

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental dengan melakukan analisis pada data aktivitas antibakteri dari berbagai konsentrasi ekstrak etanol dan ekstrak metanol daun bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) terhadap bakteri *Escherichia coli* ESBL.

#### **3.2. Populasi dan Sampel**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun bunga telang (*Clitoria ternatea L.*). Daun dari tanaman bunga telang yang digunakan diambil dari Kecamatan Baki, Sukoharjo, Jawa Tengah. Tanaman bunga telang dideterminasi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) daerah Karanganyar, Jawa Tengah.

#### **3.3. Instrumen Penelitian**

##### **3.3.1. Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah neraca analitik (Acis BC 500), bejana maserasi, blender (Philip), *waterbath*, *rotary evaporator* (IKA HB 10 basic), cawan penguap, mikropipet (Oragon), pipet volume, gelas ukur, bekglas, cawan petri, korek api, jarum ose, mikroskop binokuler (Novel), pipet tetes, tabung reaksi, rak

tabung reaksi, kapas lidi steril, inkubator, kertas label, kertas saring, oven (Memert), *autoclave (All american)* dan jangka sorong.

### 3.3.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun bunga telang, bakteri *Escherichia coli ESBL*,  $\text{FeCl}_3$  10%, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media Nutrien Agar, *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mac Conkey*, *Kliger Iron Agar* (KIA), *Sulfide Indole Motility* (SIM), Urea, Citrat, *Methyl Red* (MR), *Voges Proskauer* (VP), *Phenyl Alanin Deaminase* (PAD), Glukosa, Maltosa, Manitol, Laktosa dan Sakarosa.

Bahan kimia yang digunakan antara lain etanol 96%, metanol, *Mayer, Wagner, Dragendorf*, HCl, serbuk Mg, anhidrida asetat, kloroform, antibiotik Gentamisin, spiritus, *blank paper disc*, aquadest, pelarut *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) 10%, cat gram A, cat gram B, cat Gram C, cat Gram D, minyak emersi, NaCl 0,9%, reagen *Kovac, methyl red*, KOH 40% dan alkohol mikroskop.

### 3.4. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dan ekstrak metanol dari daun bunga telang dengan seri konsentrasi yang berbeda yaitu 25%, 50% dan 100%.
- b. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol dan ekstrak metanol daun bunga telang.

- c. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Escherichia coli* ESBL, kondisi percobaan dan laboratorium serta media yang digunakan untuk penelitian.

### 3.5. Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol daun bunga telang adalah hasil ekstraksi dari daun bunga telang dengan menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dilanjutkan dengan penguapan pada *waterbath* hingga didapatkan ekstrak yang lebih kental. Ekstrak selanjutnya dibuat dalam konsentrasi 25%, 50% dan 100%.
- b. Ekstrak metanol daun bunga telang adalah hasil ekstraksi dari daun bunga telang dengan menggunakan pelarut metanol 96% kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dilanjutkan dengan penguapan pada *waterbath* hingga didapatkan ekstrak yang lebih kental. Ekstrak selanjutnya dibuat dalam konsentrasi 25%, 50% dan 100%.
- c. *Escherichia coli* yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri resisten terhadap beta laktam yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional.
- d. Zona Radikal merupakan daerah disekitar disk, dimana tidak ditemukan pertumbuhan bakteri yang berarti pertumbuhan bakteri dapat dihambat seluruhnya atau bakteri tersebut sensitif terhadap bahan uji.

- e. *Zona irradikal* menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri tidak seluruhnya dapat dihambat seluruhnya sehingga masih ditemukan beberapa koloni yang tumbuh disekitar disk.

### **3.6. Rencana Jalannya penelitian**

#### **3.6.1. Determinasi Tanaman Bunga Telang**

Tahapan pertama pada penelitian ini adalah memastikan kebenaran dari tanaman bunga telang yang dilihat dari morfologinya. Tanaman bunga telang dideterminasi terlebih dahulu di B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar.

#### **3.6.2. Pembuatan serbuk daun bunga telang**

Daun bunga telang yang telah dipilih dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran yang menempel, kemudian ditiriskan dan dipotong-potong. Daun bunga telang yang sudah dipotong kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C. Daun bunga telang yang telah kering kemudian diblender dan diayak dengan ayakan ukuran yang sesuai.

#### **3.6.3. Pembuatan ekstrak daun bunga telang**

Serbuk daun bunga telang masing - masing 300 gram direndam dengan pelarut etanol 96% dan metanol sebanyak 2,25 liter (1:7,5) didalam bejana maserasi kemudian dibiarkan selama 5 hari sambil sesekali diaduk dan ditutup rapat. Hasil maserasi disaring, kemudian bagian ampas dibilas kembali dengan masing-masing pelarut sampai 10

bagian (1:10) dan dibiarkan selama 2 hari. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, dan dilanjutkan dengan penguapan pada *waterbath* sampai diperoleh ekstrak kental (Anief, 2006).

#### **3.6.4. Skrining fitokimia**

##### **a. Uji Flavanoid**

Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 ml aquadest dan dipanaskan selama 5 menit. Hasilnya kemudian disaring dan ditambahkan dengan serbuk Mg serta HCl pekat. Hasil uji dikatakan positif apabila terbentuk warna merah, kuning atau jingga .

##### **b. Uji Alkaloid**

Sebanyak 0,1 gram ekstrak kental dilarutkan kedalam 10 ml kloroform dan 4 tetes NH<sub>4</sub>OH kemudian disaring. Hasil filtrat kemudian ditambahkan 10 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam (bagian atas) diambil dan diujikan dengan reagen *mayer* dan *dragendorf*. Hasil positif ditunjukkan dengan munculnya endapan putih pada uji *mayer*, dan endapan jingga pada uji *dragendorff*.

##### **c. Uji Steroid Terpenoid**

Sebanyak 0,1 gram ekstrak kental dilarutkan dengan metanol kemudian diuapkan diatas *waterbath*. Hasilnya ditambahkan dengan kloroform, 10 tetes anhidrida asam asetat dan 3 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Munculnya warna hijau menunjukkan positif steroid, sedangkan bila

timbul cincin kecoklatan pada perbatasan 2 pelarut menunjukkan positif terpenoid.

**d. Uji Fenolik**

Sebanyak 0,1 gram sampel ditambahkan 20 ml metanol dan dikocok, kemudian diambil 1 ml larutan tersebut dan ditambahkan 2 tetes  $\text{FeCl}_3$ . Hasil dikatakan positif bila terbentuk warna hijau atau kebiruan.

**e. Uji Tanin**

Sebanyak 0,1 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 ml air panas dan dididihkan selama 5 menit. Larutan tersebut kemudian disaring dan ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna hijau kehitaman.

**f. Uji Saponin**

Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 ml air panas dan dididihkan selama 5 menit. Hasilnya disaring dan dilakukan pengocokan selama 10 detik kemudian didiamkan selama 10 menit. Dilakukan penambahan 1 ml  $\text{HCl}$  2M pada larutan tersebut. Munculnya busa yang stabil menunjukkan hasil uji positif (Nugrahani, Andayani *and* Hakim, 2016).

**3.6.5. Sterilisasi**

Alat-alat yang digunakan seperti gelas ukur, cawan petri, bekgelas, tabung reaksi dan kapas lidi disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu  $170^\circ\text{C}$ - $180^\circ\text{C}$  selama 2 jam, sedangkan

alat-alat seperti jarum ose dilakukan sterilisasi dengan metode pemanasan langsung. Media yang digunakan disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

### **3.6.6. Uji Karakterisasi bakteri *Escherichia coli* ESBL**

#### **a. Pengecatan gram**

Pembuatan preparat dilakukan dengan cara menyiapkan obyek glas yang bersih dan kering, kemudian diatas obyek glas tersebut diletakan NaCl 0,9% steril. Diinokulasikan bakteri uji dengan menggunakan ose yang telah disterilkan kemudian dihomogenkan dan dibiarkan kering, setelah kering selanjutnya dilakukan tahap fiksasi. Hasil preparat yang telah dibuat kemudian digenangi dengan larutan kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit. Setelah 1 menit cuci preparat tersebut dengan air, kemudian lanjutkan dengan menggenangi preparat dengan larutan iodin selama 1 menit. Bilas preparat dengan air secara perlahan, kemudian lakukan *decolorisasi* dengan alkohol hingga bersih.

Tahap selanjutnya adalah memberikan larutan safranin dan dibiarkan selama 45 detik, kemudian dibilas hingga bersih dan dikeringkan. Preparat yang telah dibuat kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Bakteri *Escherichia coli* bersifat gram negatif ditandai dengan bentuk batang dan warna merah.

**b. Inokulasi bakteri pada media *Mac Conkey***

Bakteri uji diinokulasikan kedalam media *Mac Conkey* dengan menggunakan ose bulat. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dilakukan pengamatan koloni yang terbentuk pada media tersebut. *Escherichia coli* membentuk koloni bulat dan berwarna merah pada media *Mac Conkey*.

**c. Uji Biokimia****1) Uji *Kliger Iron Agar/Triple Sugar Iron Agar (KIA/TSIA)***

Bakteri uji diinokulasikan kedalam media KIA/TSIA dengan cara inokulasi tusuk dan gores menggunakan ose lurus kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

**2) Uji *Sulfide Indole Motility (SIM)***

Bakteri uji diinokulasikan kedalam media SIM dengan menggunakan ose lurus kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. hasil inkubasi kemudian dilakukan pengamatan antara lain:

- a) Motil: hasil positif ditandai dengan adanya pertumbuhan yang menyebar disekitar tusukan atau permukaan media menjadi keruh.
- b) Indol: hasil positif ditandai dengan terbentuknya cincin warna merah pada bagian atas media setelah ditambahkan 5 tetes reagen kovac.

c)  $H_2S$  : hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hitam pada media.

### **3) Uji Urea**

Bakteri uji diinokulasikan kedalam media Urea dengan menggunakan ose lurus kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}C$  selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna media menjadi merah.

### **4) Uji Citrat**

Bakteri uji diinokulasikan kedalam media Citrat dengan menggunakan ose lurus secara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}C$  selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna biru pada media.

### **5) Uji *Methyl Red* (MR)**

Bakteri uji diinokulasikan kedalam media MR dengan menggunakan ose lurus. Inkubasi pada suhu  $37^{\circ}C$  selama 24-48 jam. tambahkan 5 tetes reagen *methyl red* kedalam hasil inkubasi tersebut. Adanya warna merah menunjukkan hasil uji positif.

### **6) Uji *Voges proskauer* (VP)**

Bakteri uji diinokulasikan kedalam media VP dengan menggunakan ose lurus kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}C$  selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah pada media setelah ditambahkan 10 tetes reagen *barried* dan 4 tetes reagen KOH 10%.

### **7) Uji *Phenyl Alanin Deaminase (PAD)***

Bakteri uji diinokulasikan kedalam media PAD dengan menggunakan ose lurus kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau pada media setelah ditambahkan HCl 0,1N sampai berwarna kuning dan 5 tetes FeCl<sub>3</sub> 10%.

### **8) Uji Fermentasi Karbohidrat**

Bakteri uji diinokulasikan kedalam media gula-gula (glukosa, manitol, maltosa, laktosa dan sakarosa) dengan menggunakan ose lurus kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna kuning pada media (Angraini, Aliza *and* Mellisa, 2016).

#### **3.6.7. Pembuatan suspensi bakteri**

Bakteri uji diinokulasikan kedalam NaCl 0,9% steril secara aseptis dengan menggunakan ose bulat kemudian dihomogenkan. Hasil suspensi tersebut dibandingkan kekeruhannya dengan standar *Mac Farland*.

#### **3.6.8. Pengujian konfirmasi *Escherichia coli ESBL***

Pengujian konfirmasi pada *Escherichia coli* penghasil *ESBL* dilakukan dengan metode difusi cakram berdasarkan panduan dari *Clinical and Laboratory Standard Institute*. Bakteri diinokulasikan pada seluruh permukaan media *Mueller Hinton Agar (MHA)*, kemudian kertas cakram yang berisi antibiotik Ceftazidim dan

Cefotaxime diletakkan diatas permukaan media tersebut. Hasil dari perlakuan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (CLSI, 2020).

### **3.6.9. Pengujian Antibakteri ekstrak etanol dan ekstrak metanol daun bunga telang secara difusi**

Suspensi bakteri diinokulasikan ke permukaan media MHA dengan menggunakan kapas lidi steril secara merata. Media didiamkan selama 10 menit agar bakteri dapat berdifusi kedalam media. Media yang telah siap digunakan kemudian diatasnya diletakan cakram yang berisi ekstrak etanol dan ekstrak metanol daun bunga telang masing-masing dengan konsentrasi 25%, 50% dan 100%. Kontrol positif dalam penelitian ini menggunakan antibiotik gentamisin, sedangkan untuk kontrol negatif digunakan DMSO . Medium yang telah diberi cakram kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil yang diperoleh kemudian dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk. Pengujian dilakukan sebanyak 3x replikasi. Aktivitas antibakteri dikategorikan kuat apabila memiliki zona hambat sebesar 15-20 mm. kategori sedang apabila zona hambat 10-14 mm dan kategori aktivitas lemah bila zona hambat <9 mm.

### 3.7. Analisa Data

Aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan metanol daun bunga telang (*Clitoria ternatea L*) terhadap bakteri *Escherichia coli* ESBL dilihat dari data diameter zona hambatnya berdasarkan hasil uji statistik *Anova* menggunakan aplikasi SPSS seri 22. Uji anova dilakukan atas dasar asumsi bahwa data terdistribusi normal dan variasi data homogen. Jika  $p < 0,05$  (ada beda nyata) pada uji anova maka analisis dilanjutkan uji *Duncan*. (Trisia, Philyria and Toemon, 2018)..