

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.) dan bonggol pisang kepok kuning (*Musa paradisiaca* L.) diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Desember 2018.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.) yang diambil dari daun yang berwarna hijau dan diambil secara acak pada beberapa tanaman. Bonggol pisang kepok kuning (*Musa paradisiaca* L.) yang diambil adalah bonggol atau tunas yang berwarna coklat dan tidak busuk.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.) dan ekstrak bonggol pisang kepok kuning (*Musa paradisiaca* L.) yang sebelumnya sudah dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol dengan metode dilusi terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2. Klasifikasi Variabel Utama

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

2.1 Variabel bebas. Variabel yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja di ubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.) dan bonggol pisang kepok kuning (*Musa paradisiaca* L.) dengan perbandingan kombinasi 1:1; 1:3; 3:1.

2.2 Variabel kendali. Variabel kendali 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 kendali dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kana merah dan ekstrak bonggol pisang kepok kuning, kemurnian bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, kondisi laboratorium (meliputi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril dan media yang digunakan dalam penelitian ini).

2.3 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas kombinasi ekstrak daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.) dan bonggol pisang kepok kuning (*Musa paradisiaca* L.) yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dari *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada media uji, yang dilihat dari nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.) dan bonggol pisang kepok kuning (*Musa paradisiaca* L.) dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.) dan bonggol pisang kepok kuning (*Musa paradisiaca* L.) dibersihkan dan dipotong-potong kemudian dikeringkan dalam alat pengering (oven) pada suhu 45° C, setelah kering di buat serbuk dengan alat penyerbukan dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak daun kana merah adalah hasil dari maserasi 500 gram serbuk daun kana merah dengan pelarut etanol 96%.

Keempat, ekstrak bonggol pisang kepok kuning adalah hasil maserasi 500 gram serbuk bonggol pisang kepok kuning dengan pelarut etanol 96%.

Kelima, kombinasi ekstrak daun kana merah dengan bonggol pisang kepok 1:1 adalah hasil dari ekstrak etanol daun kana merah sebanyak 2 gram : ekstrak etanol bonggol pisang kepok sebanyak 2 gram dengan pelarut etanol 96%.

Keenam, kombinasi ekstrak daun kana merah dengan bonggol pisang kepok 1:3 adalah hasil dari ekstrak etanol daun kana merah sebanyak 1 gram : ekstrak etanol bonggol pisang kepok sebanyak 3 gram dengan pelarut etanol 96%.

Ketujuh, kombinasi ekstrak daun kana merah dengan bonggol pisang kepok 3:1 adalah hasil dari ekstrak daun kana merah sebanyak 3 gram : ekstrak etanol bonggol pisang kepok sebanyak 1 gram dengan pelarut etanol 96%.

Kedelapan, bakteri uji dari penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang diambil dari Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

Kesembilan, penentuan aktivitas antibakteri adalah dengan cara metode dilusi, pengujiannya dengan membuat konsentrasi ekstrak tunggal daun kana merah dan ekstrak tunggal bonggol pisang kepok dan kombinasi ekstrak etanol daun kana merah dan bonggol pisang kepok dengan perbandingan kombinasi (1:1); (1:3); (3:1) yang diinkubasi dengan suhu 37° C selama 24 jam kemudian diamati dengan melihat tahap kekeruhan.

Kesepuluh, uji aktivitas antibakteri adalah uji dengan menggunakan metode dilusi. Metode dilusi berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi yaitu konsentrasi yang digunakan adalah kontrol 100% 50% 25% 12,5% 6,25% 3,12% 1,56% 0,78% 0,39% 0,19% 0,09%.

Kesebelas, nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) ditentukan dengan mengamati konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan kejernihan. Penentuan nilai KBM (Konsentrasi

Bunuh Minimum) merupakan konsentrasi terendah yang dapat membunuh bakteri dengan mengamati pertumbuhan bakteri pada medium, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37° C yang ditandai ada tidaknya pertumbuhan bakteri.

Kedua belas, dosis efektif adalah konsentrasi paling rendah yang dapat membunuh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat penyerbuk, timbangan analitik, oven, ayakan nomor 40, bejana maserasi, inkas, jarum ose, cawan porselin, erlemeyer, tabung reaksi, gelas ukur, pipet tetes, pipet volume, corong kaca, kain flannel, *wather bath*, lampu spiritus, *autoclave*, *moisture balance*, *rotary evaporator*, inkubator, mikropipet dan Silika gel GF₂₅₄.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.) dan bonggol pisang kepok kuning (*Musa paradisiaca* L.), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, etanol 96%, media BHI (*Brain Heart Infusion*), media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*), pereaksi sitroborat, pereaksi Dragendorf, pereaksi Liberman burchardat, FeCl₃ 1%, DMSO (Dimethyl sulfoxide), reagen Erlich, asam sulfat padat, asam asetat pekat, etil asetat, toluene, asam formiat, dietil amin, kloroform, methanol dan formalin.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Tanaman

Tahapan pertama penelitian adalah dengan mencocokkan ciri morfologi yang ada pada daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.) dan bonggol pisang kepok kuning (*Musa paradisiaca* L.) dengan acuan buku serta dibuktikan di bagian Laboratorium Biologi Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret.

Identifikasi ini bertujuan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya dengan tanaman lain.

2. Pengambilan Bahan

Daun kana merah dan bonggol pisang kepok diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Desember 2018.

3. Pembuatan Serbuk

3.1 Daun kana merah. Daun kana merah dicuci bersih terlebih dahulu dengan air mengalir sampai terbebas dari kotoran dan debu, dan daun kana merah yang sudah bersih serta dipotong-potong kemudian ditimbang, setelah itu dikeringkan dengan cara di oven selama kurang lebih 5 hari pada suhu 45° C. Daun kana merah yang sudah kering ditimbang dan diserbukan dengan alat penyerbuk kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 sehingga diperoleh serbuk daun kana merah yang mempunyai derajat kehalusan yang lebih homogen. Pembuatan serbuk bertujuan agar luas partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sampai penyarian berlangsung secara efektif.

3.2 Bonggol pisang kepok. Bonggol pisang kepok dicuci bersih terlebih dahulu dengan air mengalir sampai terbebas dari kotoran dan debu, dan bonggol pisang kepok yang sudah bersih serta dipotong-potong kemudian ditimbang, setelah itu dikeringkan dengan cara di oven selama kurang lebih 5 hari pada suhu 45° C. Bonggol pisang kepok yang sudah kering ditimbang kemudian diserbukan dengan alat penyerbuk setelah itu diayak dengan ayakan nomor 40. Pembuatan serbuk bertujuan agar luas partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sampai penyarian berlangsung secara efektif.

4. Kadar Lembab Serbuk

Penetapan kadar lembab daun kana merah dan bonggol pisang kepok menggunakan alat *moisture analyzer balance*. Suhu yang digunakan adalah 95° C dan waktu pengeringan secara manual yaitu 15 menit kemudian ditimbang pada neraca timbangan, masing-masing serbuk daun kana merah dan

bonggol pisang kepok. Kemudian ditunggu sampai alat *moisture analyzer balance* berbunyi yang menandakan hasil analisa telah selesai, dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Kadar air akan memenuhi syarat apabila kadar air suatu serbuk simplisia tidak lebih dari 10% (Depkes RI 2000).

1. Pembuatan Ekstrak Etanol

5.1 Ekstrak daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.). Serbuk daun kana merah sebanyak 500 gram dimasukkan kedalam botol maserasi dengan 3750 ml pelarut etanol 96% dengan perbandingan 10:75, yaitu 10 bagian simplisia dimasukkan dalam 75 bagian cairan penyari, kemudian dicampurkan diamkan selama 5 hari dan sesekali digojok. Setelah 5 hari ekstrak yang didapatkan disaring, ampasnya diperas dan ditambahkan cairan penyari secukupnya dan diaduk. Setelah itu disaring lagi dengan menggunakan 25 bagian cairan penyari atau hingga diperoleh sari sebanyak 100 bagian. Sari yang diperoleh ditutup dan disimpan pada tempat yang terlindung dari cahaya selama 2 hari, endapan yang diperoleh dipisahkan. Filtratnya dipekatkan dengan alat *Rotary evaporator* dengan suhu 65° C.

5.2 Ekstrak bonggol pisang kepok (*Musa paradisiaca* L.). Serbuk bonggol pisang kepok sebanyak 500 gram dimasukkan kedalam botol maserasi dengan 3750 ml pelarut etanol 96% dengan perbandingan 10:75, yaitu 10 bagian simplisia dimasukkan dalam 75 bagian cairan penyari, kemudian dicampurkan diamkan selama 5 hari dan sesekali digojok. Setelah 5 hari ekstrak yang didapatkan disaring, ampasnya diperas dan ditambahkan cairan penyari secukupnya dan diaduk. Setelah itu disaring lagi dengan menggunakan 25 bagian cairan penyari atau hingga diperoleh sari sebanyak 100 bagian. Sari yang diperoleh ditutup dan disimpan pada tempat yang terlindung dari cahaya selama 2 hari, endapan yang diperoleh dipisahkan. Filtrannya dipekatkan dengan alat *Rotary evaporator* dengan suhu 65° C.

2. Tes Bebas Etanol Daun Kana Merah dan Bonggol Pisang Kepok

Ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat pekat dan asam sulfat padat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol ditandai dengan tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol.

3. Identifikasi Kandungan Kimia

Identifikasi kandungan kimia dimaksud untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam daun kana merah dan bonggol pisang kepok. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin dibuktikan di Laboratorium Farmasi Universitas Setia Budi.

7.1 Identifikasi Flavonoid. Sebanyak 500 mg ekstrak dicampurkan dengan aquadestilata. Setelah itu, didihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 0,5 mg bubuk Mg dan ditambahkan 1 ml HCl. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua (magenta) dalam waktu 3 menit (Alamsyah 2014). Identifikasi senyawa dengan KLT dilakukan dengan cara sampel ditimbang 20 mg dilarutkan dalam etanol 1 ml, totolkan pada Silika gel GF₂₅₄ sebanyak 5 mikro dengan mikropipet. Elusi dengan fase gerak etil asetat : asam formiat : asam asetat glacial : air (100:11:11: 27) sampai batas (Hendra 2015). Elusi hingga kurang lebih 8 cm dari penotolan. Setelah sampai batas, kemudian dikeringkan, kemudian semprot dengan Sitroborat. Setelah disemprot, disinari dengan sinar tampak berfluresensi menimbulkan warna hijau tua kehitaman (Pramono, 1989).

7.2 Identifikasi alkaloid. Sebanyak 500 mg ekstrak dilarutkan dengan aquadestilata. Setelah itu ditambahkan 1 ml HCl 2N dibuat dalam 2 tabung. Tabung 1 ditambahkan reagen *Mayer* yang kemudian akan membentuk endapan menggumpal putih kekuningan. Tabung 2 ditambah reagen *Dragendroff* terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga. Identifikasi senyawa dengan KLT dilakukan dengan cara sampel ditimbang 20 mg dilarutkan dalam etanol 1 ml, totolkan pada Silika gel GF₂₅₄ sebanyak 5 mikro dengan mikropipet. Elusi dengan fase gerak toluene: etil asetat: dietil amin

(7:2:1) sampai batas (Hendra 2015). Elusi hingga kurang lebih 8 cm dari penotolan. Setelah sampai batas, kemudian dikeringkan, kemudian semprot dengan Dragondraf. Setelah disemprot, disinari dengan sinar tampak berfluresensi menimbulkan warna jingga (Depkes RI 1989).

7.3 Identifikasi saponin. Sebanyak 500 mg ekstrak ditambahkan aquadestilata, kemudian dididihkan selama 2-3 menit. Setelah dipanaskan tunggu sampai dingin lalu kocok dengan kuat. Kemudian ditambahkan 2 tetes HCl 2N. Apabila masih terbentuk buih yang stabil, maka sampel positif mengandung saponin. Identifikasi senyawa dengan KLT dilakukan dengan cara sampel ditimbang 20 mg dilarutkan dalam etanol 1 ml, totolkan pada Silika gel GF₂₅₄ sebanyak 5 mikro dengan mikropipet. Kemudian elusi dengan fase gerak kloroform: metanol: air (64:50:1) sampai batas (Tusanti *et al.* 2014). Elusi hingga kurang lebih 8 cm dari penotolan. Setelah sampai batas, kemudian dikeringkan, kemudian semprot dengan Liberman Bourchat. Setelah disemprot, disinari dengan sinar tampak berwarna merah jambu sampai ungu (Santos *et al.* 1978).

7.4 Identifikasi tanin. Sebanyak 500 mg ekstrak ditambahkan aquadestilata sampai terendam dan dipanaskan selama 3-5 menit. Kemudian direaksikan dengan menambahkan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan. Identifikasi senyawa dengan KLT dilakukan dengan cara sampel ditimbang 20 mg dilarutkan dalam etanol 1 ml, totolkan pada Silika gel GF₂₅₄ sebanyak 5 mikro dengan mikropipet. Elusi dengan fase gerak etil asetat: asam formiat: toluene: air (6:1,5:3:0,5) sampai batas (Wagner & Bladt 2009). Elusi hingga kurang lebih 8 cm dari penotolan. Setelah sampai batas, kemudian dikeringkan, kemudian semprot dengan FeCl₃ 1%. Setelah disemprot, disinari dengan sinar tampak berwarna hijau tua kehitaman (Pasto *et al.* 1979).

8 Sterilisasi

Sterilisasi inkas dengan menggunakan formalin, media yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan *autoclave* pada suhu 121° C selama 15

menit. Gelas ukur dan *beaker glass* disterilkan dengan oven pada suhu 170-180° C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung (Denyer 2004).

9. Identifikasi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

9.1 Isolasi pada media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA). Dengan cawan tuang, bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* diinokulasi pada media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) dan diinokulasi selama 24-28 jam pada suhu 37° C. Hasil isolasi pada media PSA menunjukkan hasil positif adanya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* jika membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen berwarna kehijauan (Jawetz *et al.* 2007).

9.2 Identifikasi biokimia *Pseudomonas aeruginosa*.

Media SIM. Cara identifikasi dengan biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara tusukan kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Hasil uji sulfida (-) untuk *Pseudomonas aeruginosa* yaitu tidak terdapat warna hitam pada media, uji indol (-) yaitu tidak terbentuk cincin merah pada bagian atasnya setelah ditambahkan dengan reagen Erlich, uji motilitas (+) yaitu ditandai dengan adanya pertumbuhan dan kekeruhan bakteri pada media.

Media KIA. Cara identifikasi dengan biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diinokulasi 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. Hasil K/KS⁻ untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah bagian lereng berwarna merah ditulis K, bagian dasar berwarna merah ditulis K, sulfida negatif yaitu tidak terbentuk warna hitam pada media yang ditulis S⁻.

Media LIA. Cara identifikasi dengan biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Hasil K/KS⁻ untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah bagian lereng berwarna ungu ditulis K, bagian dasar berwarna ungu ditulis K, sulfida negatif yaitu tidak terbentuk warna hitam pada media yang ditulis S⁻.

Media Citrate. Cara identifikasi yaitu dengan biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian di inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Hasil positif media berwarna hijau berubah menjadi warna biru.

10. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembiakan bakteri diambil sebanyak 1-2 ose dan ditanam pada medium *Brain Heart Infusion* (BHI) cair dan dihomogenkan. Kekeruhan disesuaikan dengan kekeruhan *Mc Farland* 0,5 yang dianggap setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ ml bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

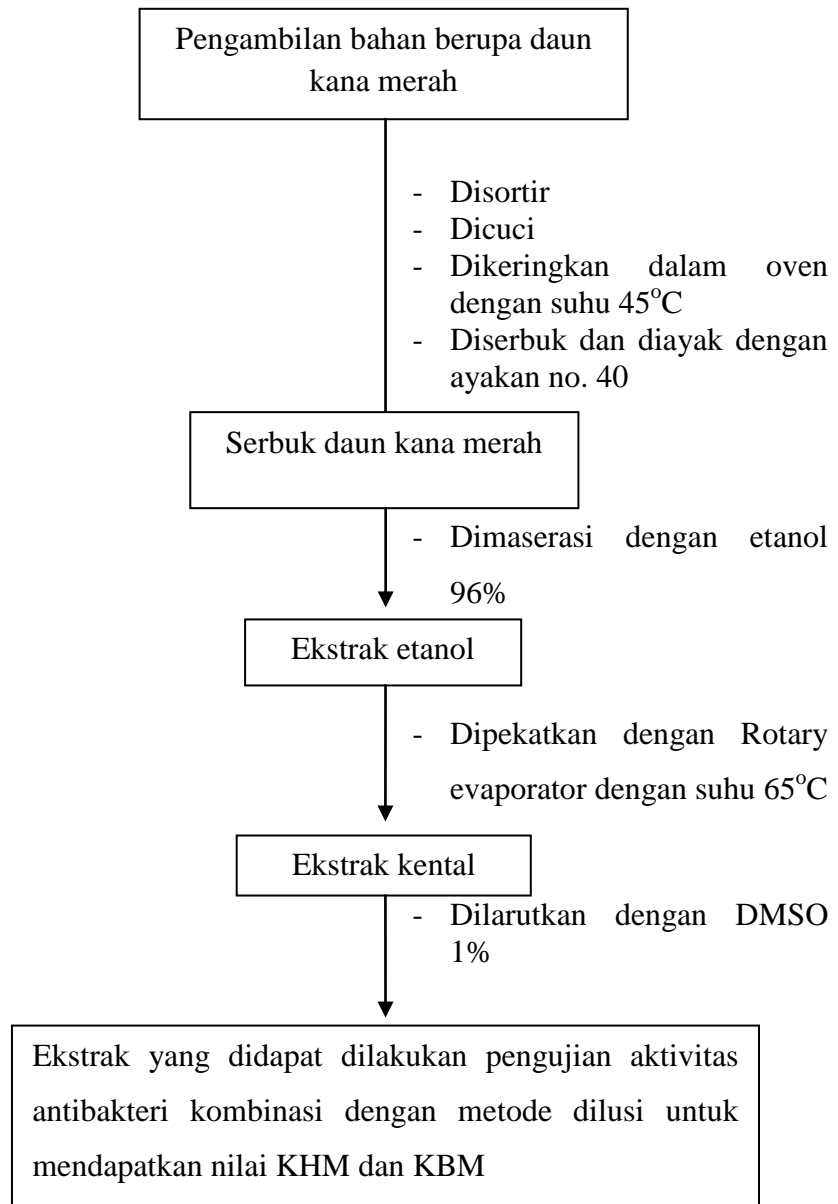
11. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Ekstrak daun kana merah dan bonggol pisang kepok diperoleh melalui ekstraksi secara maserasi diuji secara mikrobiologi dengan bakteri uji yaitu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Metode yang digunakan adalah metode dilusi yang bertujuan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 12 tabung steril. Konsentrasi larutan stok yaitu 100% yaitu 100 gram ekstrak kemudian diencerkan dengan DMSO 1% sebanyak 100 ml. Konsentrasi pada metode dilusi menggunakan seri pengenceran 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%. Tabung pertama sebagai kontrol negatif yang berisi larutan kombinasi ekstrak etanol daun kana merah dan bonggol pisang kepok. Tabung terakhir sebagai kontrol positif yang berisi suspensi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

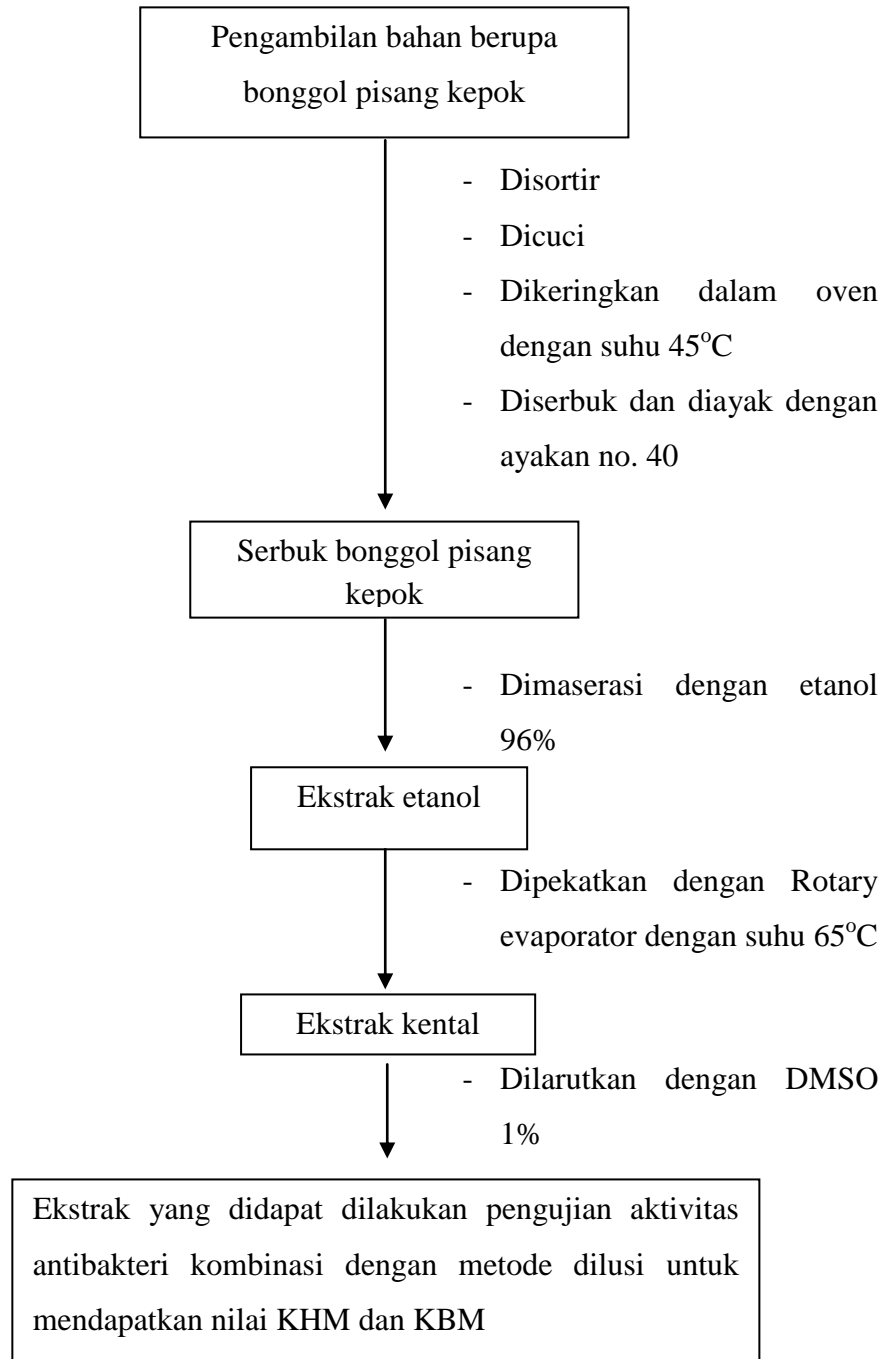
Medium BHI dimasukkan ke dalam masing-masing tabung uji sebanyak 0,5 ml pada tabung ke 2 sampai tabung ke 12. Untuk tabung pertama diberi larutan ekstrak sebanyak 1 ml dan larutan ekstrak sebanyak 0,5 pada tabung ke 2. Pipet sebanyak 0,5 ml dari tabung 2 dan dimasukkan ke dalam tabung 3 dan dihomogenkan, perlakuan tersebut dilakukan sampai tabung ke 12 selanjutnya pada tabung ke 12 dibuang 0,5 ml. Suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dimasukkan ke dalam tabung 2 sampai tabung ke 12 sebanyak 0,5 ml. Tabung

ke 13 berisi suspensi bakteri sebanyak 1 ml. Tabung ke 2 sampai ke 12 diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam, kemudian diamati kekeruhannya untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan cara tabung uji yang menunjukkan jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif. Kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Dilakukan pengamatan ada tidaknya koloni yang timbul pada permukaan media lempeng. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

E. Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kana Merah (*Canna coccinea* Mill.)

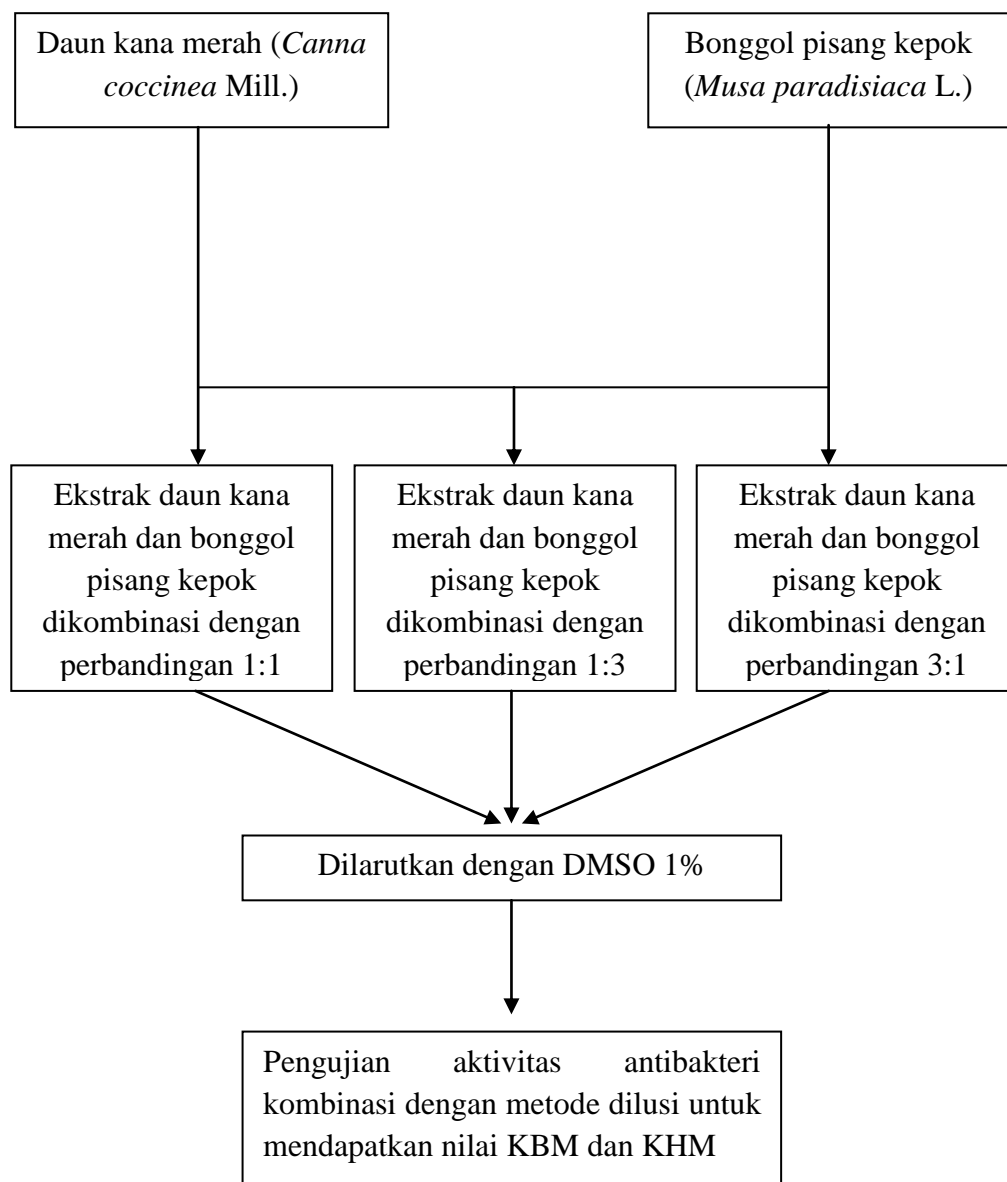


Gambar 3. Skema Pembuatan ekstrak etanol daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.)

F. Skema pembuatan ekstrak etanol bonggol pisang kepok*(Musa paradisiaca L.)*

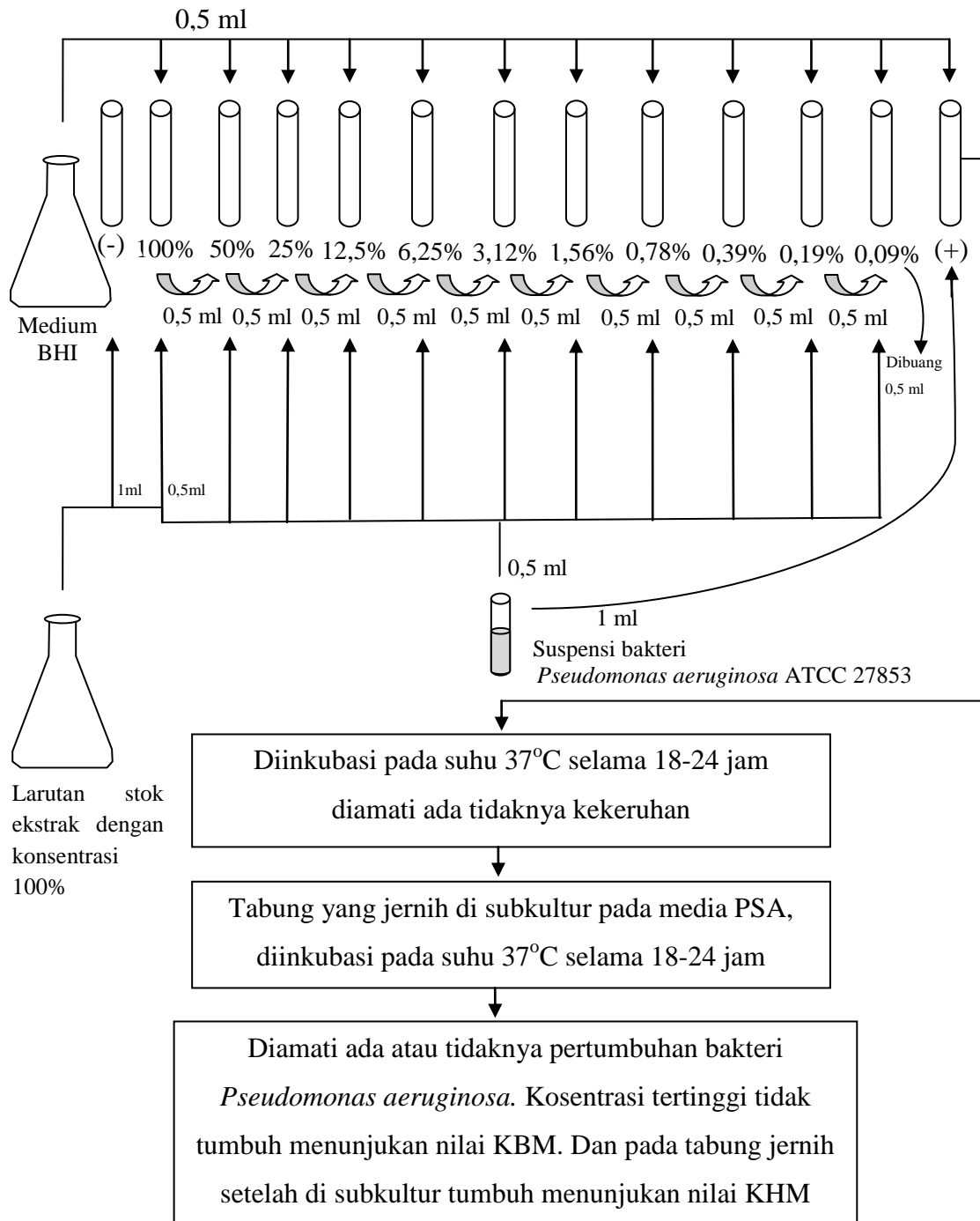
Gambar 4. Skema Pembuatan ekstrak etanol bonggol pisang kepok (*Musa paradisiaca L.*)

G. Skema pembuatan kombinasi ekstrak etanol daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.) dan bonggol pisang kepok (*Musa paradisiaca* L.)



Gambar 5. Skema pembuatan kombinasi ekstrak etanol daun kana merah (*Canna coccinea* Mill.) dan bonggol pisang kapok (*Musa paradisiaca* L.)

H. Uji Dilusi



Gambar 6. Skema pengujian aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak daun kana merah dan bonggol pisang kepok terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.