

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat deskriptif dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas antibakteri dari ekstrak daun teh-tehan *Acalypha siamensis* sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Tahap penelitian ini meliputi tiga tahap kerja. Pertama, determinasi tumbuhan teh-tehan (*Acalypha siamensis*), pengambilan daun teh-tehan, persiapan instrumen, pembuatan simplisia, pembuatan ekstrak, strerilisasi alat dan bahan, dan pembuatan suspensi bakteri. Kedua, tahap pelaksanaan yaitu pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) terhadap bakteri *Escherichia coli*. Ketiga, tahap akhir penelitian yaitu melakukan pengamatan terhadap hasil pengujian, analisis data penarikan kesimpulan.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah ekstrak daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*). Sedangkan sampel dalam penelitian ini adalah sebagian ekstrak daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) yang akan digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Farmakognosi dan Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang pada bulan April sampai Juni 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini terdiri dari dua sub variabel. Sub variabel satu dalam penelitian ini adalah Ekstrak daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*). Sedangkan sub variabel dua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri.

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini dapat diklarifikasikan sebagai berikut :

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Devinisi variabel	Parameter Uji	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Ekstrak daun teh-tehan (<i>Acalypha siamensis</i>)	Ekstrak kental yang diperoleh dari ekstraksi metode maserasi daun teh-tehan (<i>Acalypha siamensis</i>) menggunakan pelarut etanol 70%	Rendemen	Timbangan analitik	%	Nominal
Aktivitas antibakteri	Kemampuan suatu ekstrak daun teh-tehan (<i>Acalypha siamensis</i>) dalam menghambat pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> .	Zona Bening	Jangka sorong	mm	Nominal

3.5 Instrumen Penelitian

Instrument penelitian adalah alat dan bahan yang digunakan untuk pengumpulan data. Adapun alat dan bahan yang dibutuhkan adalah sebagai berikut :

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pisau, gunting, bak cuci, Loyang, oven, blender, ayakan, timbangan analitik, botol coklat, kertas saring, *rotary evaporator*, cawan penguap, *waterbath*, tabung reaksi, rak tabung

reaksi, cawan petri, Erlenmeyer, *beaker glass*, *blue tip*, kapas, kertas coklat, oven, autoklaf, inkubator, jarum ose, Bunsen, kawat kasa, kaki tiga, korek api, batang pengaduk, spektrofotometer UV-Vis, bor, LAF (*Laminar Air Flow*), jangka sorong.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*), air, etanol 70%, FeCl₃ 3%, FeCl₃ 1%, NaOH, H₂SO₄, dragendroff, mayer, wagner, n-heksana, asam asetat anhidrat, bakteri biakan murni *Escherichia coli*, media EMBA (*Eosin Metilen Blue Agar*), aquades, NaCl 0,9%.

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman teh-tehan (*Acalypha siamensis*) dilakukan oleh UPT Materia Medika Batu.

3.6.2 Pembuatan Simplisia

Adapun cara pembuatan serbuk simplisia adalah sebagai berikut :

1. Dikumpulkan daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) yang akan dijadikan simplisia, daun yang diambil adalah daun keempat dan kelima dari pucuk
2. Disortasi daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) yang masih kotor
3. Dicuci daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) yang telah disortasi, dengan cara direndam dan dibilas menggunakan air mengalir

4. Dikering anginkan daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) untuk mengurangi kadar air sisa dicuci
5. Diletakkan daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) pada wadah kemudian ditutup menggunakan kain hitam lalu dikeringkan dibawah sinar matahari
6. Diblender daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) kemudian diayak menggunakan ayakan 40 mesh dan dilakukan uji organoleptis (Rizkia, 2014)

3.6.3 Pembuatan Ekstrak

Pembuaan ekstrak daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% yaitu sebagai berikut :

1. Ditimbang serbuk simplisia sebanyak 100 gram
2. Dimasukkan kedalam botol coklat kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 500 ml
3. Disimpan selama 7 hari, sambil sesekali diaduk, dilakukan pengulangan sebanyak empat kali
4. Disaring menggunakan corong *buchner*
5. Dituangkan filtrat kedalam tabung *rotary evaporator*, diuapkan dengan suhu 40°C sampai tidak menetes
6. Dituangkan hasil ke cawan penguap, diuap diatas *waterbath* dengan suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental (Sari V. Y., 2010).
7. Dilakukan uji organoleptis (Rizkia, 2014)

3.6.4 Uji Identifikasi

3.6.4.1 Uji Fenol

1. Sebanyak 2 mL ekstrak daun teh-tehan dimasukkan ke dalam tabung reaksi

2. Kemudian ditambahkan 10 tetes air panas dan 3 tetes pereaksi FeCl_3 3%
3. Apabila warna larutan berubah menjadi hijau kebiruan atau biru gelap maka menunjukkan bahwa ada senyawa fenol (Rijayanti, 2014).

3.6.4.2 Uji Tanin

1. Diambil 1 mL ekstrak daun teh-tehan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Kemudian dimasukkan 2 mL air dan ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1%
3. Apabila timbul warna biru kehitaman atau hijau kehitaman berarti terdapat senyawa tanin (Rijayanti, 2014)

3.6.4.3 Uji Flavonoid

1. Sebanyak 5 mL ekstrak daun teh-tehan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Ditambahkan 3 tetes larutan NaOH
3. Jika terbentuk warna kuning intens yang menjadi tidak berwarna dengan penambahan H_2SO_4 encer menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Rahmadani, 2015).

3.6.4.4 Uji Alkaloid

1. Sebanyak 100 gram ekstrak dilarutkan dengan 10 mL kloroform amoniak
2. Diambil lapisan paling atas dan dibagi menjadi 3 tabung.
 - a. Tabung I : Ditetesi Dragendroff 2-3 tetes, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan atau kekeruhan (hitam).
 - b. Tabung II : Ditetesi pereaksi Mayer 2-3 tetes, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih/kekuningan.
 - c. Tabung III : Ditetesi pereaksi Wagner 2-3 tetes, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan coklat kemerahan (Rijayanti, 2014).

3.6.4.5 Uji Steroid

1. Sebanyak 2 mL ekstrak daun teh-tehan dilarutkan dengan 1 mL n-Heksana
2. Lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat
3. Campuran larutan tersebut kemudian ditetesi 2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung.
4. Apabila diperoleh cincin berwarna hijau kebiruan pada perbatasan dua pelarut maka ditandai dengan adanya senyawa steroid (Rijayanti, 2014).

3.6.4.6 Uji Saponin

1. Sebanyak 2 mL ekstrak daun teh-tehan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Kemudian ditambah 10mL air panas dan 3 tetes HCl lalu dinginkan setelah itu dikocok dengan kuat selama 10 menit hingga terbentuk buih dan jika buih tidak hilang selama 10 menit dengan tinggi 1-10 cm, maka ekstrak tersebut mengandung saponin (Rijayanti, 2014).

3.6.5 Pengujian Antimikroba

3.6.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

1. Disiapkan alat dan bahan terlebih dahulu yang akan digunakan seperti tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer, *beaker glass*, *bluetip*.
2. Disiapkan 5 cawan petri kosong, 5 bluetip dimasukkan ke dalam beaker glass 100 mL, 12 tabung reaksi dan dibungkus menggunakan kertas coklat.
3. Disterilkan erlenmeyer dan *bluetip* dalam autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.
4. Disterilkan cawan petri menggunakan oven dengan suhu 175⁰C selama 15-30 menit (Rahmadani, 2015).

3.6.5.2 Pembuatan Media EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*)

1. Ditimbang 5,4 gram media EMBA
2. Dimasukkan ke erlenmeyer, lalu ditambahkan aquadest 145ml
3. Dihomogenkan larutan dengan pengadukan dan bantuan pemanasan diatas Bunsen
4. Ditutup dengan kapas dan kertas coklat
5. Disterilisasi dengan autoklaf 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit
(Chairani S, 2018)

3.6.5.3 Peremajaan Bakteri

1. Diambil 1 ose bakteri *Escherichia coli* pada biakan murni.
2. Dipindahkan ke dalam 10 tabung reaksi yang telah berisi media miring EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*)
3. Ditutup dengan kapas kemudian dibungkus dengan kertas coklat
4. Diinkubasi di inkubator pada suhu pada suhu 37⁰C selama 1 x 24 jam (Sari K. I., 2013)

3.6.5.4 Pembuatan Suspensi

1. Diambil dengan jarum ose bakteri *Escherichia coli* dari kultur yang diinokulasi pada media miring
2. Dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi larutan NaCl 0,9%.
3. Diaduk hingga homogen
4. Diukur nilai kekeruhannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 580 nm dan sampai diperoleh nilai transmittan 25% setara dengan 10⁸ cfu/ml bakteri (Ardianti, 2016).

3.6.5.5 Pembuatan Kontrol

1. Kontrol Media

- a. Disiapkan cawan petri, erlenmeyer yang berisi media cair, bunsen, dan korek api
- b. Dinyalakan bunsen menggunakan korek api
- c. Diambil erlenmeyer yang berisi media cair, dipanaskan mulut erlenmeyer didekat api
- d. Diambil cawan petri, lalu dipanaskan pinggirannya didekat api
- e. Kemudian dibuka cawan petri separuhnya, kemudian dituangkan media cair kedalam cawan (Semua dilakukan didekat api) (Mulyani, 2017)

2. Kontrol Bakteri

- a. Disiapkan cawan petri, erlenmeyer yang berisi suspensi bakteri, bunsen dan korek api
- b. Dinyalakan bunsen menggunakan korek api
- c. Diambil erlenmeyer yang berisi suspensi bakteri, lalu dipanaskan mulut erlenmeyer didekat api
- d. Diambil cawan petri, lalu dipanaskan pinggirannya didekat api
- e. Dibuka cawan petri separuhnya, dimasukkan 1 ml suspensi bakteri menggunakan *bluetip*
- f. Dituang media cair sebanyak 15mL, kemudian digoyang membentuk angka delapan dan dibiarkan hingga memadat. (Mulyani, 2017)

3.6.5.6 Pengujian Antibakteri

1. Disiapkan alat dan bahan
2. Dimasukkan suspensi bakteri ke dalam cawan petri

3. Kemudian ditambahkan media sebanyak 15 mL, digoyang-goyangkan sesuai angka delapan dan dibiarkan memadat.
4. Dibuat lubang sumuran pada 3 cawan petri dengan menggunakan bor (pelubang) steril dengan diameter 8mm pada tengah cawan petri, lalu dilakukan perlakuan pada masing-masing cawan petri yaitu :

Maserat : 3 cawan petri yang telah dibuat lubang sumuran kemudian diisi dengan maserat daun teh-tehan, dilakukan didalam LAF (*Laminar Air Flow*).
5. Dilakukan pra-inkubasi dilakukan selama 30 menit pada suhu kamar, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Dihitung diameter zona bening atau zona hambatnya (Rohadi, 2016).

3.7 Analisis Data

Dalam penelitian ini analisis data yang diperoleh meliputi hasil rendemen ekstrak dan hasil pengukuran zona bening pada lempeng media menggunakan jangka sorong. Data tersebut disajikan dalam bentuk tabel dan dimasukkan ke dalam kategori kuat, sedang, lemah, atau tidak mempunyai daya hambat sesuai dengan Tabel 2.2.

