

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini ialah rimpang dari tanaman alang-alang yang diambil dari persawahan masyarakat di daerah klaten, jawa tengah.

2. Sampel

Sampel adalah bagian dari suatu populasi yang ada atau bagian yang diambil. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang alang-alang (*Imperata cylindrica L*) yang diambil secara acak dengan mengambil rimpang alang-alang segar, berwarna agak putih kekuningan, bebas hama, dan bebas dari penyakit dari alang-alang berdaun hijau yang diperoleh dari persawahan masyarakat klaten.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak 70% dan fraksi n-Heksan, etil asetat, dan air rimpang alang-alang terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat dari ekstrak etanol 70% dan fraksi n-Heksan, etil asetat dan air rimpang alang-alang terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dapat diklasifikasikan sebagai variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas merupakan variabel yang diteliti terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi dari ekstrak etanol 70% dan fraksi n-Heksan, etil asetat dan air rimpang alang-alang terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat dari ekstrak etanol 70% dan dan fraksi n-Heksan, etil asetat dan air rimpang alang-alang terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922., sterilisasi, suhu, kondisi peneliti, kondisi laboratorium, media, dan metode penelitian.

Variabel terkendali adalah variabel yang memiliki pengaruh terhadap variabel tergantung dan variabel terkendali. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% dan fraksi n-Heksan, etil asetat dan air rimpang alang-alang terhadap bakteri *Escherichia coli*, Larutan antibiotik ciprofloxacin, bakteri *E. coli*.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, alang-alang adalah tanaman yang diambil yang diambil secara acak di daerah klaten, wunut, Tulung, Klaten, Jawa Tengah, dengan memilih alang-alang hidup, segar, bebas dari hama, dan penyakit.

Kedua, alang-alang yang digunakan adalah bagian rimpang alang-alang, segar, berwarna putih kekuningan, bebas dari hama dan penyakit.

Ketiga, simplisia adalah rimpang-alang yang telah dikeringkan dengan kadar air kurang dari 10% yang kemudian dihaluskan.

Keempat, maserasi adalah simplisia rimpang alang-alang dengan etanol 70%, hasil maserasi dilakukan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental.

Kelima, fraksinasi adalah proses ekstraksi dengan pelarut non polar n-Heksan, pelarut semi polar etil asetat, dan fraksi air didapatkan dari residu n-Heksan dan etil asetat.

Keenam, KLT adalah uji senyawa awal dengan senyawa pembanding untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam rimpang alang-alang.

Ketujuh, *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah bakteri uji dalam penelitian ini yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi.

Kedelapan, ciprofloxacin adalah kontrol positif dalam penelitian ini yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi.

Kesepuluh, uji aktivitas antibakteri adalah uji dengan metode difusi untuk mengukur diameter zona hambat dari ekstrak etanol 70% dan fraksi n-Heksan, etil asetat dan air rimpang alang-alang (*Imperata cylindrica* L) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan konsentrasi 10%, 15% dan 20%.

Kesebelas, kontrol positif adalah antibiotik ciprofloxacin dan kontrol negatif yang digunakan adalah larutan DMSO 1%.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, botol coklat maserasi, kertas perkamen, kertas saring, kain flanel, rotary evaporator, waterbath, lempeng KLT silika gel 254, chamber, jarum ose steril, cawan petri steril, rak tabung reaksi, inkas, lampu spiritus, botol penampung steril, kapas lidi steril, oven, objek glass, deck glass, timbangan analitik, mikroskop binokuler, pipet volume, pinset, batang pengaduk, penggaris, lemari pendingin, shaker, autoklaf, inkubator, dan alat-alat gelas (pyrex).

2. Bahan

Bahan utama. Ekstrak rimpang alang-alang, fraksi n-heksan ekstrak rimpang alang-alang, fraksi etil asetat ekstrak rimpang alang-alang, fraksi air ekstrak rimpang alang-alang, bakteri *escherichia coli* ATCC 25922. Pelarut. Etanol, aquades, n-heksan, dan etil asetat. Bahan kimia. Larutan *mc. Farland*, reagen untuk pengecatan gram yaitu gram a (kristal violet), gram b (*lugol's iodine*), gram c (aseton: alkohol 95%), gram d (safranin), cakram disk antibiotik. Media. *Endo agar* (EA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), dan *Brain Heart Agar* (BHA)

D. Jalan Penelitian

1. Determinasi alang-alang

Proses identifikasi rimpang alang-alang yaitu membandingkan atau menyamakan rimpang sampel dengan tanaman yang sudah dikenal, proses ini dilakukan di Balai besar penelitian Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Tujuannya menetapkan kebenaran alang-alang yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada kepustakaan.

2. Pembuatan simplisia dan serbuk

Rimpang alang-alang dibersihkan dengan air mengalir hingga bersih kemudian diamkan di dalam wadah agar air nya berkurang, lakukan perajangan, selanjutnya ditimbang, berat yang didapat dicatat. Langkah selanjutnya pengeringan menggunakan oven pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ atau menggunakan sinar matahari ditutup dengan kain hitam. Setelah kering, langkah selanjutnya melakukan sortasi kering, selanjutnya penghalusan menggunakan blender, serbuk disaring supaya mendapatkan partikel serbuk yang sama, serbuk ditimbang simpan di

dalam wadah tertutup dan terhindar dari sinar matahari. Hasil yang diperoleh digunakan untuk skrining fitokimia (Kartika, *et al*, 2020).

3. Pembuatan ekstrak

Farmakope Herbal Indonesia edisi II menyatakan pembuatan ekstrak masukkan satu bagian serbuk kering simplisia ke dalam botol maserasi dan tambahkan 10 bagian pelarut etanol 70% atau 500 gram simplisia : 5 liter etanol 70%. Aduk sesekali selama 6 jam, lalu diamkan selama 18 jam. Lakukan penyaringan menggunakan kain flanel atau kertas saring. Ulangi proses maserasi minimal satu kali dengan jenis pelarut yang sama, volume total pelarut adalah setengah dari volume pelarut pada ekstraksi pertama. Kumpulkan semua maserat, kemudian gunakan alat penguap vakum atau alat penguap tekanan rendah (*Rotary Evaporator*) untuk menguapkan sampai diperoleh ekstrak kental. Hitung rendemen yang diperoleh yaitu persentase berat antara berat (b/b) dan berat serbuk simplisia yang digunakan. Rendemen setidaknya harus memenuhi persyaratan sesuai dengan monografi (Kemenkes RI. 2017).

4. Penetapan susut pengeringan serbuk rimpang alang-alang (*Imperata cylindrica* L).

Penetapan susut pengeringan menggunakan alat *moisture balance*. Proses melakukan susut pengeringan adalah dengan cara timbang 2 gram serbuk dan ekstrak kemudian masukkan kedalam alat atur suhu 105°C, tunggu sampai alat berbunyi yang menandakan hasil telah keluar, proses ini dilakukan sebanyak 3 kali.

5. Penetapan kadar air serbuk

Proses penetapan kadar air menggunakan alat *sterling bidwell*. Cara menetapkan kadar air adalah menimbang 20 gram serbuk, masukkan kedalam labu destilasi kemudian tambahkan pelarut toluen jenuh air kurang dari 200 mL sampai terendam. Rangkaian alat *sterling bidwell* dan dipanaskan menggunakan bunsen. Proses pemanasan dihentikan setelah penampung tidak menetes lagi, langkah selanjutnya adalah melihat volume pada skala alat (Depkes, 2008) ulangi proses ini sampai 3 kali.

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume air}}{\text{Bobot bahan uji}} \times 100\%$$

6. Penetapan kadar air ekstrak

Proses penetapan kadar air menggunakan metode gravimetri. Cara menetapkan kadar air ekstrak adalah panaskan crush kosong

selama 30 menit, dinginkan pada desikator selama 15 menit, selanjutnya menimbang 10 gram ekstrak didalam *Crush* keringkan di dalam oven pada suhu 105°C Selama 5 jam, dinginkan, lakukan penimbangan dan oven kembali. Ulangi proses ini selama 1 jam sampai didapatkan berat konstan tidak lebih dari 0,25% (Depkes Ri., 2017).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Bobot sampel sebelum dikeringkan} - \text{Bobot sampel setelah dikeringkan}}{\text{Bobot sampel sebelum dikeringkan}} \times 100\%$$

7. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol bertujuan untuk apakah ekstrak rimpang alang-alang benar-benar bersih dari etanol, karena etanol memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Uji esterifikasi adalah uji yang digunakan sebagai uji bebas etanol, proses ini dilakukan dengan menambahkan H₂SO₄ dan CH₃COOH kemudian panaskan menggunakan bunsen, ekstrak bebas etanol ditandai dengan tidak adanya bau ester yang menandakan ciri khas etanol (Kurniawati, 2015; Muadifah *et al.*, 2019: 47).

8. Pembuatan fraksi

Setelah diperoleh ekstrak kental selanjutnya melakukan fraksinasi, ekstrak kental ditimbang sebanyak 10 gram dilarutkan dengan etanol 5 ml dan aquades air 70 ml, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambahkan n-Heksan 75 ml didapatkan fraksi n-Heksan lakukan sebanyak tiga kali, fraksi air dimasukkan ke dalam corong pisah ditambahkan etil asetat 75 ml, didapatkan fraksi etil asetat lakukan sebanyak tiga kali, fraksi air didapatkan setelah melakukan kedua fraksi tersebut. Ketiga fraksi tersebut diuapkan di atas *waterbath*.

9. Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis menggunakan indra perasa, pembau, penglihatan pada manusia, pemeriksaan organoleptis meliputi warna, bau, rasa dan bentuk dari serbuk, ekstrak dan fraksi rimpang alang-alang (*Imperata cylindrica* L).

10. Skrining Fitokimia

Senyawa yang diidentifikasi adalah golongan senyawa tanin, flavonoid alkaloid, dan saponin. Proses identifikasi senyawa dilakukan sebagai berikut:

10.1. Uji alkaloid. Timbang 1 gram ekstrak dilarutkan dengan 10 mL kloroform kemudian tambahkan 5 tetes NH₄OH. Saring, filtratnya diambil kemudian masukkan H₂SO₄ 2 M sebanyak 10 tetes. Larutan akan membentuk dua lapisan, lapisan asam akan berada di atas,

lapisan asam dibagi kedalam 2 tabung reaksi, pereaksi dragendorff diteteskan pada tabung pertama. Terbentuknya warna merah atau jingga menunjukkan hasil positif. Pereaksi ditambahkan kedalam tabung reaksi kedua, terbentuknya kabut putih serta terdapat endapan putih menunjukkan hasil positif (Aryani *et al.*, 2020: 22).

10.2. Uji flavonoid. timbang 0,5 gram ekstrak tambahkan 10 ml metanol dan 10 ml aquades kemudian saring. Filtrat ditambahkan 5 ml eter gojok dan diaman, ambil lapisan metanol dan diuapkan pada suhu 40°C selanjutnya larutkan dengan 5 mL etil asetat, tambahkan 1 ml metanol dan 0,1 gram serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat, gojok kuat-kuat dan dibiarkan memisah. Hasil positif ditandai dengan adanya warna merah atau kuning (Aryani *et al.*, 2020: 22).

10.3. Uji saponin. timbang 0,5 gram ekstrak tambahkan 10 ml aquades panas dan didihkan selama 10 menit kemudian saring, gojok kuat-kuat secara vertikal sampai terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil sekitar 10 menit dan tidak hilang ketika ditambahkan 1 tetes HCl (Aryani *et al.*, 2020: 22).

10.4. Uji tanin. timbang 1 gram ekstrak tambahkan 10 ml aquades panas dan didikan selama 10 menit kemudian saring, selanjutnya tambahkan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditandai dengan adanya warna hijau kehitaman (Aryani *et al.*, 2020: 22).

10. Sterilisasi

Sterilisasi instrumen menggunakan panas kering dan panas lembab, dan sterilisasi media menggunakan panas lembab. Sisa pengujian menggunakan panas lembab untuk menonaktifkan mikroorganisme sebelum perawatan, dan kemudian mengolahnya di tempat pembuangan limbah (Kursia *et al.*, 2016: 75).

11. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* (Makroskopis, mikroskopis, dan media biokimia)

11.1. Identifikasi bakteri secara makroskopis. Suspensi bakteri diinokulasi pada media *Endo Agar* (NA) selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C±2°. Hasil positif ditandai dengan penampakan koloni merah dengan logam kilau yang permanen dan warna media merah violet.

11.2. Identifikasi secara mikroskopis. Identifikasi mikroskopis menggunakan pengecatan Gram. Proses melakukan pengecatan gram dilakukan dengan cara, ambil biakan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang menggunakan jarum ose sudah

disterilkan dengan cara dipijarkan pada api bunsen, selanjutnya letakan pada objek gelas yang sudah ditetesi dengan aquades steril dan ratakan jangan sampai menumpuk, keringkan dengan melewati pada api bunsen. Selanjutnya melakukan pewarnaan, langkah pertama menggunakan kristal violet, teteskan 1-3 tetes kemudian diamkan 1-2 menit dan kemudian bilas dengan air mengalir lalu dikeringkan. Langkah kedua menggunakan lugol teteskan dan kemudian bilas dengan air mengalir, keringkan. Langkah ketiga menggunakan alkohol 98%, dialirkan selama 5 detik dan bilas dengan air mengalir. Langkah keempat menggunakan safranin, teteskan safranin dan diamkan selama 1 menit kemudian bilas dengan air mengalir. Setelah selesai dengan pewarnaan selanjutnya melakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10 x 100 kali, hasil positif ditandai dengan koloni bakteri berwarna merah dan berbentuk basil.

11.3. Identifikasi bakteri menggunakan media biokimia.

Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menggunakan berbagai macam media antara lain:

11.3.1. Media SIM (*Sulfida Indol Motility*). biakan kultur bakteri murni diinokulasikan pada permukaan media dengan cara inokulasi tusuk selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil positif sulfida bila berwarna hitam ditulis (S+), hasil positif indol ditandai dengan warna merah setelah penambahan reagen Ehrlich, hasil positif motilitas terjadi pertumbuhan pada seluruh media.

11.3.2. Media KIA (*Kligler Iron Agar*). biakan kultur bakteri murni diinokulasikan pada media dengan cara ditusuk dan digoreskan selanjutnya inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil positif ditandai dengan bagian lereng dasar media akan berwarna merah ditandai dengan (K), bagian dasar berwarna kuning ditandai dengan (A), adanya gas pada media dengan pecahnya media ditandai dengan (G+). Uji menggunakan media KIA bertujuan untuk melihat fermentasi karbohidrat dan sulfida, hasil positif sulfida ditandai dengan warna hitam pada media ditulis (S+).

11.3.3. Media LIA (*Lysin Iron Agar*). biakan kultur bakteri murni diinokulasikan pada media dengan cara ditusuk dan digoreskan selanjutnya inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil pengamatan pada bagian lereng media terbentuknya warna hitam pada media, hasil positif pada bagian lereng berwarna coklat (ditulis R), bila ungu berarti suasana basa (ditulis K), berwarna kuning berarti suasana

asam (ditulis A), adanya warna hitam (ditulis S+). Uji ini bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi lisin dan sulfida.

11.3.4. Media sitrat. Biakan kultur bakteri murni diinokulasikan pada media dengan cara ditusuk dan digoreskan selanjutnya inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Uji ini bertujuan untuk mengetahui bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon, hasil positif ditandai adanya warna biru.

12. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri murni *Escherichia coli* ATCC 25922 dibiakkan pada media *Nutrien Agar* (NA), proses pengembangbiakan dilakukan dengan cara ambil 1 ose biakan bakteri murni *Escherichia coli* ATCC 25922. Pembuatan larutan standar kekeruhan McFarland, larutan terdiri dari dua komponen larutan yaitu larutan BaCl₂ 1% dan larutan H₂SO₄ 1%. Suspensi dibuat dalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9 dan 1,5x10⁸ CFU/ml suspensi bakteri setara dengan larutan standar 0,5 McFarland (Paliling *et al.*, 2016: 231). Penyesuaian ini bertujuan untuk mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

13. Konsentrasi ekstrak dan fraksi

Konsentrasi yang diujikan adalah konsentrasi ekstrak dan fraksi n-heksan, etil asetat, dan fraksi air yang dilarutkan dengan DMSO 1%. Konsentrasi yang digunakan adalah 10%, 15% dan 20%.

14. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70%, fraksi n-Heksan, etil asetat, dan air rimpang alang-alang menggunakan metode difusi. Ekstrak dan fraksi rimpang alang-alang dibuat sebanyak 10%, 15% dan 20%. Siapkan media MHA (*Mueller Hinton Agar*) yang telah disiapkan dalam cawan petri, selanjutnya inokulasi dengan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara merata dengan lidi kapas yang telah disterilkan, diamkan 5 menit supaya bakteri berdifusi ke dalam media MHA. Langkah selanjutnya menyiapkan lubang sumuran yang berukuran 6 mm, selanjutnya sumuran diberi larutan uji, sumuran pertama berisi ekstrak etanol 70%, sumuran kedua berisi fraksi n-Heksan ekstrak rimpang alang-alang, sumuran ketiga berisi fraksi etil asetat ekstrak rimpang alang-alang dan sumuran keempat berisi fraksi air ekstrak rimpang alang-alang. Kontrol positif yang digunakan adalah tablet ciprofloxacin yang dibuat menjadi larutan dan kontrol negatif DMSO 1%.

Lakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan amati hasilnya. Setelah diinkubasi mengamati zona hambat yang terbentuk dengan penggaris ketelitian 1 mm hasil dari pengukuran tersebut dijumlahkan dan dibagi dengan banyaknya jumlah pengukuran yang dilakukan untuk mendapatkan rata-rata zona hambat yang terbentuk.

15. Bioautografi

Bioautografi dilakukan setelah mendapatkan zona hambat mana yang paling aktif dari ekstrak atau fraksi dengan metode bioautografi kontak. Siapkan chamber dan siapkan eluen N-Butanol, asam asetat, air (7:1:2), kemudian elusi dengan kertas saring untuk melihat eluen yang digunakan sudah jenuh atau belum. Konsentrasi teraktif di totolkan dengan pipa kapiler pada lempeng KLT dengan baku pembanding alkaloid, flavonoid, dan tanin selanjutnya keringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering elusi lempeng KLT, langkah selanjutnya pengamatan pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Jika bercak tidak tampak lakukan penyemprotan dengan reagen $AlCl_3$ untuk melihat senyawa flavonoid, penyemprotan dengan reagen dragendorff untuk melihat senyawa alkaloid akan muncul bercak oren.

Siapkan media *MHA* kemudian inokulasikan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan lidi kapas steril diamkan 5 menit agar bakteri berdifusi kedalam media, selanjutnya lempeng KLT di tempelkan pada media selama 15-30 menit supaya senyawa berdifusi kedalam media, inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, amati diameter zona hambat pada permukaan media dimana senyawa antimikroba yang menempel pada media.

16. Analisis Hasil

Dari metode difusi cakram hasil dibandingkan dengan kontrol positif antibiotik ciprofloxacin dengan kontrol ekstrak, kontrol fraksi dan kontrol negatif.

Analisa data untuk membandingkan zona hambat antibiotik Ciprofloxacin, menggunakan uji Oneway ANOVA jika data terdistribusi normal dan homogen serta menggunakan uji Kruskal Wallis dilanjutkan uji Mann Whitney jika didapat data tidak terdistribusi normal.