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan kedalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang biasanya diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel kendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir dan perlu ditetapkan kualifikasinya, hasil yang didapatkan tidak menyebar dan dapat dilakukan peneliti lain secara tepat. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi dari ekstrak etanol 96% daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) dengan perbandingan 1:1, 1:3 dan 3:1.

2.2 Variabel kendali. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Shigella dysenteriae* ATCC9361, kondisi laboratorium (antara lain: kondisi inkasi, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, tempat tumbuh tanaman, waktu panen, dan metode ekstraksi.

2.3 Variabel tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas kombinasi ekstrak etanol 96% daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) yang dapat mempengaruhi pertumbuhan *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 pada media uji.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) adalah tanaman yang diambil dari Desa Mojosongo, Surakarta. Kedua, umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) adalah tanaman yang diambil dari Karanganyar, Jawa Tengah.

Ketiga, serbuk jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) yang dikerjakan dalam alat pengering oven pada suhu 50°C, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomer 40. Keempat, serbuk umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) yang dikerjakan dalam alat pengering oven pada suhu 50°C, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomer 40. Kelima, ekstrak daun jambu

mete (*Anacardium occidentale* L.) adalah hasil dari maserasi serbuk dengan pelarut etanol 96%. Keenam, ekstrak umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) adalah hasil dari maserasi serbuk dengan pelarut etanol 96%. Ketujuh, kombinasi ekstrak jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) 1:1 adalah kombinasi ekstrak etanol daun jambu mete 0,50 mg dan umbi bawang putih 0,50 mg dicampurkan dan diencerkan dengan DMSO 1%. Kedelapan, kombinasi ekstrak daun jambu mete dan umbi bawang putih dengan perbandingan 1:3 adalah kombinasi ekstrak etanol daun jambu mete 0,25 mg dan daun umbi bawang putih 0,75 mg dicampurkan dan diencerkan dengan DMSO 1%. Kesembilan, kombinasi ekstrak daun jambu mete dan umbi bawang putih dengan perbandingan 3:1 adalah kombinasi ekstrak etanol daun jambu mete 0,75 mg dan umbi bawang putih 0,25 mg dicampurkan dan diencerkan dengan DMSO 1%. Kesepuluh, bakteri uji dari penelitian ini adalah *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 diambil dari Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Kesebelas, penentuan aktivitas antibakteri dengan metode difusi adalah mengukur diameter daerah hambatan terhadap pertumbuhan bakteri diujikan pada ekstrak tunggal daun jambu mete, ekstrak tunggal bawang putih, serta kombinasi ekstrak daun jambu mete dan ekstrak umbi bawang putih dengan perbandingan (1:1), (1:3), (3:1). Kedua belas, uji antibakteri ekstrak teraktif dengan metode difusi, berupa ekstrak tunggal maupun ekstrak kombinasi daun jambu mete dan umbi bawang putih yang paling aktif terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361. Ketiga belas, metode dilusi adalah pengujian dengan membuat konsentrasi ekstrak tunggal yang diinkubasi dengan suhu 37° C selama 24 jam yang diamati dengan melihat taraf kekeruhan dalam media.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) dan daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.). Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Shigella dysenteriae* ATCC 9361. Medium yang digunakan adalah SSA (*Salmonella Shigella* Agar), KIA

(*Kligler Iron Agar*), SIM (*Sulfit Indol Motility*), LIA (*Lysin Iron Agar*), SCA (*Simmons Citrate Agar*), MHA (*Mueller Hinton Agar*), dan BHI (*Brain Heart Infusion*). Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%, asam asetat, asam sulfat pekat, HCl 2N, larutan mayer, HCl pekat, larutan dragendorff, magnesium, pelarut amil alkohol, FeCl₃, reagen Erlich A, reagen Erlich B, larutan krisal violet, minyak imersi, larutan safranin, larutan lugol, larutan alkohol dan DMSO 1%. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat timbang, ayakan nomor 40, *Moisture balance*, tabung reaksi, gelas ukur, vial, pipet tetes, pipet volume, micropipette, syring, pinset, inkubator, corong kaca, penangas air, seperangkat alat maserasi, seperangkat alat *rotary evaporator*, pembakar spiritus, *beaker glass*, jarum Ose, *autoclav*, blender, oven, mikroskop, object glass, deck glass, kain flanel, batang pengaduk, labu ukur, gelas arloji, kertas karton, kapas lidi steril, kertas koran, cawan petri.

D. Jalannya Penelitian

Daun daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) diambil yang masih segar dan bersih, kemudian dicuci bersih dan dilanjutkan ke tahap selanjutnya. Pengambilan simplisia jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) yang diambil dari Desa Mojosongo, Surakarta dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) yang diambil dari Daerah Karanganyar, Jawa Tengah.

1. Determinasi tanaman

Determinasi jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan bawang putih (*Allium sativum* L.) dilakukan dengan menunjukkan tanaman daun jambu mete dan bawang putih yang meliputi daun, batang, bunga, akar dan buah kemudian

menetapkan kebenarannya sesuai ciri-ciri morfologinya. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pembuatan serbuk

Pembuatan serbuk daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) dengan cara dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) yang sudah bersih dipotong-potong kemudian ditimbang, setelah itu dikeringkan dengan cara di oven. Daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) diserbuk dengan alat penyerbuk kemudian diayak dengan menggunakan ayakan nomor 40 sehingga diperoleh serbuk yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen. Pembuatan serbuk bertujuan untuk memperbesar luas permukaan antara cairan penyari dengan serbuk.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan bawang putih (*Allium sativum* L.)

Penetapan susut pengeringan daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) dilakukan dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Serbuk ditimbang sebanyak 2 gram dan suhu *moisture balance* yang digunakan adalah 105°C selama 30 menit atau sampai berat konstan (DepKes RI 2000).

4. Pembuatan ekstrak etanol

4.1. Ekstrak etanol daun jambu mete. Serbuk daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) ditimbang sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam botol cokelat diisi dengan 3750 ml pelarut etanol 96% dengan perbandingan 10:75, kemudian direndam selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil berulang diaduk-aduk. Setelah 5 hari diserkai, ampas diperas. Filtrat yang diperoleh disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 65°C.

4.2. Ekstrak etanol umbi bawang putih. Serbuk bawang putih (*Allium sativum* L.) ditimbang sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam botol cokelat diisi dengan 3750 ml pelarut etanol 96% dengan perbandingan 10:75, kemudian direndam selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil berulang diaduk-aduk.

Setelah 5 hari direndam, ampas diperas. Filtrat yang diperoleh disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 65°C.

5. Uji bebas etanol

Tes bebas etanol dilakukan dengan cara esterifikasi alkohol. Dengan cara ekstrak daun jambu mete dan ekstrak umbi bawang putih masing-masing ditambah asam acetat (CH₃COOH) dan asam sulfat pekat (H₂SO₄) kemudian dipanaskan, jika tidak terdapat bau khas ester berarti sudah tidak terdapat alkohol dalam ekstrak daun jambu mete dan ekstrak umbi bawang putih.

6. Pengujian kandungan kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.). Identifikasi senyawa flavonoid, saponin, tanin dan alkaloid dibuktikan di Laboratorium Kimia Analisis Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

6.1. Identifikasi flavonoid. Ekstrak sebanyak 0,5 gram dicampurkan dengan aquadestilata. Setelah itu, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrate ditambahkan 0,5 mg bubuk Mg dan ditambahkan 1 ml HCl pekat dan amil alkohol. Dicampurkan dan dikocok kuat kuat kemudian biarkan memisah. Reaksi positif ditandai dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah *et al.* 2014).

6.2. Identifikasi saponin. Ekstrak sebanyak 0,5 gram ditambahkan aquadestilata, kemudian dipanaskan selama 2 sampai 3 menit. Setelah dipanaskan tunggu sampai dingin lalu kocok dengan kuat. Adanya busa yang stabil dan setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang menandakan kandungan saponin.

6.3. Identifikasi alkaloid. Ekstrak sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan aquadestilata. Setelah itu ditambahkan 1 ml HCl 2N dibuat dalam 2 tabung. Tabung 1 ml ditambahkan reagen Mayer yang kemudian akan membentuk endapan menggumpal putih kekuningan. Tabung 2 ditambahkan reagen Dregendroff terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Alamsyah *et al.* 2014).

6.4. Identifikasi tannin. Ekstrak sebanyak 0,5 gram ditambahkan aquadestilata sampai terendam dan dipanaskan selama 3 sampai 5 menit. Kemudian direaksikan dengan menambahkan FeCl₃. Perubahan warna hujau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tannin (Alamsyah *et al.* 2014).

6.5. Identifikasi fenolik. Ekstrak diukur sebanyak 1 mL direaksikan dengan larutan FeCl₃ 5% sebanyak 2-3 tetes. Hasil positif ditunjukkan terbentuk warna hitam, ungu kehitaman, hitam abu-abu, coklat kekuningan (Harborne 1987).

7. Sterilisasi

Sterilisasi inkas dengan menggunakan formalin, media yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan *autoklaf* pada suhu 121° C selama 15 menit. Alat-alat dari gelas disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 170° C selama 1-2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan cara pemanasan api langsung (Suriawiria 1985).

8. Identifikasi bakteri uji

8.1. Identifikasi bakteri secara goresan. Identifikasi bakteri uji *Shigella dysenteriae* ATCC 9361, biakan *Shigella dysenteriae* diinkubasi pada media selektif *Salmonella Shigella Agar* (SSA) dan diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Penampakan koloni yang terjadi yaitu kecil, halus, tidak berwarna, tepi, dan permukaan rata (Jawetz *et al.* 1986).

8.2. Identifikasi bakteri uji secara biokimia. Identifikasi berdasarkan uji biokimia dengan menggunakan media SIM, KIA, LIA, dan *Citrat*.

8.2.1. Media SIM (*Sulfida Indol Motility*). Biakan murni diinokulasi pada permukaan media dengan cara diinokulasi tusukan kemudian diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif bila media berwarna hitam, uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah dengan reagen Erlich A dan B, uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. Hasil uji SIM pada *Shigella* yaitu *Sulfida* (-), *Indol* (+), *Motility* (-).

8.2.2. Media KIA (*Kliger Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk uji fermentasi karbihidrat (glukosa, laktosa) dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, terdapatnya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+). Hasil uji KIA pada *Shigella* yaitu K/A S(-).

8.2.3. Media LIA (*Lysine Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi tusukan dan goresan kemudian diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi berfungsi untuk menguji lisin dan sulfida. Selanjutnya diamati bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna coklat (ditulis R), berwarna ungu (ditulis K), berwarna kuning (ditulis A), serta terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+). Hasil uji LIA pada *Shigella* yaitu K/A S(-).

8.2.4. Media Citrat. Biakan bakteri diinokulasi goresan kemudian diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru (Jawetz *et al.* 1986). Hasil uji citrat pada *Shigella* yaitu (-).

8.3 Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram. Identifikasi mikroskopis bakteri *Shigella dysenteriae* dilakukan dengan cara pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat preparat ulas yang difiksasi lalu tetes Kristal Violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, diamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikering anginkan, kemudian tetesi mordant (lugol iodine) Gram B sebagai penguat warna dan diamkan kurang lebih 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikering anginkan setelah itu preparat dilunturkan dengan Gram C (alkohol) dan diamkan selama kurang lebih 45 detik, dicuci dengan aquadest mengalir kemudian keringkan. Larutan safranin

(Gram D) diberikan selama 3 menit , dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Minyak imersi diberikan diatas kaca preparat bakteri. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskop perbesaran 10x /100x

9. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 dalam biakan murni diambil masing-masing satu ose dan kemudian dimasukkan ke tabung yang telah diisi 10 ml media BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi yang didapat 1 ose dimasukkan dalam 10 ml BHI dan distandarkan dengan Mc Farland 0,5. Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk standarisasi atau pengendalian jumlah sel bakteri (Bonang & Koeswardono 1982).

10. Pembuatan Larutan Kombinasi Sediaan Ekstrak

Ekstrak daun jambu mete dan ekstrak umbi bawang putih dikombinasikan dengan perbandingan (1:1), (1:3), (3:1). Perbandingan (1:1) dibuat dengan mengambil ekstrak daun jambu mete sebanyak 0,5 ml dan ekstrak umbi bawang putih 0,5 ml. Perbandingan (1:3) dibuat dengan mengambil ekstrak daun jambu mete sebanyak 0,25 ml dan ekstrak umbi bawang putih 0,75 ml. Perbandingan (3:1) dibuat dengan mengambil ekstrak daun jambu mete sebanyak 0,75 ml dan ekstrak umbi bawang putih 0,25 ml.

11. Pengujian Aktivitas Antibakteri

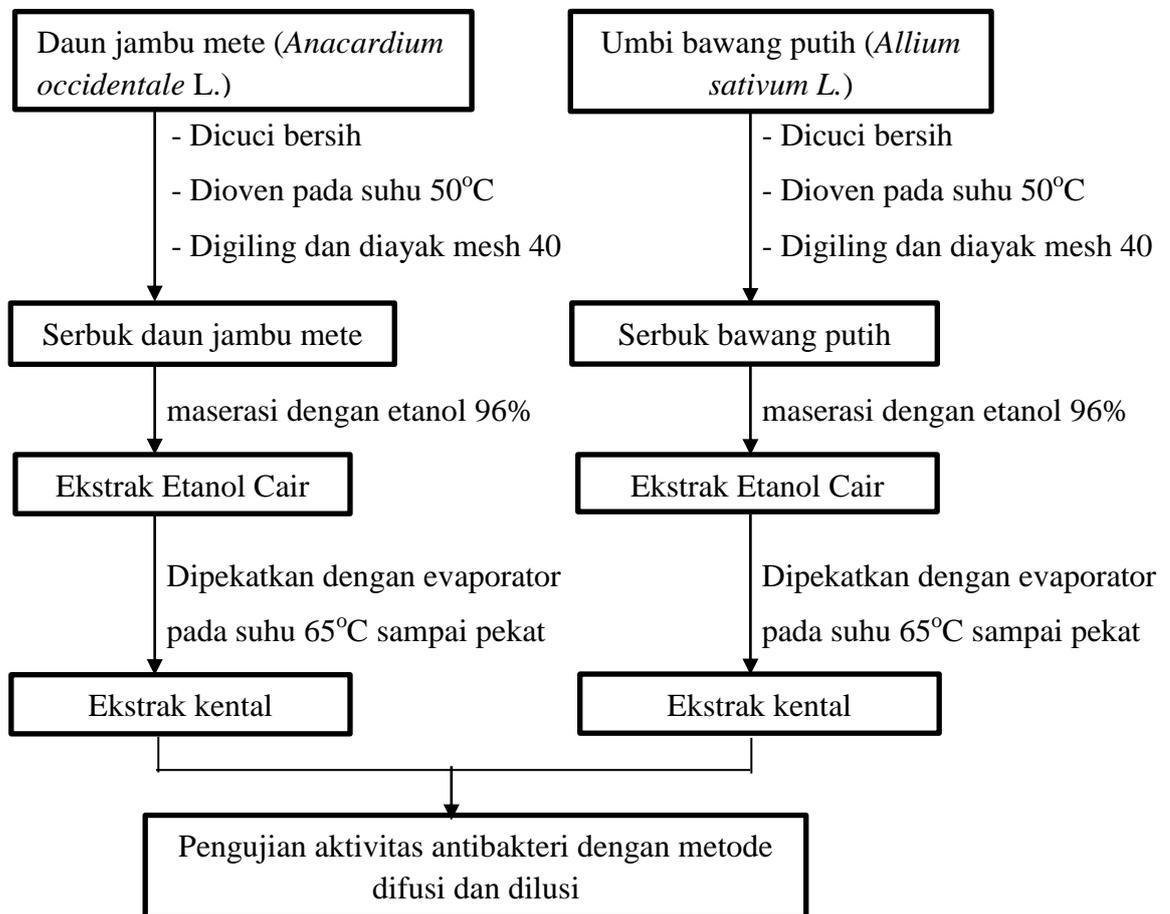
Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan metode dilusi dan difusi. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode dilusi yang bertujuan untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada sediaan ekstrak. Metode dilusi menggunakan 1 deret tabung yang terdiri dari 12 tabung steril. Konsentrasi larutan stok dibuat sebesar 50% yaitu 50 gram ekstrak kemudian diecerkan dengan DMSO 1% sebanyak 100ml. Metode dilusi menggunakan seri konsentrasi pengenceran mulai dari 50%; 25%; 12,5 %; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%. Kontrol positif menggunakan suspensi bakteri uji *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 pada tabung terakhir dan kontrol negatif menggunakan ekstrak pada tabung pertama. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan metode difusi. Metode difusi bertujuan untuk menentukan diameter daerah hambat. Metode difusi yang digunakan yaitu

menggunakan “*boor prop*”. Pembuatan larutan kombinasi ekstrak adalah 1 ml. Metode difusi dilakukan dengan inokulasi suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 25922 kedalam media MHA (*Mueller Hinton Agar*) menggunakan kapas lidi steril. Metode selanjutnya dilakukan dengan mengisi sumuran dengan ekstrak tunggal, perbandingan kombinasi ekstrak beserta kontrol yang telah dipersiapkan. Sumuran pertama berisi ekstrak tunggal jambu mete, ekstrak tunggal bawang putih, perbandingan kombinasi 1:1, 1:3, 3:1 DMSO 1% sebagai kontrol negatif dan kotrimoksazol sebagai pembanding kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Amati hasilnya kemudian diukur diameter daerah hambat yang jernih menggunakan jangka sorong (satuan mm). Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar sumuran menunjukkan ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi dari daun jambu mete dan bawang putih memiliki daya hambat terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361.

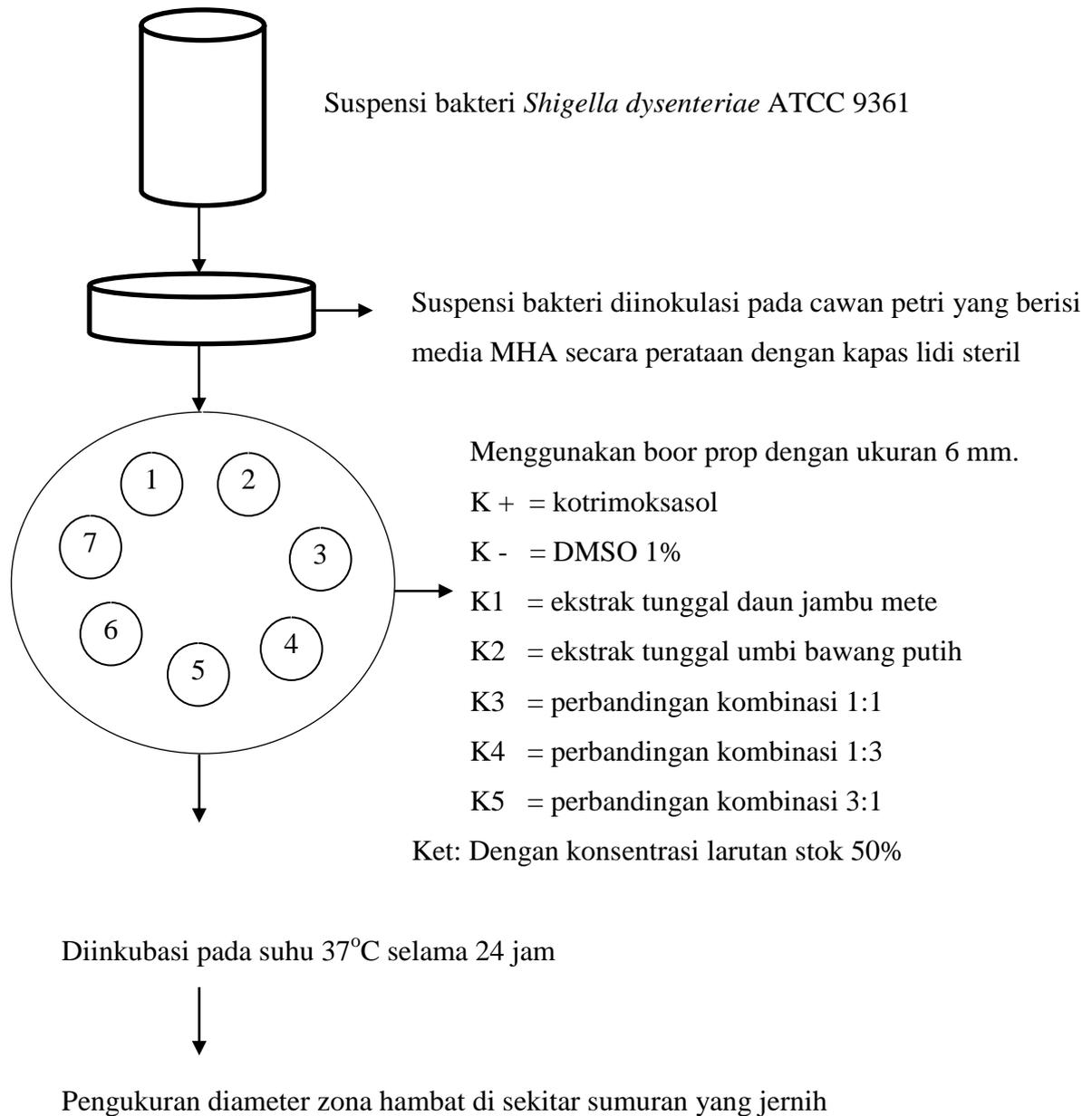
E. Analisis Hasil

Data hasil penelitian diperoleh dengan mengukur daya sebar dilihat dari adanya daerah hambatan pertumbuhan bakteri uji yang ditunjukkan dengan adanya zona jernih disekeliling sumuran yang tidak ditumbuhi bakteri, kemudian diukur diameter hambatan pertumbuhan bakterinya dari masing-masing lingkungan. Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan *Non-Parametric Test*

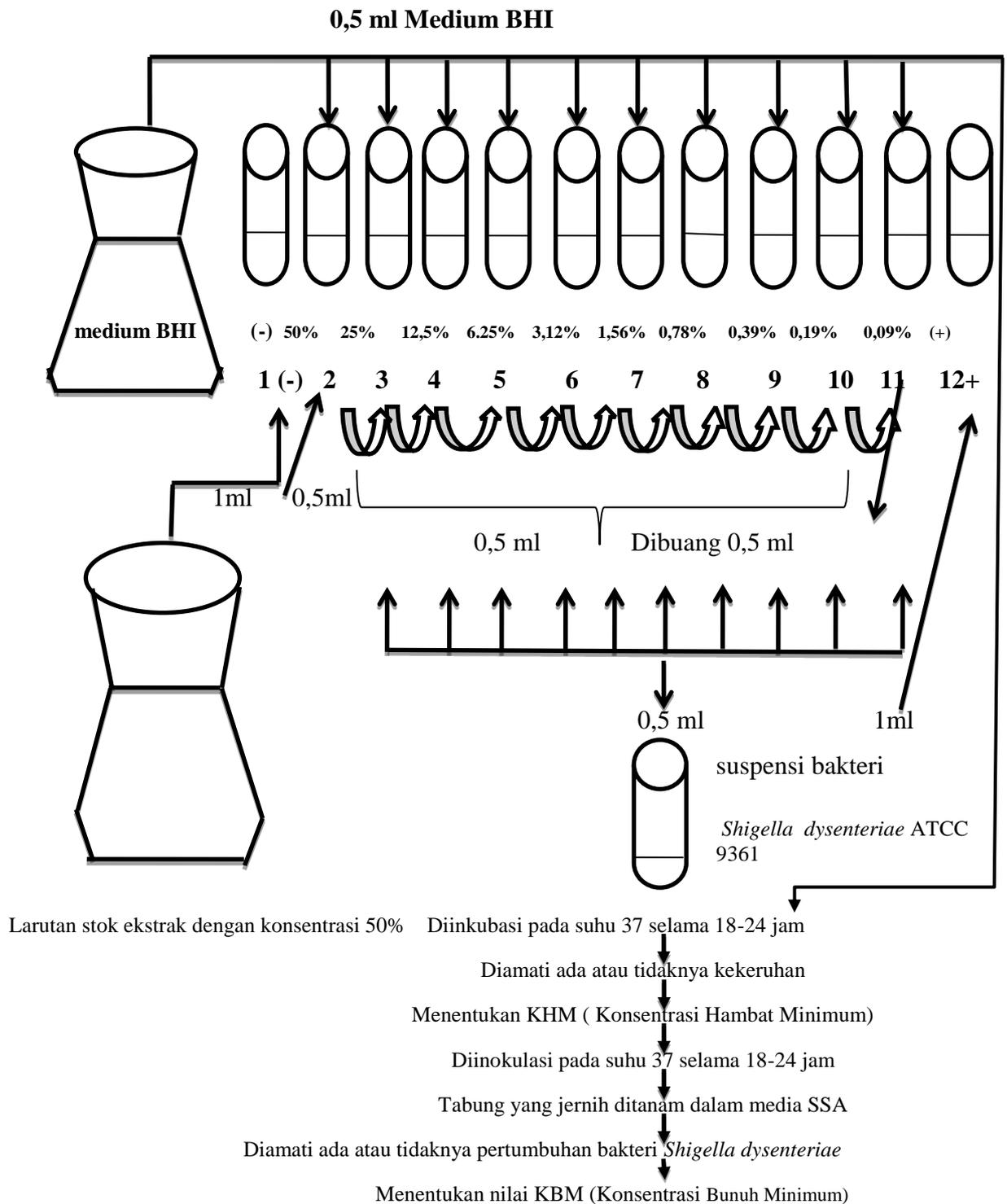
F. Skema penelitian



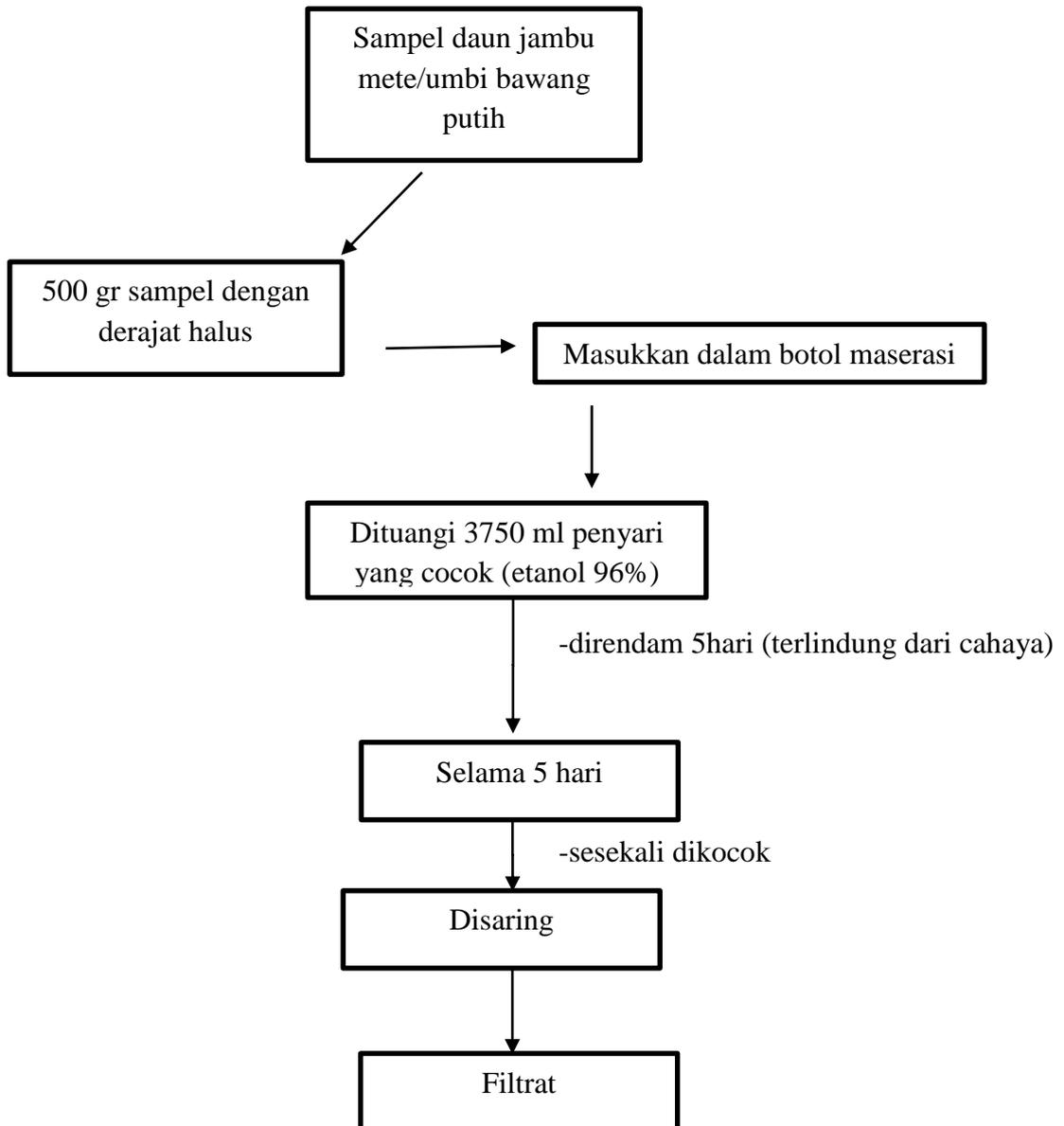
Gambar 3. Skema jalannya penelitian.



Gambar 4. Skema pengujian antibakteri dengan metode difusi terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361



Gambar 5. Skema uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L) dan bawang putih (*Allium sativum* L) secara dilusi



Disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 65°C

Gambar 6. Skema jalannya metode maserasi