

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Dan Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini metode yang digunakan adalah metode eksperiment. Rancangan penelitian ini yaitu menguji konsentrasi ekstrak daun Binahong *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis, dengan variasi konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Untuk mengetahui daya antibakteri. semua kondisi perlakuan dibuat sama, kecuali pemberian konsentrasi ekstrak daun Binahong *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis yang dibuat berbeda. Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL), dengan 7 perlakuan konsentrasi ekstrak daun binahong konsentrasi (0%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% dan 50%) untuk bakteri *Staphylococcus aureus*, dan konsentrasi (0%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%) untuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, dan 3 ulangan pada masing-masing bakteri.

3.2. Waktu Dan Tempat Penelitian.

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia UIN MALIKI Malang dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNIBRAW Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-April 2010.

3.3. Variabel Penelitian

Variabel-variabel dalam penelitian ini meliputi:

1. Variabel Bebas.

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun Binahong *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis dengan berbagai konsentrasi

2. Variabel Terikat.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah tingkat kekeruhan yang dihasilkan pada media nutrient broth (KHM) dan jumlah koloni bakteri yang dihasilkan pada media agar (KBM)

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah variabel yang diusahakan sama untuk setiap perlakuan meliputi, suhu inkubasi, waktu, pH dan media.

3.4. Obyek Penelitian

Obyek penelitian adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* Multiresisten obat biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Daun Binahong *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis yang didapat dari Balai Materia Medika Batu Malang

3.5. Alat Dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat untuk ekstraksi maserasi dan uji fitokimia: Timbangan analitik, oven, blender, shaker, *rotary evaporator vakum*, penyaring buchner, gelas ukur 10 ml, erlenmeyer 500 ml, erlenmeyer 1 L, beacker glas 100 ml, tabung reaksi, mikro pipet, pengaduk kaca, kertas saring/whatman, aluminium foil.

Alat-alat untuk uji antibakteri: Autoklaf, incubator, lampu bunsen, labu erlenmeyer 250 ml, cawan petri, tabung reaksi, paper disk, gelas ukur, mikro pipet, pinset, ent-kas, jangka sorong, koloni counter, jarum ose, stirer, kertas label, kertas cakram, kapas dan kertas coklat, mikroskop, colony counter

3.5.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Binahong *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis dan biakkan murni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*, media Nutrien Agar (NA), media cair Nutrient Broth (NB), aquades, tween 80, Etil asetat dan Alkohol 70%.

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Preparasi Sampel

Daun binahong sebanyak 2 kg dicuci bersih dan ditiriskan, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terkena sinar matahari secara langsung. Pengeringan dilanjutkan dengan cara menjemur daun binahong di

dalam screen house selama 5 hari tidak terkena sinar matahari secara langsung dengan suhu di ruangan 35°-37°C, kemudian dihaluskan menggunakan blender sampai terbentuk serbuk. Serbuk daun binahong ini disebut dengan sampel.

3.6.2. Ekstraksi Daun Binahong Dengan Metode Maserasi

Sebanyak 200 gram serbuk daun binahong yang telah dihaluskan dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan pelarut etil asetat sebanyak 500 ml, kemudian digoyang selama satu jam untuk mencapai kondisi homogen dalam *shaker water bath* dengan kecepatan 120 rpm (rotation per minutes) selama 1 jam. Selanjutnya larutan dimaserasi selama 24 jam pada suhu kamar, setelah 24 jam, larutan difiltrasi atau dipisahkan dengan menggunakan *penyaring Buchner*. Kemudian residu penyaringan di angin-anginkan dan dilakukan remaserasi ulang selama 24 jam, maserasi di ulang sampai 3 kali. Hasil saringan 1-3 dicampur dan dipekatan dengan *Rotary vakum evaporator* dengan suhu 50°C sampai didapatkan ekstrak pekat. Ekstrak pekat yang diperoleh digunakan untuk identifikasi golongan senyawa aktif dalam daun binahong dan untuk uji antibakteri.

3.6.3. Identifikasi Senyawa Aktif Pada Daun Binahong

Uji fitokimia kandungan senyawa aktif secara kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif dengan uji reagen dari ekstrak etil asetat daun binahong dilarutkan dengan sedikit pelarut. Kemudian dilakukan uji alkaloid, flavonoid dan polifenol. Untuk uji secara kuantitatif menggunakan Spektrofotometer dengan

membandingkan pada senyawa standar. Pengujian dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang

a. Uji Alkaloid

Ekstrak pekat sebanyak 0.5 gram ditambahkan 0,5 HCL 2%. Larutan dibagi dalam 2 tabung. Tabung 1 ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendrof, tabung 2 ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Terbentuknya endapan jingga pada tabung 1 dan endapan putih pada tabung 2 menunjukkan adanya alkaloid.

b. Uji Flavanoid

Ekstrak tanaman binahong dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1-2 ml methanol panas 50%. Setelah itu ditambah logam Mg dan 4-5 tetes HCL pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk, menunjukkan adanya flavanoid.

c. Uji Senyawa Polifenol

Dua ratus mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL air lalu dipanaskan selama 10 menit, larutan didinginkan, setelah dingin larutan disaring. Filtrate ditetesi dengan $FeCl_3$ sebanyak 3 tetes. Lalu diamati perubahan warnanya. Hasil positif polifenol adalah terbentuknya larutan berwarna hijau kehitaman atau biru tua, maka bahan tersebut mengandung polifenol.

d. Penentuan Flavonoid (Metode Spektrofotometer)

Ambil 0,2 – 0,5 g sampel ekstrak, lakukan hidrolisis dengan 25% HCl dalam aseton selama 30 menit dengan suhu $100^{\circ}C$ dengan menggunakan pendingin balik. Setelah itu tambahkan dengan larutan $AlCl_3$ 1% dalam metanol gojog dengan vortex untuk melarutkan aglikon hasil hidrolisis. Ukur absorbansi

dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 425 nm. Gunakan quercetin sebagai standar.

$$\text{Flavonoid (ppm)} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi standar}} \times \text{Konsentrasi standar} \times 100 \times fp$$

Absorbansi standar :0,233

Konsentrasi standar: 5,6 mg/10ml

Fp= 20 (0,2 g dilarutkan dalam 4 ml etanol)

e. Penentuan Polifenol (Metode Spektrofotometer)

Untuk bahan padat, terlebih dahulu dilarutkan dengan etanol lalu disentrifuge pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit kemudian diambil supernatannya. Untuk bahan cair dapat langsung diproses. Ambil 1 ml larutan supernatan atau cairan sampel. Tambahkan 5 ml aquades dan 2 ml Folin C lalu di homogenkan dan tunggu selama 5 menit. Tambahkan 2 ml Na₂CO₃ jenuh lalu biarkan 1 jam. Amati absorbansi larutan pada panjang gelombang 646 nm. Untuk standar gunakan asam galat.

$$\text{Fenolat (ppm)} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi standar}} \times \text{Konsentrasi standar} \times 100 \times Fp$$

Konsentrasi standar = 0,5 ppm

Absorbansi standar = 0.247

Fp = 25 (0,2 g dilarutkan dalam 5 ml metanol)

3.7. Uji Aktivitas Antibakteri

3.7.1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan sebelum semua peralatan digunakan, yaitu dengan cara membungkus semua peralatan dengan menggunakan kertas coklat kemudian dimasukkan dalam Autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 15 Psi (Per Square Inchi) selama 15 menit. Alat yang tidak tahan panas tinggi disterilisasi dengan alkohol 70 %.

3.7.2. Pembuatan Media.

3.7.2.1. Media Nutrient Broth (NB)

Pembuatan media cair nutrient broth (NB) dengan cara menyiapkan bahan-bahan yaitu menimbang media NB sebanyak 6,5 gram kemudian dilarutkan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 500 mL dalam Erlenmeyer kemudian ditutup dengan aluminium foil. Suspensi dipanaskan hingga mendidih lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi, masing-masing 5 ml kemudian ditutup dengan kapas. Proses ini dilakukan secara aseptik, kemudian di sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Kemudian diletakkan dalam posisi miring selama 1x 24 jam pada suhu ruang.

3.7.2.2. Media Nutrient Agar (NA)

Pembuatan media dilakukan dengan cara menyiapkan bahan-bahan untuk medium yaitu dengan menimbang media Nutrient Agar (NA) sebanyak 14,5 gram kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak 500 mL dalam erlenmeyer

kemudian ditutup dengan aluminium foil. Suspensi dipanaskan hingga mendidih lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing 10 ml dan 5 ml kemudian ditutup dengan kapas. Proses ini dilakukan secara aseptik, kemudian di sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Kemudian diletakkan dalam posisi miring selama 1 x 24 jam pada suhu ruang.

3.7.2.3. Peremajaan Biakan Bakteri

Biakan murni bakteri diremajakan pada media agar padat dengan cara bakteri diambil 1 ose lalu jarum ose yang mengandung bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* digoreskan secara aseptik pada media nutrient agar pada cawan yaitu dengan mendekatkan cawan pada nyala api saat menggoreskan jarum ose. Kemudian cawan petri ditutup kembali dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27°C dalam inkubator, kemudian diambil 1 koloni dan di tanam pada media NB, kemudian divortek supaya homogen, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27°C dalam inkubator, ada pertumbuhan bakteri jika media keruh, kemudian dibandingkan dengan media NB tanpa bakteri.

3.7.2.4. Pembuatan Suspensi Bakteri

Diambil 1 ml dari hasil peremajaan biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml NaCl fisiologis 0,9%. Kemudian di vortek supaya homogen, kemudian dibandingkan dengan standart Mc Farland dengan kepadatan bakteri sebanyak

10^8 sel/ml. Kemudian diencerkan 100x pada media NaCl fisiologis 0,9% dan media NB. didapatkan suspensi bakteri sebanyak 10^6 bakteri sel/ml, bakteri siap diujikan (Murray, *et al.*, 1999)

3.8. Uji Aktifitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong.

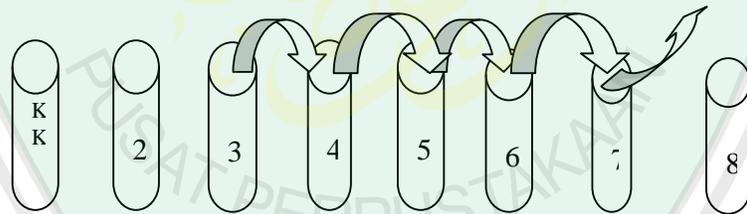
Uji kepekaan kuman terhadap antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode dilusi tabung (tube dilution test) untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dengan melakukan penanaman bakteri pada media Nutrient Broth (NB) dan media Nutrient Agar (NA) pada cawan petri dengan pemberian konsentrasi ekstrak daun Binahong sesuai dengan perlakuan perhitungan konsentrasi ekstrak daun Binahong pada (Lampiran 2.2.4).

3.8.1. Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Uji KHM adalah konsentrasi terkecil obat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara makroskopik (Edberg, 1983). langkah-langkah uji KHM adalah:

1. Menyiapkan larutan ekstrak sebanyak 1 gram kemudian diencerkan dengan aquades 10 ml dan ditambahkan larutan tween 80 sebanyak 100 μ L.(b/v)
2. Menyiapkan tabung reaksi sebanyak 8 tabung. 6 untuk perlakuan dan 2 kontrol.

3. Tabung reaksi 1 diisi dengan 1 ml bakteri uji dengan konsentrasi 10^6 bakteri/ml tanpa pencampuran dengan ekstrak daun binahong, tabung ini sebagai kontrol bakteri (*original inoculum*)
4. Memasukkan media NB sebanyak 1 ml kedalam tabung 2 s/d 8, kemudian larutan ekstrak dimasukkan pada tabung 2 dan 3 sebanyak 1 ml,
5. Pada tabung 3 di campur hingga rata, kemudian dipindahkan sebanyak 1 ml kedalam tabung 4 dan diencerkan secara berseri sampai tabung ke-7
6. Pada tabung ke-7 setelah tercampur rata , larutan dibuang sebanyak 1 ml.
7. Pada tabung 3-7 ditambahkan perbenihan bakteri sebanyak 1 ml dari 10^8 bakteri/ml yang diencerkan 100 kali. Sehingga konsentrasinya menjadi 10^6 bakteri/ml. Maka didapat pengenceran dengan konsentrasi 100%,50%, 25%, 12,5%, 6,25% dan 3,125% .proses pengenceran sebagai berikut:



K(+) . 100% 50% 25% 12,5% 6,25% 3,125% K (-)

- Pada konsentrasi 100% bakteri yang disuspensikan adalah bakteri dari media yang nutrisinya diperbanyak 2 kali
- Kontrol positif Tabung ke-1 berisi larutan NB dan inokulum
- Kontrol Negatif Tabung ke-8 yang berisi NB dan ekstrak.

- Seluruh tabung reaksi tersebut dinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian dilakukan pengamatan keseluruhan tabung terhadap kejernihan tabung dengan melihat kontrol positif dan negatif.

Dari hasil pengamatan kemudian dilakukan pengujian ulang untuk mengetahui KHM dan KBM dengan melakukan penurunan konsentrasi ekstrak (untuk merapatkan dosis) diambil dari konsentrasi hasil uji dilusi tabung yang menampilkan kejernihan. Pada bakteri *Staphylococcus aureus* diambil konsentrasi 25%-50% (25%,30%,35%,40%,45% dan 50%) Pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 50%-100% (50%,60%,70%,80%,90% dan 100%) dengan cara:

1. Menyiapkan tabung reaksi, kemudian diisi dengan media NB sebanyak 1 ml, ditambahkan ekstrak sesuai dengan konsentrasi 1 ml, kemudian ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 1 ml, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
2. Uji konsentrasi hambat minimum (KHM). adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. ditandai dengan adanya kejernihan (tidak ada bakteri yang tumbuh) pada media tabung setelah pemberian ekstrak pada masing-masing bakteri.
3. Uji konsentrasi bunuh minimum (KBM) sampel di *Streak* pada media nutrient agar plate (NAP), sebelum di *Streaking* atau digores, sampel diencerkan. Pengenceran di lakukan dengan melihat terlebih dahulu kepadatan sel bakteri pada kamar hitung (*Haemocytometer*) dan diamati dengan menggunakan Mikroskop.

4. Sampel diencerkan sebanyak 10^1 10^2 10^3 sampai 10^5 dengan cara mengambil 1 ml sampel kemudian dicampur kedalam larutan NaCL fisiologis 09% sebanyak 9 ml, kemudian divortek.
5. Hasil pengenceran kemudian di *Streaking* (penggoresan) pada media NAP dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
6. Diamati ada tidaknya pertumbuhan (koloni) bakteri dan dilakukan penghitungan koloni bakteri dengan menggunakan *colony counter*

3.8.2. Penghitungan Data

Setelah biakan di inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C lalu dilakukan pengamatan biakan bakteri dan dihitung dengan menggunakan *Colony Counter*. Biakan yang dihitung Diambil koloni yang tumbuh sesuai dengan standar plat count yaitu 30-300 koloni per cawan. Adapun cara menghitung koloni adalah sebagai berikut:

- a. Satu koloni dihitung 1 koloni
- b. Dua koloni yang bertumpuk dihitung 1 koloni
- c. Beberapa koloni yang berhubungan dihitung 1 koloni
- d. Dua koloni yang berhimpitan dan masih dapat dibedakan dihitung 2 koloni.
- e. Satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan, dihitung sebagai 1 koloni
- f. Satu koloni yang membentuk satu deretan atau rantai dan terlihat sebagai satu garis tebal dihitung sebagai 1 koloni

- g. Dari hasil penghitungan yang dilakukan, kemudian dihitung jumlah koloni per ml dengan cara sebagai berikut:

$$\text{jumlah koloni} = \text{jumlah koloni per plate} \times \frac{1}{\text{faktor pengencer}}$$

Faktor pengenceran= pengenceran× jumlah yang diencerkan.

3.9 Analisa data

Data yang diperoleh yaitu data konsentrasi ekstrak daun Binahong dan jumlah koloni bakteri. Analisis yang digunakan adalah uji statistik *one way* ANOVA, Uji Korelasi dan Uji Regresi Linear sederhana. Uji *one way* ANOVA digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun Binahong terhadap pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Jika ada pengaruh, maka dilanjutkan dengan menggunakan uji lanjut LSD (*Least Significant Differences*). Sedangkan untuk mengetahui hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun Binahong terhadap jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* maka digunakan uji Korelasi. Sedangkan untuk mencari kekuatan hubungan yang ada antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun Binahong dengan penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* digunakan uji Regresi linear. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS *for windows* versi 15.