

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan rancang bangun penelitian eksperimental laboratorik. Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut methanol p.a. Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) terhadap bakteri *Salmonella typhi* dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode difusi cakram dengan analogi penentuan diameter zona hambatan.

Pengujian antibakteri dari ekstrak daun beluntas disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan dan masing-masing perlakuan diulang 3 kali sehingga ada 21 satuan percobaan dengan konsentrasi ekstrak sebesar 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml dan 30 mg/ml masing-masing dilarutkan ke dalam 1 ml DMSO dan ditambah dengan aquades steril sampai volume 10 ml. Kontrol positif menggunakan larutan kloramfenikol 30 mg/ml dan kontrol negatif menggunakan campuran aquades steril dan DMSO.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yaitu 1) variabel bebas, 2) variabel terikat, dan 3) variabel terkontrol. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.). Variabel terikat yang digunakan adalah daya hambat ekstrak daun kenikir terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Sedangkan variabel terkontrol yang digunakan bakteri *Salmonella typhi*.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juni 2013 di Laboratorium Biologi dan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk proses ekstraksi dalam penelitian ini yaitu pisau, oven, neraca analitik (Mettler AE 25), seperangkat alat gelas, dan rotary evaporator. Alat yang digunakan untuk uji antibakteri adalah cawan petri, shaker, tabung reaksi, kertas saring, kapas, botol media, jarum ose, autoklaf, inkubator, pinset, bunsen, pipet mikro, tisu dan penggaris.

Sedangkan peralatan untuk analisis fitokimia antara lain, pipet tetes, neraca elektrik (Mettler-tolebo), pipet volumetrik, erlenmeyer, cawan petri, spatula, pengaduk, kertas saring, corong, beaker glass, tabung reaksi, gelas kimia, gelas ukur, freezer, hot plate, dan timbangan analitik.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kenikir kering (serbuk). Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi adalah kertas saring wathman, akuades, alkohol 70 %, metanol p.a dan DMSO (*Dimethylsulfoxide*), *Nutrient Agar*, *Nutrient Broth*, alkohol 90 %, kertas cakram, akuades steril, plastik tahan panas, plastik *wrap*, *aluminium foil* serta biakan bakteri *Salmonella typhi* (diperoleh dari laboratorium mikrobiologi UIN Maliki Malang). Sedangkan

skrining fitokimia digunakan bahan-bahan yaitu etanol p.a 90%, methanol p.a, serbuk Mg, HCl 37 %, FeCl₃ 1% ekstrak daun kenikir, tisu, dan akuades.

3.5 Tahap Penelitian

1. Persiapan sampel
2. Ekstraksi daun kenikir
3. Uji Fitokimia
4. Uji antibakteri

3.6 Cara Kerja

3.6.1 Persiapan Sampel

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.). Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terkena sinar matahari langsung selama beberapa hari, lalu ditumbuk hingga diperoleh serbuk daun kering.

3.6.2 Ekstraksi Daun Kenikir dengan Metode Maserasi

Pembuatan ekstrak metanol daun kenikir dilakukan selama 3 x 24 jam karena proses ekstraksi akan berlangsung optimal dengan tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan sampel. Selama proses perendaman dilakukan beberapa kali pengocokan untuk menyempurnakan kontak antara pelarut dan sampel. Menurut Voight (1994), waktu ekstraksi memberikan kontribusi yang cukup besar terhadap keberhasilan ekstraksi yang dilakukan. Semakin lama waktu ekstraksi akan memberikan kesempatan lebih besar bagi pelarut untuk berinteraksi dengan senyawa yang akan diekstrak sehingga hasilnya juga bertambah sampai titik jenuh larutan.

Daun kenikir yang telah diserbuk ditimbang sebanyak 250 gram, dimasukkan ke dalam wadah kemudian ditambahkan metanol p.a sampai terendam dan diaduk dengan shaker selama 1 jam kemudian didiamkan semalam. Ekstrak disaring dengan kertas saring, diperoleh filtrat I, ditampung dalam wadah bersih dan ampas I ditambah metanol lagi, diaduk dengan shaker selama 1 jam lalu didiamkan semalam. Setelah itu ekstrak disaring sehingga diperoleh filtrat II. Selanjutnya proses yang sama dilakukan hingga diperoleh filtrat III. Seluruh filtrat yang diperoleh dari proses maserasi I, II, dan III digabung, disaring, dan dipekatkan dengan *Rotary evaporator* pada suhu 60°C dan dilanjutkan penguapan ekstrak menggunakan Water Bath pada suhu 60°C sehingga diperoleh ekstrak kental dengan bobot konstan. Kemudian ekstrak daun kenikir diuapkan selama 2 jam dengan gas N₂ untuk menghilangkan sisa pelarutnya. Hilangnya sisa pelarut ditandai dengan menurunnya bobot ekstrak metanol daun kenikir sampai mencapai bobot konstan.

3.6.3 Uji Fitokimia (Kualitatif)

3.6.3.1 Uji Fenol

Sebanyak 30 mg ekstrak ditambahkan 10 tetes FeCl₃ 1%. Ekstrak positif mengandung fenol apabila menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam pekat (Harborne, 1987).

3.6.3.2 Uji Flavonoid

Setengah gram ekstrak sampel dari hasil ekstraksi ditambahkan dengan 1-2 mL air panas dan sedikit serbuk Mg. Kemudian ditambahkan 4-5 tetes HCl 37

% dan etanol 95 % dengan volume yang sama kemudian dikocok. Apabila timbul warna merah, kuning atau jingga, maka ekstrak positif mengandung flavonoid.

3.6.3.3 Uji Saponin

Ekstrak daun kenikir dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambah HCl 1 N, busa yang terbentuk dapat bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm, maka ekstrak positif mengandung saponin.

3.6.3.4 Uji Tanin

Ekstrak daun kenikir sebanyak 1 mL ditambahkan larutan FeCl_3 1%. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua, maka bahan tersebut mengandung tanin (Hayati, 2010).

3.6.4 Uji Aktivitas Antibakteri

3.6.4.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan sebelum semua peralatan digunakan, yaitu dengan cara semua alat dibungkus menggunakan aluminium foil dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (per square inci) selama 15 menit. Alat yang tidak tahan terhadap panas tinggi disterilkan dengan alkohol 90 %.

3.6.4.2 Pembuatan Media

Pembuatan *Nutrien Agar* dilakukan dengan cara 10 g *NA* masing-masing dilarutkan dalam 500 mL akuades pada beaker gelas. Suspensi yang dihasilkan dipanaskan sampai mendidih, kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Proses ini dilakukan di dekat nyala api

(bunsen). Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit (Volk dan Wheeler, 1993).

Pembuatan media Nutrien Broth dengan cara 4 g NB dilarutkan dalam 500 mL akuades. Kemudian dipanaskan sampai mendidih dan dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 mL lalu ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Proses ini dilakukan di dekat nyala api (bunsen). Tabung-tabung tersebut kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit

3.6.4.3 Pembuatan Media Agar Miring

Media agar miring dibuat dengan memasukkan media agar *NA* yang telah selesai dipanaskan (tahap 3.6.3.2) sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi lalu ditutup menggunakan kapas dan aluminium foil. Kemudian dimasukkan dalam plastik tahan panas dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit kemudian diletakkan dalam posisi miring selama 24 jam pada suhu ruang.

3.6.4.4 Peremajaan Biakan Murni

Biakan murni bakteri diremajakan pada media padat *Nutrien Agar* miring dengan cara menggoreskan jarum ose yang mengandung bakteri *Salmonella typhi* secara aseptis yaitu dengan mendekatkan mulut tabung pada nyala api saat menggoreskan jarum ose. Kemudian tabung reaksi ditutup kembali dengan kapas dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator.

3.6.4.5 Pembuatan Biakan Aktif/Inokulum

Satu ose hasil peremajaan biakan murni bakteri dibiakkan dalam 50 mL *Nutrien Broth* steril dan dihomogenkan. Larutan ini berfungsi sebagai biakan cair aktif yang siap digunakan.

3.6.4.6 Pembuatan Kurva Standart

Dimasukkan 20 ml inokulum bakteri ke dalam 200 ml *Nutrient Broth*, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebanyak 1 mL kultur murni diambil dan dimasukkan ke dalam 9 mL NB dan dihitung sebagai pengenceran pertama (10^{-1}). Kultur dalam pengenceran pertama divortex kemudian diambil 1 mL kultur dan dimasukkan ke dalam 9 mL NB. Pengenceran ini dihitung sebagai pengenceran kedua (10^{-2}) begitu seterusnya hingga pengenceran ke lima. Masing-masing pengenceran 10^{-6} sampai 10^{-10} diambil 25 μ L kultur dan dituang ke dalam media NA dengan 3 kali ulangan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C lalu dihitung jumlah selnya. Masing-masing kultur pada seri pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-5} diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 480 nm. Panjang gelombang tersebut digunakan karena berdasarkan percobaan dapat menunjukkan nilai absorbansi terhadap seri pengenceran kultur bakteri dengan ketelitian tertinggi dibanding panjang gelombang lainnya.

3.6.5 Uji Antibakteri

Media padat *Nutrien Agar* (tahap 3.5.3.2) dipanaskan hingga mencair, didinginkan sampai suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$, dan dituang dalam cawan petri steril. Kemudian ditambahkan 0,1 mL larutan biakan aktif bakteri dan dihomogenkan kemudian

dibiarkan hingga memadat. Kertas cakram (diameter 5 mm) diresapkan dalam ekstrak dan kontrol. Proses peresapan dilakukan dengan cara meneteskan 20 μ L kontrol positif (kloramfenikol 30 mg/ml) kontrol negatif (pengenceran menggunakan DMSO dan akuades steril) dan ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, dan 30 mg/ml (Zakaria *et al.*, 2007). Kertas cakram tersebut kemudian diletakkan di atas permukaan media bakteri menggunakan pinset dan ditekan sedikit. Media bakteri yang sudah dipasang bahan antibakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambatan yang terbentuk diukur menggunakan penggaris untuk menentukan efektifitas antibakteri. Zona hambatan diukur dengan cara mengurangi diameter keseluruhan (cakram + zona hambatan) dengan diameter cakram (Volk dan Wheeler, 1993).

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh diuji distribusi normalnya dengan *Kolmogorov-Smirnov* dan dilanjutkan dengan uji homogenitas, jika data berdistribusi normal dan homogen maka dianalisis menggunakan ANOVA *one way*. Analisis data dilakukan dengan mencari kolerasi melalui persamaan garis regresi dari data konsentrasi larutan uji terhadap lebar diameter daerah hambatan pertumbuhan. Uji ANOVA *one way test* digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak metaol daun kenikir terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella typhi*. Sedangkan untuk mengetahui perbedaan setiap konsentrasi ekstrak metanol daun kenikir terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella typhi* maka digunakan *UJD/Duncan test*.