

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental laboratorium. Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang telah di ekstrak dengan pelarut etanol 96% dan etil asetat, kemudian di uji aktivitasnya terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dengan menggunakan metode cakram dan diukur zona hambat.

B. Tempat penelitian

- a. Penelitian ini akan dilaksanakan di laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro untuk determinasi tanaman.
- b. Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo untuk proses pembuatan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) serta penapisan fitokimia.
- c. Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo, untuk uji aktivitas antibakteri ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dengan metode cakram.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.)

2. Sampel ekstrak etanol 96% dan etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang diambil dari daerah Dieng, Wonosobo.

D. Definisi Operasional

1. Variabel Bebas

Variasi dua pelarut etanol 96% dan etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan konsentrasi 5% b/v, 10% b/v dan 15% b/v

2. Variabel Tergantung

Diameter zona hambat ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dari penelitian ini yaitu simplisia bunga telang, cara pembuatan ekstrak, pelarut yang digunakan, media pertumbuhan, suhu inkubasi, lama inkubasi, metode pengujian antibakteri.

E. Pengumpulan Data

1. Alat penelitian

- a. Alat untuk Ekstraksi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) digunakan Neraca digital (*Ohaus*), alat-alat gelas (*pyrex*), kertas saring, ayakan 80 mesh corong kaca, erlenmeyer, gelas ukur, rotary evaporator (RE 100-Pro), *waterbath* (*Mammert*).
- b. Alat untuk uji aktivitas antibakteri meliputi *Laminar Air Flow*, cawan petri, jarum ose, autoklaf, incubator (*Memmert*), oven (*Memmert*), pipet ukur, lampu spiritus, aluminium foil.

2. Bahan Penelitian

a. Bahan simplisia

Pada penelitian ini bahan yang akan digunakan adalah bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan spesifikasi warna biru yang diambil dari daerah Kabupaten Dieng, Wonosobo.

b. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain etanol 96% (*Merck*), etil asetat, n-butanol, asam asetat, aquadest, H₂SO₄ pekat, CH₃COOH 0,5N, nutrien agar (NA), NaCl 0,9%, BaCl₂ 1%, H₂SO₄ 1%, Clindamycin 500 mg, Aqua pro injeksi.

3. Prosedur Penelitian

a. Determinasi Tanaman

Determinasi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Hasil determinasi ini digunakan untuk menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan untuk menjamin kebenaran jenis atau spesies tanaman.

b. Penyiapan Simplisia

Tanaman bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) diperoleh dari daerah Yogyakarta, bagian yang diambil adalah bunganya. bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan sortasi untuk memisahkan kotoran-kotoran sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji,

kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu diangin-anginkan hingga tidak terdapat sisa air. Bunga telang dipotong-potong lalu dikeringkan dan kemudian dihaluskan dengan blender, setelah diblender didapatkan serbuk halus kemudian diayak menggunakan pengayak nomor 18 kemudian dilakukan ekstraksi.

c. Pembuatan Ekstrak

Ekstrak bunga telang dibuat dengan menggunakan metode maserasi dengan cara ditimbang sebanyak 300 gram serbuk simplisia kering dan kemudian dilakukan ekstraksi dengan menggunakan perbandingan 1:10. Diukur etanol 96% sebanyak 3.000 ml. pemilihan etanol 96% bertujuan untuk menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal dan mudah berpenetrasi ke dalam sel serta mampu menarik semua zat aktif baik yang bersifat polar, semipolar, maupun nonpolar dan kadar toksisitas rendah.

Maserat dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan ditempat sejuk, yang terlindungi dari cahaya selama 2 hari, diendapkan, dituang, dan disaring. Maserat disuling dan diluapkan pada tekanan rendah sampai konsentrasi yang dikehendaki (Arief, 2007).

Maserasi dilakukan dengan pelarut etanol 96% dan pelarut etil asetat masing-masing 1,5 L di dalam wadah terhindar dari cahaya selama 2 hari sambil sesekali diaduk. Kemudian maserat yang diperoleh disaring dan dilakukan maserasi dengan sisa pelarut etanol hingga warna pelarut etanol bening yang menandakan pelarut tersebut

sudah tidak bisa menarik senyawa yang terdapat dalam simplisia. Hasil maserat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 78 °C hingga diperoleh ekstrak etanol bunga telang (Riyanto *et al*, 2019).

kemudian untuk rendemen ekstrak dihitung dengan rumus :

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak Pekat (g)}}{\text{Bobot Bahan Sampel (g)}} \times 100\%$$

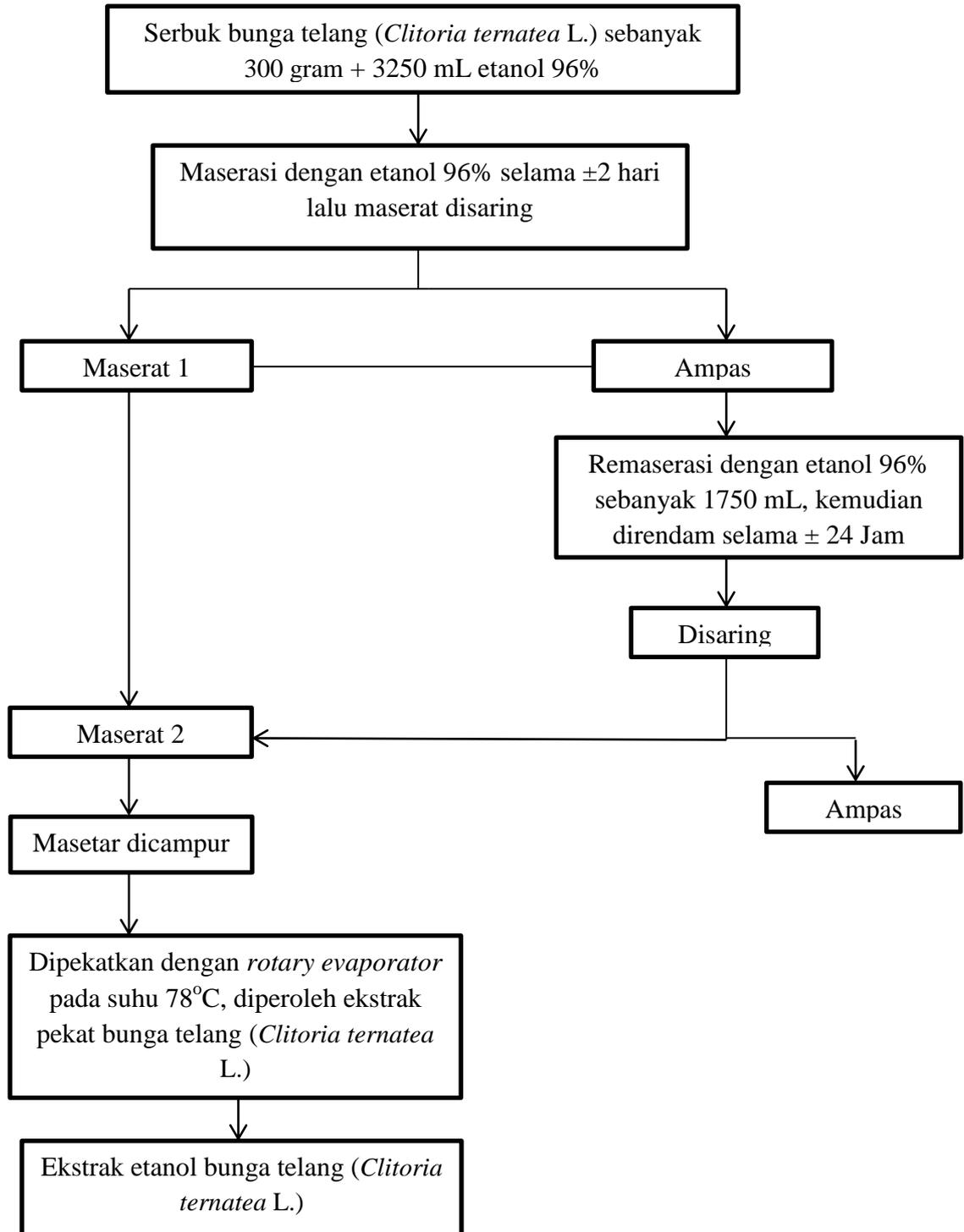
d. Uji bebas Etanol

Ekstrak ditambah dengan 2 tetes H₂SO₄ pekat lalu ditambah dengan 1 ml CH₃COOH 0,5 N lalu dipanaskan. Hasil negatif bila tidak tercium bau khas ester dan ditandai dengan terjadinya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan (Kurniawati, 2015).

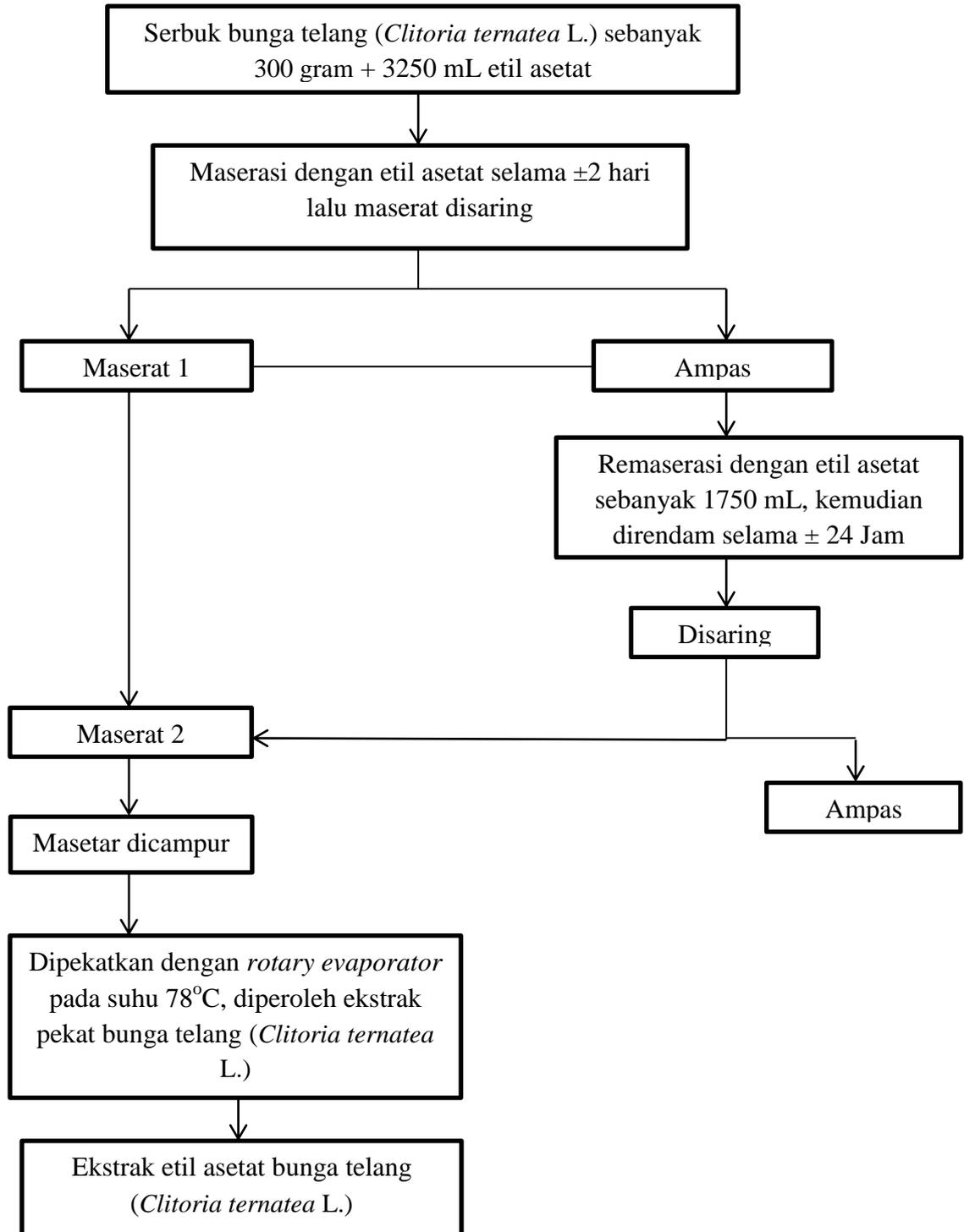
e. Penetapan susut pengeringan

Susut pengeringan adalah kadar bagian yang menguap suatu zat. Susut pengeringan ditetapkan sebagai berikut : ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1 g dan dimasukkan kedalam botol timbangan dangkal tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105 °C selama 30 menit dan telah ditara. Ekstrak diratakan dengan bantuan pengaduk kemudian dimasukkan kedalam oven, dibuka tutupnya, panaskan pada suhu 100 °C sampai dengan 105 °C. Timbang dan ulangi pemanasan sampai didapat berat yang konstan. Sebelumnya setiap penimbangan biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam desikator hingga suhu kamar (Rivai *et al*, 2013).

$$\text{susut pengeringan} = \frac{\text{Berat zat yang dipanaskan (g)}}{\text{Berat ekstrak awal (g)}} \times 100\%$$



Gambar 3.1 Skema ekstraksi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) menggunakan pelarut etanol 96%



Gambar 3.2 Skema ekstraksi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) Menggunakan pelarut etil asetat

f. Penapisan fitokimia

1) Uji flavonoid

Sampel diambil 0,1 gram ditambahkan metanol sampai terendam lalu panaskan hasil fitratnya ditambahkan H_2SO_4 . Reaksinya positif ditandai dengan adanya perubahan warna dari kuning kehijauan menjadi warna merah (Harborne, 1987).

2) Uji tanin

Larutan hasil ekstraksi dalam tabung reaksi ditambahkan dengan larutan gelatin 1%, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih (Harborne, 1987)

3) Uji fenolik

Larutan hasil ekstraksi dimasukkan kedalam tabung teaksi, tambahkan pereaksi $FeCl_3$ dalam etanol, hasil positif ditandai dengan adanya warna hijau, merah ungu, biru dan hitam.

g. Pengujian Ekstrak terhadap bakteri

1) Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu $121\text{ }^\circ\text{C}$ selama 15-20 menit, semua alat dan bahan sebelum disterilisasi dibungkus terlebih dahulu dengan alumunium foil. Untuk bahan yang terbuat dari karet seperti karet pipet tetes disterilisasi dengan cara direbus. Untuk larutan uji/ medium sterilkan dengan cara memasukkan larutan uji/medium ke dalam wadah yang sesuai yaitu tabung reaksi atau erlenmeyer, kemudian

sumbat wadah tersebut dengan sumbat yang sesuai atau dengan kapas, kemudian disterilisasi di autoklaf.

2) Pembuatan media pertumbuhan bakteri

Pada pembiakan bakteri menggunakan media digunakan Nutrient agar (NA). Serbuk NA sebanyak 23 gram dilarutkan dalam 1 liter aquadest dan dipanaskan hingga semuanya larut. Lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

3) Inokulasi bakteri pada media agar

Bakteri uji *Propionibacterium acnes* diambil dengan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media agar dengan cara menggoreskan. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

4) Identifikasi bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan pengecatan gram, dari bahan pemeriksaan akan dibuat sediaan dari bahan kaca object glass, kemudian diwarnai dengan prinsip pewarnaan Gram, dan diamati dibawah mikroskop. Bakteri gram positif terlihat dengan warna ungu sedangkan bakteri gram negatif terlihat berwarna merah muda, langsung ke bakteri *Propionibacterium acnes*.

Propionibacterium acnes merupakan bakteri Gram positif fakultatif anaerob berbentuk basil pleomorfik, tidak membentuk spora, tidak tahan asam, dan tidak bisa bergerak yang memiliki panjang 3-4 µm dan lebar 0,5-0,8 µm (Rahim *et al*, 2010). Secara

makroskopis Ciri-ciri dari bakteri *Propionibacterium acne* adalah berbentuk batang tak teratur yang terlihat pada pewarnaan Gram positif. Bakteri ini dapat tumbuh di udara dan tidak menghasilkan endospora. Bakteri ini dapat berbentuk filamen bercabang atau campuran antara bentuk batang/filamen dengan bentuk kokoid. *Propionibacterium acne* memerlukan oksigen mulai dari aerob atau anaerob fakultatif sampai ke mikroaerofilik atau anaerob. Beberapa bersifat patogen untuk hewan dan tanaman (Pramasanti, 2008).

5) Pembuatan larutan uji

a) Larutan kontrol positif

Pembuatan kontrol positif clindamycin dengan cara 0,01% b/v dibuat dengan cara menimbang 0,1 gram Clindamycin dan dilarutkan dengan aquadest sampai 10 ml.

b) Larutan kontrol negatif

Larutan kontrol negatif yang digunakan sesuai dengan pelarut yang digunakan pada pembuatan konsentrasi ekstrak yaitu aqua pro injeksi.

c) Konsentrasi ekstrak bunga telang

Berdasarkan penelitian (Riyanto,2019) tentang aktivitas antibakteri ekstrak bunga telang terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* menyatakan bahwa konsentrasi 100% (tanpa pengenceran), dimulai dari konsentrasi 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% dan 10% (Depkes RI, 2000) dapat menghambat aktivitas

bakteri *Propionibacterium acnes* dengan rata-rata zona hambat tertinggi pada konsentrasi 100% tetapi jika dilihat secara keseluruhan maka semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi zona hambatnya. Pada penelitian ini peneliti menggunakan konsentrasi terkecil untuk menguji aktivitas antibakteri dari bunga telang terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%.

6) Pembuatan larutan konsentrasi

a) Konsentrasi 5 % b/v

Pembuatan ekstrak bunga telang adalah dengan cara ditimbang ekstrak sebanyak 500 mg, kemudian dilarutkan dengan aqua pro injeksi sampai 10 ml.

b) Konsentrasi 10 % b/v

Pembuatan ekstrak bunga telang adalah dengan cara ditimbang ekstrak sebanyak 1000 mg, kemudian dilarutkan dengan aqua pro injeksi sampai 10 ml.

c) Konsentrasi 15 % b/v

Pembuatan ekstrak bunga telang adalah dengan cara ditimbang ekstrak sebanyak 1500 mg, kemudian dilarutkan dengan aqua pro injeksi sampai 10 ml.

d) Konsentrasi kontrol positif 0,1%

Pembuatan kontrol positif adalah dengan cara serbuk clindamycin 500 mg ditimbang sebanyak 0,16 mg, kemudian dilarutkan dengan aqua pro injeksi sampai 10 ml.

Menurut Reksi Sundu *et al.*, (2018) kontrol positif menggunakan clindamycin 0,1%

Perhitungan stok clindamycin :

Stok konsentrasi clindamycin 0,1%

$$1000 \text{ ppm} = 1 \text{ mg/L}$$

$$= 1 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$= \frac{1 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$= 0,1 \text{ mg}$$

$$= \frac{\text{Berat 1 tablet} \times 0,1 \text{ mg}}{\text{Kandungan clindamycin}}$$

$$= \frac{500 \text{ mg} \times 0,1 \text{ mg}}{300 \text{ mg}}$$

$$= 0,16 \text{ mg ad } 10 \text{ ml}$$

7) Pengujian aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dilakukan dengan metode difusi cakram. Kertas cakram yang digunakan memiliki diameter lingkaran 6 mm. Sebanyak 0,5 mL suspensi bakteri dimasukkan ke dalam cawan petri steril, kemudian ditambahkan 10 mL *Nutrient agar* cair. Diambil bakteri *Propionibacterium acnes* dari biakan dituangkan pada cawan petri digoyangkan membentuk angka delapan. Pembuatan

media dilakukan didekat api. Setelah agar memadat, setiap cawan petri dibuat diagram 2 bagian. Kertas cakram steril dengan diameter 5 mm dan ketebalan yang sama diletakan dipermukaan agar dengan jarak yang sama dengan yang lainnya. Berdasarkan penelitian (Mariani 2018), sebelum diletakkan ke permukaan media pada kertas cakram tersebut diinjeksikan 100 μ L sampel ekstrak dengan konsentrasi 5%, 10% dan 15%, kontrol positif dan kontrol negatif kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji antibakteri dilakukan pengulangan 3 kali. Area jernih di sekeliling cakram menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri yang kemudian diukur menggunakan jangka sorong.

Hasil penelitian telah diperoleh dan membuktikan terdapat diameter zona hambat pada beberapa perlakuan. Zona bening disekitar zat antimikroba merupakan kekuatan hambatan zat antimikroba terhadap penghambatan pertumbuhan mikroorganisme, ditunjukkan dengan adanya diameter zona hambat atau daerah transparan disekitar disk pada pertumbuhan bakteri. Zona hambat yang dihasilkan hanya bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan tidak bersifat membunuh bakteri (bakterisidal). Hal ini ditunjukkan dengan mengecilnya ukuran zona hambat setelah fasa logaritmik dari bakteri. (Marselia *et al.*, 2015).

8) Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri

Perlakuan yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri

Propionibacterium acnes sebagai berikut :

- a) Kontrol media : 10 mL media NA
- b) Kontrol pertumbuhan : 10 mL media NA + 100 μ L suspensi bakteri
- c) Kontrol negatif : 10 mL media NA + 100 μ L suspensi bakteri + 100 μ L aqua pro injeksi
- d) Kontrol positif : 10 mL media NA + 100 μ L suspensi bakteri + Clindamycin 0,1 % b/v
- e) Perlakuan 1 : 10 mL media NA + 100 μ L suspensi bakteri + 100 μ L ekstrak bunga telang 5%
- f) Perlakuan 2 : 10 mL media NA + 100 μ L suspensi bakteri + 100 μ L ekstrak bunga telang 10%
- g) Perlakuan 3 : 10 mL media NA + 100 μ L suspensi bakteri + 100 μ L ekstrak bunga telang 15%

9) Penentuan Diameter Zona Hambat

Prosedur tersebut dapat dilihat nilai diameter zona hambat ekstrak bunga telang. Penentuan dilakukan terhadap ekstrak yang masih memiliki aktivitas zona hambat pada pengujian diameter daerah zona hambat sebelumnya dengan menggunakan metode difusi cakram. Ekstrak sampel uji kemudian dibuat dalam konsentrasi 5%,

10% dan 15% kemudian dilakukan uji aktivitas seperti prosedur diatas. zona bening disekitar zat antimikroba merupakan kekuatan hambatan zat antimikroba terhadap penghambatan pertumbuhan mikroorganismenya, ditunjukkan dengan adanya diameter zona hambat atau daerah transparan disekitar disk pada pertumbuhan bakteri. Zona hambat yang dihasilkan hanya bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan tidak bersifat membunuh bakteri (bakteriosidal). Hal ini ditunjukkan dengan mengecilnya ukuran zona hambat setelah fase logaritmik pada bakteri (Marselia *et al.*, 2015).

10) Analisis Data

Data diperoleh dari pengamatan diameter zona hambat ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) menggunakan perbandingan pelarut etanol 96% dan etil asetat terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

Data diamati pada masing-masing konsentrasi dan didapatkan diameter zona hambat kemudian dianalisis dengan menggunakan SPSS 24.0 for Windows dengan taraf kepercayaan 95%. Data diuji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk* dan uji *Levene test* untuk mengetahui homogenitas data. Hasil analisa data memiliki nilai signifikan $p > 0,05$ pada uji *Saphiro Wilk* dan *Levene test* artinya data terdistribusi normal dan memiliki nilai signifikan $p < 0,05$ artinya terdapat perbedaan.

Analisis bivariat yaitu analisis yang digunakan untuk menganalisis dua variabel yaitu variabel independen dan dependen yaitu untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Dilakukan uji *One way* ANOVA dengan interpretasi uji statistic.

