

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah dari daun tanaman pangi (*Pangium edule* Reinw) yang diperoleh dari Desa Kapataran, Kecamatan Lembean Timur, Kabupaten Minahasa, Provinsi Sulawesi Utara.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah daun pangi, yang berwarna hijau tua, berbentuk bulat telur, permukaan daun bagian atas halus dan mengkilat, serta permukaan bawahnya memiliki rambut coklat dan urat daun yang berjarak dekat. Sampel diperoleh dari Desa Kapataran, Kecamatan Lembean Timur, Kabupaten Minahasa, Provinsi Sulawesi Utara pada September 2022.

B. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang dapat diubah dan mempengaruhi variabel terikat. Variabel bebas penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak dan fraksi daun pangi.

2. Variabel terikat

Variabel dependen adalah variabel yang dapat berubah dan dipengaruhi oleh variabel independen. Variabel terikat penelitian ini adalah penghambatan pertumbuhan *Salmonella typhi* ATCC 11331 yang diperoleh dari biakan laboratorium.

3. Definisi operasional variabel

Pertama, daun tanaman pangi ialah tanaman yang memiliki ciri daun berwarna hijau muda, berbulu tipis dan halus yang diperoleh dari Desa Kapataran, Kecamatan Lembean Timur, Kabupaten Minahasa, Provinsi Sulawesi Utara.

Kedua, serbuk daun pangi adalah daun muda berwarna hijau dengan diambil lalu dicuci dengan air mengalir, setelah itu dikering anginkan, setelah kering daun dijadikan serbuk serta diayak dengan ukuran ayakan no. 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun pangi adalah ekstrak yang berasal dari serbuk yang sudah disiapkan diekstraksi dengan metode maserasi memakai pelarut 96% kemudian diuapkan pelarutnya.

Keempat, fraksi daun pangi adalah ekstrak yang disiapkan kemudian di fraksinasi dengan metode cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana kemudian hasil residu difraksinasi lagi, dengan pelarut etil asetat, sehingga diperoleh fraksi air, kemudian hasil yang didapat diuapkan untuk mendapatkan fraksi kental.

Kelima, identifikasi senyawa adalah untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam serbuk dan ekstrak yang meliputi, alkaloid, tanin, flavonoid, saponin, steroid, triterpenoid, susut pengeringan, dan kadar air.

Keenam, bakteri uji pada penelitian ini adalah *Salmonella typhi* yang didapat dari laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Ketujuh, uji aktivitas antibakteri merupakan uji menggunakan metode difusi cakram dengan sampel konsentrasi 4%, 6%, 8%, kontrol positif, dan kontrol negatif.

Kedelapan, diameter zona hambat adalah zona bening yang terbentuk di sekitar lempeng yang disebabkan oleh pertumbuhan bakteri uji yang dihambat oleh sampel uji.

C. Alat dan bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah evaporator, perkolator, oven, neraca analitik, ayakan mesh 40, seperangkat alat gelas kaca, pipet ukur, *cotton buds*, *stick*, cawan petri, bunsen, *canister*, tabung reaksi, tabung reaksi, ose jarum, kaca slide, mikroskop, oven, autoklaf, inkubator, penggaris, dan alat pelindung lengkap.

2. Bahan

2.1. Sampel. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pangi yang diperoleh dari Desa Kapataran, Kecamatan Lembean Timur, Kabupaten Minahasa, Provinsi Sulawesi Utara.

2.2. Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Salmonella typhi* ATCC 11331 yang diambil dari biakan murni bakteri *Salmonella typhi* ATCC 11331 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2.3. Media. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah MHA, NA, dan SSA.

2.4. Bahan lain. Bahan kimia yang digunakan antara lain pelarut etanol 96%, xylem, akuades, pewarna Gram (cat kristal violet, lugol iodine, alkohol acetone, dan cat safranin), H₂O₂ 3%, kloramfenikol, HCl 2N, HCl pekat, CH₃COOH, H₂SO₄ pekat, pereaksi Dragendrof, serbuk Zn, FeCl₃ 1%, kloroform, plasma citrat, kalium tellurite, HCl 2%, etanol-asam klorida, amil alkohol, asam asetat anhidrat, DMSO 2%, cakram, dan standar Mc. Farland 1x10⁸ CFU/ml.

D. Jalannya penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian adalah identifikasi tumbuhan, yang dilakukan untuk menentukan kebenaran tumbuhan yang dilihat dari ciri-ciri morfologi tumbuhan pangi seperti yang dilaporkan dalam literatur dan dilakukan di Universitas Setia Budi.

2. Pembuatan serbuk daun pangi

Daun pangi 20 kg dicuci dengan air mengalir sampai bersih, kemudian tiriskan di wadah yang kering. Daun disortasi basah dan dirajang, setelah itu dikering anginkan di tempat yang terhindar dari sinar matahari selama empat hari, lalu di oven dengan suhu 50°C selama 48 jam kemudian dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan ukuran mesh nomor 40 (Jacklin, 2019).

3. Penentuan susut pengeringan serbuk daun pangi

Penetapan susut pengeringan serbuk daun pangi dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Alat dihidupkan kemudian ditempatkan *aluminium plat* ke dalam alat dan tekan tombol tare, kemudian menimbang serbuk 2g, kemudian serbuk diratakan diatas *aluminium plat* suhu diatur sebesar 105°C, tutup alat dan tekan tombol start, pemeriksaan berakhir dengan ditandai bunyi sekali. Catat angka yang tertera pada display dalam satuan persen. Syarat kelembaban terhadap serbuk ≤ 10% (Kemenkes, 2013).

$$\text{Susut pengeringan serbuk} = \frac{\text{Bobot sebelum kering (g)} - \text{Bobot setelah kering (g)}}{\text{Bobot sebelum kering (g)}} \times 100\%$$

4. Pembuatan ekstrak daun pangi

Perendaman dilakukan dengan memasukkan 40 g serbuk daun pangi ke dalam botol gelap dan menambahkan 400 mL pelarut etanol 96%. Rendam selama 6 jam pertama, aduk sesekali, diamkan selama 18

jam, lalu saring melalui kain tipis dan kemudian melalui kertas saring. Residu direndam kembali dan dilakukan remaserasi. Filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Rendemen ekstrak etanol 96% dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

5. Uji bebas etanol ekstrak daun pangi

Ekstrak yang telah pekat diuji sudah bebas etanol atau belum dengan cara uji esterifikasi, yaitu ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol jika tidak terbentuk bau ester (Anggraini, 2017).

6. Identifikasi senyawa serbuk dan ekstrak

6.1. Alkaloid. Sampel larutan 2 mL ditambah 5 tetes reagen Dragendorff, jika terbentuk endapan jingga maka positif alkaloid (Ergina *et al.*, 2014).

6.2. Tanin. Sampel larutan dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah 2 hingga 3 tetes FeCl₃ 1%, positif tanin akan menghasilkan larutan hijau kehitaman atau biru tua (Simaremare, 2014).

6.3. Flavonoid. Sampel larutan 2 mL ditambah 2 mL etanol 96%, 0,05 g Zn serbuk dan 2 mL HCl 2N. Larutan didiamkan 1 menit, lalu ditambah 2 mL HCl pekat. Hasil positif terbentuk warna merah-jingga (Rumagit *et al.*, 2015).

6.4. Saponin. Sampel larutan 2 mL ditambah 10 mL akuadest panas dalam tabung reaksi. Dikocok kuat 10 detik, kemudian ditambah beberapa tetes HCl 2N. Hasil positif jika terbentuk busa stabil (Lanisthi *et al.*, 2015).

6.5. Steroid dan triterpenoid. Sampel larutan 2 mL ditambahkan CH₃COOH glasial 10 tetes dan H₂SO₄ pekat 2 tetes. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit, adanya steroid ditunjukkan warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu (Lanisthi *et al.*, 2015).

7. Susut pengeringan ekstrak daun pangi

Penentuan susut pengeringan ditentukan dengan *moisture balance* pada suhu 105⁰C timbang 2 g dimasukkan ke dalam alat serta tunggu 4-5 menit hingga hasilnya pengukuran muncul untuk setiap pengukuran. Susut pengeringan yang baik tidak melebihi 10%.

$$\text{Susut pengeringan ekstrak} = \frac{\text{Bobot sebelum kering (g)} - \text{Bobot setelah kering (g)}}{\text{Bobot sebelum kering (g)}} \times 100\%$$

8. Kadar air ekstrak daun pangi

Kadar air ekstrak diuji dengan metode gravimetri oven. Mula-mula masukkan 10 g ekstrak ke dalam krus, lalu panaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam dan timbang. Panaskan dalam oven selama 1 jam, hingga selisih antara dua penimbangan berturut-turut <0,25% (Departemen Kesehatan RI, 2017).

9. Prosedur fraksinasi.

Ekstrak etanol 96% dilarutkan dalam air hingga volume 30 mL dan diaduk hingga semua larut, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana dengan perbandingan 1:2. Hasil fraksi *n*-heksana disimpan dan residu difraksinasi menggunakan etil asetat. Campuran dikocok dan dibiarkan membentuk 2 lapisan yaitu lapisan air dan lapisan etil asetat, kedua lapisan dipisahkan dan fraksi air diuapkan dalam penangas air. Fraksi diuapkan dengan *rotary evaporator*, fraksi ditimbang dan dihitung nilai rendemennya.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot fraksi yang didapat}}{\text{Bobot ekstrak yang difraksinasi}} \times 100\%$$

10. Sterilisasi

Media disterilkan dalam autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat kaca disterilkan dalam oven pada suhu 170-180 °C selama 2 jam, sedangkan alat seperti loop jarum disterilkan dengan cara dibakar dengan Bunsen, dan tinta disterilkan dengan formalin.

11. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

MHA dimasukkan 28,5 g ke dalam panci dan tambahkan 750 ml air suling, panaskan hingga larut, lalu masukkan ke dalam gelas kimia, tuang 10 mL ke dalam tabung reaksi dan tutupi dengan kapas lalu autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media didinginkan pada suhu ±50°C, kemudian dituang ke dalam cawan petri steril, setelah dingin media menjadi padat, lalu dibungkus dengan kertas dan disimpan dalam lemari es (Astutik, 2018).

12. Pembuatan media *Brain Heart Infusion* (BHI)

BHI dimasukkan 1,85 g ke dalam panci dan tambahkan 50 ml air suling dan panaskan, lalu masukkan ke dalam gelas kimia lalu tuangkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 5 mL, lalu ditutup dengan kapas dan dituangkan untuk disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C

selama 15 menit, saat dibungkus dengan kertas dan didinginkan dalam lemari pendingin (Astutik, 2018).

13. Pembuatan media *salmonella-shigella* agar (SSA)

Larutan SSA dan akuadest dicampur secara homogen dalam Erlenmeyer. Larutan dipanaskan di atas kompor listrik sampai homogen. Ukur larutan dengan pH meter (pH SSA adalah $7\pm 0,2$). Media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 15-20 mL bersamaan dengan proses fiksasi (Ageha, 2011).

14. Identifikasi bakteri *Salmonella typhi*

14.1. Isolasi *Salmonella typhi* ATCC 11331 pada media selektif SSA. Media SSA supernatan diisolasi melalui 1 loop dari kultur pengayaan menggunakan metode pelat gores dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Prosedur yang sama diikuti untuk kontrol positif, yaitu kultur murni *Salmonella typhi* ATCC 11331. Hasil pengujian dibandingkan dengan biakan murni. Hasil positif ditandai dengan koloni transparan dan titik hitam (Graciano, 2016).

14.2. Uji biokimia *Salmonella typhi* ATCC 11331. Satu koloni pada media SSA diambil dan digores ke media NA, kemudian difermentasi dengan gula, belerang, indole, dan sitrat. Prosedur yang sama dilakukan untuk kontrol positif. Hasil pengujian dibandingkan dengan hasil pertumbuhan berdasarkan perubahan warna yang terjadi (Graciano, 2016).

15. Pembuatan suspensi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 11331.

Isolat *Salmonella typhi* ATCC 11331 dari media MHA diambil sebanyak 2 ose dan ditempatkan pada media BHI cair, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri diencerkan dengan media BHI segar sampai standar densitas bakteri Mc. Farland 10^8 CFU/mL (Astutik, 2018).

15.1. Uji Fermentasi gula-gula. Uji fermentasi laktosa dilakukan dengan menginokulasi media bakteri pada media manitol dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna media dari merah-jingga menjadi ungu-merah (Graciano, 2016).

15.2. Uji Sulfur, Indol, dan Motility (SIM). Kultur loop diinokulasikan pada media SIM dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif dapat dilihat dari adanya warna hitam pada tempat inokulasi (Graciano, 2016), setelah itu dilakukan inokulasi loop kultur

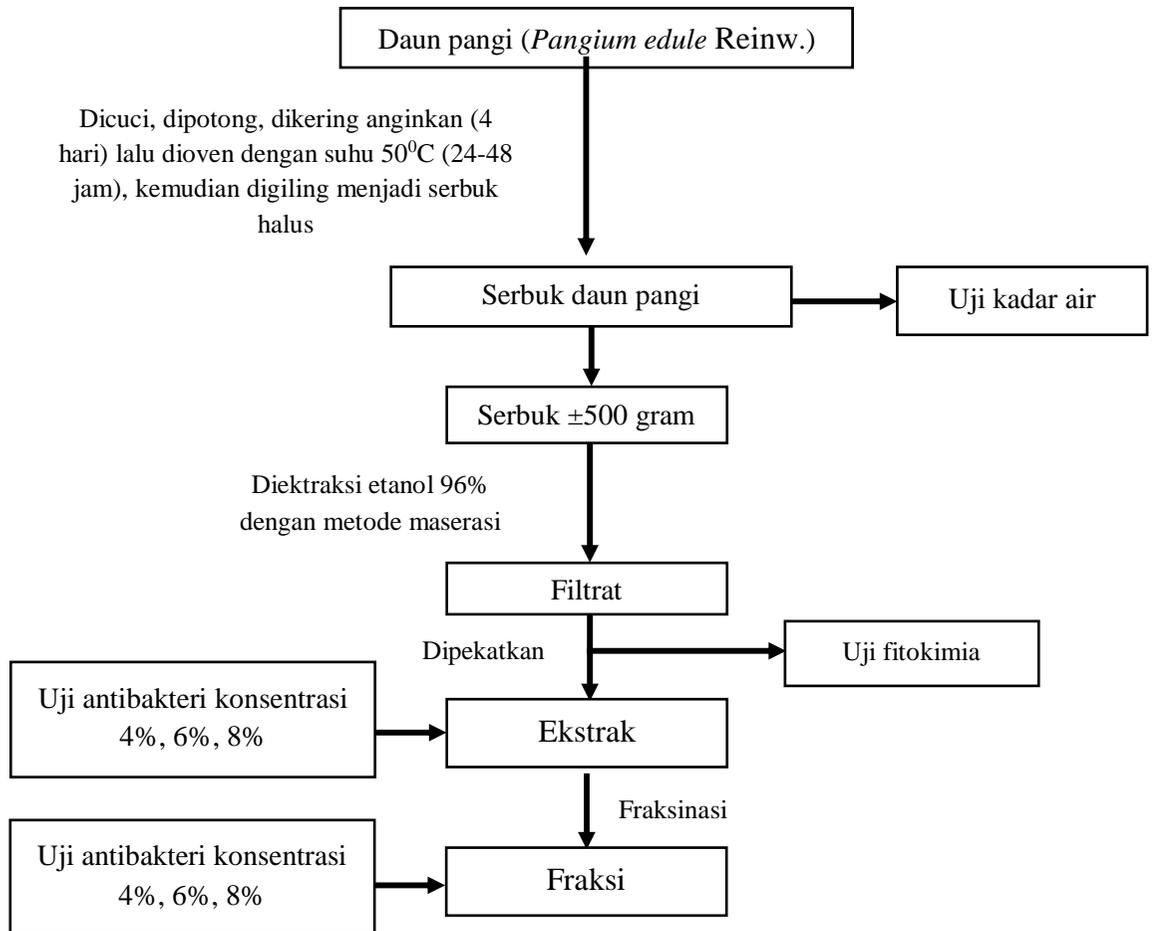
SIM, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian ditambah 1 mL reagen indole (Kovacs) ditambahkan ke kultur, dikocok dan dibiarkan selama beberapa menit. Hasil positif menunjukkan adanya warna merah-keunguan berbentuk cincin pada permukaan kultur (Graciano, 2016).

15.3. Uji sitrat. Loop kultur SIM diinokulasikan pada *Simmon Citrate Agar* dan diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna lingkungan dari hijau menjadi biru (Graciano, 2016).

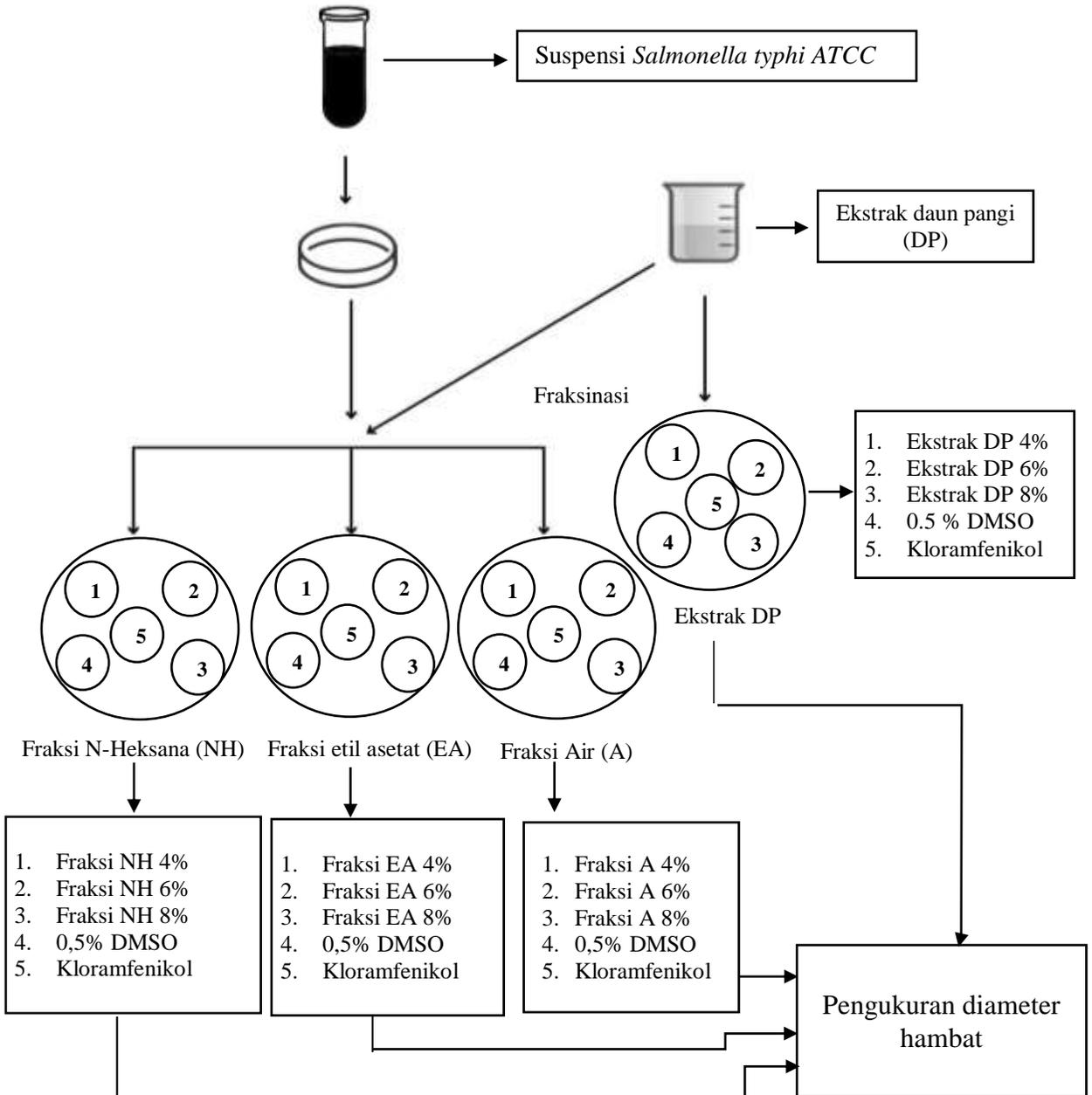
15.4. Uji dekarboksilasi lisin (Media LIA). Kultur bakteri SSA diinokulasikan pada media agar LIA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil positif adalah positif jika terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning setelah 24 jam dan kembali menjadi ungu setelah 38 jam. Perubahan warna menjadi kuning menandakan bakteri dapat menyelesaikan fermentasi dan berubah menjadi ungu menandakan lisin telah terdekarboksilasi.

16. Pengujian aktivitas bakteri

MHA di cawan petri steril yang sudah padat, diusap dengan suspensi bakteri, kemudian didiamkan selama 5 menit, lalu media diberi cakram 6 yang telah di rendam oleh sampel uji . Kontrol positif yaitu cakram kloramfenikol dimasukkan ke dalam media dibagian tengah, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C. Aktivitas anti-bakteri ditunjukkan dengan pembentukan kelompok koloni dalam media uji, Sedangkan hasil aktivitas anti-bakteri ditandai dengan terbentuknya zona beding disekitar cakram.



Gambar 5. Diagram alir uji aktivitas antibakteri daun pangi.



Gambar 6. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram

E. Analisis Hasil

Data uji aktivitas antibakteri *Salmonella typhi* ATCC 11331 dari ekstrak dan fraksi daun pangi dengan metode difusi cakram yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi di uji statistik menggunakan *one way* ANOVA SPSS 26. Uji statistik dan analisis data dilakukan untuk mengetahui perbedaan diameter daya hambat bakteri *Salmonella typhi* ATCC 11331 terhadap ekstrak, fraksi, kontrol positif dan negatif.