

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang diperoleh dari Sragen, Jawa tengah.

Sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang berwarna hijau tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua yang diambil secara acak dari Sragen, Jawa Tengah yang bebas dari penyakit.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama adalah ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang dibuat dengan ekstraksi secara maserasi dengan pelarut etanol 96%.

Variabel utama yang kedua adalah uji aktivitas ekstrak herba daun sukun (*Artocarpus altilis*) terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak herba daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang diuji efektivitasnya terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah mengetahui apa saja kandungan senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*). Variabel tergantung penelitian ini adalah konsentrasi yang efektif dari ekstrak daun sukun untuk menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, ekstraksi yang digunakan berasal dari tanaman daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang masih segar dan berwarna hijau yang dipetik secara langsung dan acak dari daerah Sragen, Jawa Tengah.

Kedua, daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang sudah diambil kemudian dicuci dan ditiriskan lalu dirajang. Daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang sudah dirajang kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 37°C. Daun sukun yang sudah kering kemudian diblender sampai halus dan diayak dengan pengayak no. 40 dan disimpan dalam wadah yang bersih dan tertutup.

Ketiga, serbuk daun sukun tersebut kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Keempat, bakteri uji *Salmonella typhi* yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kelima, Kandungan senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*).

Keenam, konsentrasi yang efektif dari ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*.

Ketujuh, uji aktivitas ekstrak yang digunakan adalah dengan metode difusi cakram dengan mengukur diameter zona hambat disekitar kertas cakram yang sudah diisi dengan sampel.

C. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : ekstrak daun sukun (*Artocarpus artilis*) yang diperoleh dari daerah Sragen, Jawa Tengah. Bakteri uji yang digunakan adalah *Salmonella typhi* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta. Media dan bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah BHI (*Brain Heart Infusion*), media MHA (*Mueller-Hilton Agar*), SSA (*Salmonella Shigella Agar*), LIA (*Lysine Iron Agar*), CITRAT, KIA (*Kliger Iron Agar*), SIM (*Sulfida Indol Motility*). Pelarut etanol 96%, spiritus, Aquadest steril, DMSO 5%, dan standar *Mc Farland 0,5*.

Alat yang digunakan untuk penelitian yaitu : tabung reaksi kecil, beaker glass, ayakan nomor 40, evaporator, oven, blender, kertas saring, batang pengaduk, cawan petri steril, kapas lidi steril, lampu spirtus, label, inkubator, erlenmeyer, ose, penggaris, kertas disk, timbangan elektrik, pipet tetes, korek api, pipet volume, rak pengecatan, gelas objek, autoklaf, mikroskop, boorprof, pinset steril, dan alat pelindung diri (APD) lengkap.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tahapan pertama dalam penelitian ini yaitu dilakukan dengan identifikasi tanaman untuk menghindari kesalahan sampel yang digunakan dalam penelitian dan kemungkinan tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Identifikasi perlu diperhatikan pada ciri-ciri

morfologi tanaman. Tanaman daun sukun diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun sukun (*Artocarpus artilis*) yang berasal dari Sragen, Jawa Tengah yang dipetik secara langsung dan acak dengan memilih daun berwarna hijau. Daun sukun yang sudah dipetik lalu dicuci bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel.

3. Pembuatan Serbuk

Daun sukun yang sudah dibersihkan lalu dirajang dan dikeringkan dengan oven pada suhu 37°C yang bertujuan untuk mengurangi kadar air dan mencegah terjadinya pertumbuhan bakteri dan perubahan kimiawi yang dapat menurunkan kualitas serbuk. Daun sukun yang sudah kering lalu diblender sampai halus dan diayak dengan pengayak no. 40, serbuk disimpan dalam wadah yang bersih dan tertutup.

4. Penetapan Kadar Air Serbuk Daun Sukun

Penetapan kadar air pada daun sukun dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta dengan cara serbuk daun sukun (*Artocarpus artilis*) ditimbang sebanyak 2 gram kemudian diukur kadar airnya dengan menggunakan alat *Moisture balance* sampai alat berbunyi yang menandakan bahwa pengukuran kadar air telah selesai dan tidak boleh lebih dari 10%.

5. Pembuatan ekstrak uji Daun Sukun

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan menimbang 300 gram yang dimasukkan kedalam erlenmeyer lalu ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 : 10. Erlenmeyer ditutup kemudian dikocok dan didiamkan selama 2 hari. Maserat yang didapat disaring dengan cara filtrasi sehingga diperoleh filtrat. Penyarian diulangi satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah pelarut setengah kali dari jumlah pelarut penyarian pertama. Maserat dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan *Rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai memperoleh ekstrak yang kental.

6. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Daun Sukun.

Identifikasi kandungan senyawa kimia bertujuan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat pada daun sukun (*Artocarpus artilis*), antara lain terdapat senyawa alkaloid, flavonoid dan tanin yang dibuktikan melalui Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi Surakarta.

Identifikasi kandungan kimia tersebut meliputi :

6.1 Identifikasi Alkoloid. Sebanyak 500 mg serbuk simplisia dilarutkan dengan aquades. Setelah itu ditambahkan 1 ml HCL 2 N. Dibuat dalam 2 tabung. Tabung 1 ditambahkan reagen Mayer terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan. Tabung 2 ditambahkan reagen dragendroff terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Alamsyah *et al.*, 2014)

6.2 Identifikasi Flavonoid. Sebanyak 5 ml filtrat dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan serbuk magnesium, 10 ml asam hidriklorida pekat. Jika terjadi warna merah jingga sampai merah ungu, menunjukkan adanya flavonoid. Jika terjadi warna kuning jingga menunjukkan flavon,kalkon, daun auron.

6.3 Identifikasi Tanin. Sebanyak 5 ml filtrat dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan besi (III) klorida. Hasil positif fenolik ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau,violet, atau hitam, sedangkan hasil positif tannin ditunjukkan dengan larutan menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman (Farnsworth, 1966)

6.4 Identifikasi Saponin. Sebanyak 500 mg serbuk tambahkan 10 ml air panas, dinginkan dan kemudia kocok kuat-kuat selama 10 detik; terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N, buih tidak hilang (Depkes RI, 1980).

7. Identifikasi Bakteri Uji *Salmonella typhi*.

7.1 Identifikasi dengan goresan. Biakan murni bakteri uji *Salmonella typhi* diambil kemudian dimasukkan kedalam tabung yang berisi BHI (*Brain Heart Infusion*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi bakteri *Salmonella typhi* dilakukan dengan cara bakteri uji diinokulasi pada media SSA (*Salmonella Shigella Agar*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

7.2 Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram *Salmonella typhi* dilakukan dengan pewarnaan bakteri Gram negatif menggunakan Gram A (Cat Kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai pengintensif warna), Gram C (etanol aseton = 1 : 1 sebagai peluntur warna) dan Gram D (Cat safranin sebagai penutup). Identifikasi diawali dengan membuat preparat sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 1 menit. kelebihan pewarna dibuang dengan memiringkan kaca objek diatas bak pewarna. Pewarna Gram B diteteskan sebanyak 2-3 tetes pada preparat dengan memiringkan kaca objek. Cuci dengan gram C setetes

demi setets selama 3 detik atau sampai zat ungu kristal tidak tampak lagi. Tetesi dengan gram D sebanyak 2-3 tetes selama 30 detik, buang kelebihan pewarna lalu bilas dengan air, tiriskan kaca objek dan serap kelebihan air dengan menekan kertas serap di atasnya. Kemudian amati dibawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 100X dan lensa okuler dengan perbesaran 10x

7.3 Identifikasi dengan uji biokimia. Identifikasi dilakukan dengan media KIA, LIA, SIM, CITRAT. Uji pda KIA (*Lysine Iron Agar*), Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk uji fermentasi karbohidrat (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, bagan dasar berwarna kuning, terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya media, sulfida positif terbentuk warna hitam pada media. Pada bagian miring, jika bakteri dapat memfermentasi laktosa dan sukrosa, warna media berubah menjadi kuning (Raihana, 2011)

Uji pada media LIA (*Lysine Iron Agar*), biakan bakteri diinokulasi dengan cara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C. Pengujian biokimia pada media LIA bertujuan untuk menguji lisin dan sulfide. Hasil positif ditandai dengan media berwarna ungu maka ditulis K dan medium berwarna hitam maka ditulis S (+) (Koneman et al. 1983).

Uji pada SIM (*Sulfida Indol Motility*) biakan bakteri diinkolusi dengan cara tusukan dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C. Pengujian pada media SIM bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfide, indol, dan motolitas bakteri. Hasil positif ditandai dengan media berwarna hitam (uji sulfide), terbentuk cincin indol warna merah setelah ditambah reagen erlich (uji indol), dan terjadi pertumbuhan bakteri yang menyebar pada seluruh media (uji motilitas) (Koneman *et al.* 1983).

Uji pada media citrat, biakan bakteri diinokulasi gorsan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Bakteri yang memanfaatkan citrat sebagai sumber karbon akan menghasilkan natrium karbonat yang bersifat alkali, sehingga dengan adanya indikator brom thymol blue

menyebabkan warna biru pada media. Uji positif bila media berwarna biru dan negatif jika media tetap berwarna hijau (Sri, 2016)

8. Pembuatan suspensi bakteri

Suspensi bakteri diambil 2 ose dari biakan murni bakteri *Salmonella typhi* lalu ditanamkan kedalam tabung reaksi yang berisi medium BHI lalu di inkubasi pada suhu 37 °C selama 1 hari kekeruhan antara *Salmonella typhi* yang dikultur dalam medium cair dibandingkan dengan larutan standar McFarland 0,5 setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

9. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sukun.

Metode yang digunakan yaitu difusi. Metode difusi dilakukan dengan menggunakan cawan petri steril yang diisi dengan media *Mullen Hinton Agar* (MHA) sebanyak 25 ml dan meletakkan cakram yang sudah dijenuhkan dengan larutan stok. Pertama dengan penyelupan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat kemudian diinokulasikan kedalam media MHA dengan metode *Spread Plate* dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi kedalam media secara merata. Pada media tersebut dibuat 4 bagian cakram dan 1 bagian sumuran untuk kontrol negatif. Selanjutnya kertas cakram yang telah dijenuhkan dari semua konsentrasi diletakkan pada media MHA yang sudah di olesi bakteri dan diletakkan sesuai dengan bagian masing-masing. Cakram 1 diisi larutan stok ekstrak 50%, cakram 2 diisi larutan stok ekstrak 25%, cakram 3 diisi larutan stok ekstrak 12,5%, kontrol positif antibiotik kloramfenikol, dan kontrol negatif DMSO 5%. Seluruh cawan petri diinkubari pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati diameter terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Zona tidak ditumbuhi bakteri sekitar cakram menandakan adanya daya hambat terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi

E. Analisis Hasil

Data yang diperoleh dari hasil pengujian aktivitas ekstrak daun sukun terhadap *Salmonella typhi* memiliki kandungan senyawa kimia dan memiliki konsentrasi yang efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*.