

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan merupakan penelitian deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Dalam penelitian ini meliputi tiga tahap, dimana tahap pertama adalah tahap persiapan atau tahap pembuatan ekstrak etanol 70% daun teh-tehan, uji identifikasi fitokimia, sterilisasi alat dan bahan, pembuatan kontrol media, kontrol bakteri, pembuatan suspensi bakteri, persiapan bakteri uji *Streptococcus mutans* yang diremajakan pada media *Blood Agar*. Kedua, tahap pelaksanaan yaitu dengan menguji ekstrak etanol 70% daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* menggunakan metode difusi agar sumuran, dengan melihat zona hambat yang ditandai dengan adanya zona bening yang dihasilkan dari ekstrak etanol 70% daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* yang ditanam pada media *Mueller Hinton Agar*. Dan yang ketiga, tahap akhir dari penelitian ini yaitu melakukan pengamatan terhadap hasil pengujian, menganalisis data yang diperoleh, dan membuat kesimpulan dari pengamatan yang telah dilakukan.

3.2 Populasi, Sampel, dan Bakteri Uji

Populasi penelitian ini adalah ekstrak daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*), sedangkan sampel tanaman uji yang akan digunakan adalah sebagian

dari ekstrak daun teh-tehan yang telah diekstrak dengan metode maserasi. Daun teh-tehan yang akan digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari kebun yang berada di sekitar Desa Plandi Kecamatan Wonosari Kabupaten Malang. Daun teh-tehan nantinya akan dibuat simplisia terlebih dahulu, setelah itu daun yang sudah menjadi simplisia tersebut akan diekstraksi. Bakteri yang digunakan untuk penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans*.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi dan waktu penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang pada bulan Februari sampai Mei 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional dalam penelitian yang akan dilakukan terdiri dari dua variabel. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*), sedangkan untuk variabel terikat adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Variabel	Parameter Uji	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Bebas : Ekstrak etanol 70% daun teh-tehan (<i>Acalypha siamensis</i>)	Ekstrak yang diperoleh dari metode ekstraksi maserasi	Rendemen	Timbangan Analitik	%	Nominal
Terikat : Aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun teh-tehan (<i>Acalypha siamensis</i>) terhadap pertumbuhan bakteri <i>Streptococcus mutans</i>	Kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri	Zona Bening	Jangka sorong	mm	Ordinal

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan penelitian merupakan semua alat maupun bahan yang dibutuhkan selama proses penelitian yang digunakan untuk pengumpulan data.

Berikut alat dan bahan yang digunakan :

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : pisau, blender, cawan petri, batang pengaduk, erlenmeyer (Iwaki Pyrex), gelas ukur (Iwaki Pyrex), inkubator (Memmert), jangka sorong, penggaris, jarum ose, kapas, perkamen, kertas coklat, lampu spiritus, kaki tiga, kawat kasa, mikroskop, neraca analitik, oven (Memmert), autoklaf, rak tabung reaksi, tabung reaksi (Iwaki Pyrex),

aluminium foil, bluetip, beaker glass (Iwaki Pyrex), kertas saring, spidol, *Laminar Air Flow*, bor (pelubang sumuran), *rotary evaporator* dan mikropipet.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : Daun teh-tehan segar, air, serbuk simplisia daun teh-tehan, etanol 70%, aquadest, bakteri *Sterptococcus mutans*, media *Mueller Hinton Agar*, media *Blood Agar*, larutan NaCl 0,9%, FeCl₃ 3%, FeCl₃ 1%, NaOH, H₂SO₄ Pekat, H₂SO₄ Encer, Dragendroff, Mayer, Wagner, Air Panas, n-Hexana dan Asam Asetat Anhidrat.

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

1. Diambil daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) diambil dari daun keempat dan kelima dari pucuk.
2. Daun teh-tehan yang sudah dikumpulkan di cuci bersih.
3. Ditaruh dalam loyang, kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu 50°C.
4. Ditunggu sampai kering, apabila sudah kering dapat dikeluarkan dan kemudian dihaluskan dengan blender lalu diayak dengan ayakan no 40 mesh, setelah itu disimpan pada tempat yang kering (Rizkia, 2014).

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Maserasi

1. Ditimbang serbuk simplisia daun teh-tehan sebanyak 100 gram.
2. Diukur etanol 70% sebanyak 500 mL.
3. Semua bahan yang sudah diambil, dimasukkan ke dalam botol coklat.

4. Dimaserasi selama 7 hari.
5. Selama proses perendaman dilakukan pengadukan setiap 4 jam sekali.
6. Setelah dimaserasi, maserat dipisahkan dari residunya, yang kemudian diuapkan pada *rotary evaporator* pada suhu 40°C untuk menguapkan etanol pada maserat dan dilanjutkan diuapkan pada waterbath pada 40°C untuk menguapkan air pada maserat sampai dihasilkan ekstrak kental.
7. Proses perendaman dilakukan sebanyak 4 kali (Rizkia, 2014).

3.6.4 Uji Skrinning Fitokimia

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 FeCl₃ 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 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 H₂SO₄ encer menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Rahmadani, 2015).

3.6.4.3 Alkaloid

1. Sebanyak 0,1g ekstrak daun teh-tehan dilarutkan 10mL kloroform amoniak lalu hasilnya dibagi menjadi dua bagian yang sama.
2. Untuk bagian pertama kemudian ditambahkan H₂SO₄ 2N, kemudian dikocok sampai terbentuk 2 lapisan.

3. Diambil lapisan asam dan dibagi menjadi 3 tabung.

Tabung I : Ditetesi dragendroff 2-3 tetes, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan atau kekeruhan (hitam).

Tabung II : Ditetesi pereaksi mayer 2-3 tetes, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih/kekuningan.

Tabung III : Ditetesi pereaksi wagner 2-3 tetes, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan coklat kemerahan (Rijayanti, 2014).

3.6.4.4 Saponin

1. Sebanyak 2 mL ekstrak daun teh-tehan dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
2. Kemudian ditambahkan 10 mL air panas, lalu didinginkan 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).

3.6.4.5 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).

3.6.4.6 Steroid

1. Sebanyak 2 mL ekstrak daun teh-tehan dilarutkan dengan 1 mL n-Hexana.
2. Lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat.
3. Campuran larutan tersebut kemudian ditetesi 2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung.

4. Apabila diperoleh cincin berwarna hijau kebiruan pada perbatasan dua pelarut maka ditandai dengan adanya senyawa steroid (Rijayanti, 2014).

3.6.5 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, 10 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 175°C selama 15-30 menit (Rahmawati et al., 2013).

3.6.5.2 Pembuatan Media *Blood Agar* dan Media *Mueller Hinton Agar*

3.6.5.2.1 Media *Blood Agar*

1. Ditimbang media sebanyak 2,8 gram media *Blood Agar*.
2. Dimasukkan media *Blood Agar* yang telah ditimbang ke dalam erlenmeyer lalu dilarutkan dengan aquades sebanyak 70 mL.
3. Dipanaskan hingga mendidih.
4. Diaduk hingga homogen, kemudian ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan kertas coklat.
5. Disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C atau 250°F selama 15 menit.
6. Ditunggu hingga hangat kemudian ditambahkan darah domba segar sebanyak 3,5 mL (Audies, 2015).

3.6.5.2.2 Media *Mueller Hinton Agar*

1. Ditimbang sebanyak 2,85 gram media *Mueller Hinton Agar*.
2. Dimasukkan media *Mueller Hinton Agar* yang telah ditimbang ke dalam erlenmeyer lalu dilarutkan dengan aquades sebanyak 75 mL.
3. Dipanaskan hingga mendidih.
4. Diaduk hingga homogen, kemudian ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan kertas coklat.
5. Disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121⁰C atau 250⁰F selama 15 menit (Chairani et al, 2018).

3.6.5.3 Peremajaan Bakteri

1. Diambil 1 ose bakteri *Streptococcus mutans* dari biakan murni.
2. Dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi media miring *Blood Agar* secara zig zag.
3. Ditutup dengan kapas kemudian dibungkus dengan kertas coklat.
4. Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 1 x 24 jam (Agustina et al, 2007).

3.6.5.4 Uji Pewarnaan Gram Bakteri *Streptococcus mutans*

1. Diambil 1 ose bakteri dari peremajaan, kemudian diletakkan pada kaca preparat yang telah ditetesi aquades, kemudian di fiksasi.
2. Ditetesi dengan kristal violet, didiamkan selama 3 menit, lalu dibilas dengan aquades.
3. Ditambahkan lugol, didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan alkohol.
4. Ditetesi fuchsin safranin sesaat lalu dibilas dengan aquades kemudian dikering anginkan.

5. Diamati pada mikroskop dengan perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi (Agustina dkk, 2007).

3.6.5.5 Pembuatan Suspensi

1. Diambil dengan jarum ose bakteri *Streptococcus mutans* dari kultur yang diinokulasikan 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 %T 25 (Ardianti, 2016).

3.6.5.6 Pembuatan Kontrol

3.6.5.6.1 Kontrol Media

1. Disiapkan cawan petri, erlenmeyer yang berisi media cair, bunsen, dan korek api.
2. Dinyalakan bunsen menggunakan korek api.
3. Diambil erlenmeyer yang berisi media cair, dipanaskan mulut erlenmeyer didekat api.
4. Diambil cawan petri, lalu dipanaskan pinggirannya didekat api.
5. Kemudian dibuka cawan petri separuhnya, kemudian dituangkan media cair MHA ke dalam cawan (Semua dilakukan didekat api) (Mulyani, 2017).

3.6.5.6.2 Kontrol Bakteri

1. Disiapkan cawan petri, erlenmeyer yang berisi suspensi bakteri, media cair MHA, bunsen dan korek api.
2. Dinyalakan bunsen menggunakan korek api.

3. Diambil erlenmeyer yang berisi suspensi bakteri, lalu dipanaskan mulut erlenmeyer didekat api.
4. Diambil cawan petri, lalu dipanaskan pinggirannya didekat api.
5. Kemudian dibuka cawan petri separuhnya, kemudian dimasukkan 1 mL suspensi bakteri kedalam cawan.
6. Setelah itu dimasukkan media MHA ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL (Semua dilakukan didekat api) (Mulyani, 2017).

3.6.4.7 Pengujian Antibakteri

1. Disiapkan alat dan bahan.
2. Dimasukkan suspensi bakteri ke dalam cawan petri yang sudah steril sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet.
3. Kemudian ditambahkan media *Mueller Hinton Agar* sebanyak 15 mL, setelah itu digoyang-goyangkan sesuai angka delapan dan dibiarkan memadat.
4. Dibuat lubang sumuran pada 3 cawan petri yang sudah diberi suspensi bakteri dan media dengan menggunakan bor (pelubang) dengan ukuran 8mm steril pada tengah cawan petri, lalu dilakukan perlakuan pada masing-masing cawan petri yaitu :

Ekstrak : 3 cawan petri yang telah dibuat lubang sumuran kemudian diisi dengan ekstrak kental etanol 70% daun teh-tehan sampai memenuhi lubang sumuran dan dilakukan didalam LAF (*Laminar Air Flow*).
5. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Dihitung diameter zona bening atau zona hambatnya (Afifi dan Erlin, 2017).

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 sangat kuat, kuat, sedang, atau lemah dalam menghambat pertumbuhan bakteri.