

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan menggunakan metode eksperimental laboratorium, mengenai uji daya hambat ekstrak herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm f.) Nees) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 35218 dan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian, Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Waktu yang digunakan untuk penelitian ini dimulai dari bulan juni 2016 sampai bulan juni 2017.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Subyek penelitian ini adalah biakan murni bakteri *Escherichia coli* ATCC 35218 dan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
2. Bahan uji yang digunakan adalah herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm f.) Nees) yang berasal dari Desa Mayungan, Kecamatan Banguntapan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a. Analisis Kandungan Kimia Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Variabel Bebas : Ekstrak etanol herba sambiloto
(*Andrographis paniculata (Burm f.) Nees*).

Variabel Tergantung : Nilai Rf pada plat KLT.

Variabel Terkendali : Waktu eluen mencapai batas plat.

b. Uji Aktivitas Antibakteri

Variabel bebas : Konsentrasi ekstrak etanol herba sambiloto
(*Andrographis paniculata (Burm f.) Nees*)
pada variasi pelarut.

Variabel tergantung : Nilai DZI masing-masing konsentrasi
ekstrak etanol herba sambiloto
(*Andrographis paniculata (Burm f.) Nees*).

Variabel terkendali : Media Agar TSA dan Mac. Conkey

2. Definisi Operasional

- a. Rf atau faktor retardasi adalah jarak yang ditempuh sampel dengan jarak yang ditempuh fase gerak. Nilai Rf ini kemudian dibandingkan dengan nilai Rf senyawa.
- b. DZI adalah diameter yang menunjukkan hambatan suatu senyawa antibakteri terhadap bakteri yang diuji dan dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

- c. Kadar Hambat Minimum adalah konsentrasi minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan melalui pengukuran DZI.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang akan digunakan meliputi: Alat-alat gelas (Pyrex), lampu UV 254 nm (Laboratorium Teknologi Farmasi UMY), timbangan analitik (Sartorius), aluminium foil (Giant), vortex (Labinco), *Laminar Air Flow* (Mettler Toledo), mikropipet (Gilson), propipet (Strumo), *Rotary Evaporator* (IKA RV10), *Thermostatic Waterbath* (Mettler), autoklaf (All American), (pinset, kapas lidi steril, ose steril Laboratorium Mikrobiologi UMY), bejana KLT (Camag).

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) yang berasal dari Desa Mayungan, Kecamatan Banguntapan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta, etanol 95% (Bratacho), aquades (Bratacho), Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck), pereaksi semprot vanilin asetat (Bratacho), pereaksi Dragendorf (Bratacho), pereaksi Mayer (Bratacho), HCl 2N (Merck), HCl pekat (Merck), infus steril NaCl 0,9%, bakteri *Escherichia coli* ATCC 35218 (Laboratorium Mikrobiologi UGM), bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Laboratorium Mikrobiologi UGM), siprofloksasin (Hexpharm), kloroform (Bratacho), HCl, aseton (Bratacho), eter P (Bratacho).

F. Cara Kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi herba sambiloto dilakukan di Laboratorim Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Pembuatan Ekstrak

Herba sambiloto (*Andrographis paniculata (Burm f.) Ness*) yang sudah bersih dan kering diayak dan dimasukkan kedalam wadah tertutup. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Simplisia yang telah diayak diambil 1 kg dan dimaserasi dengan menggunakan etanol 95% pada perbandingan bahan baku-pelarut 1:5 b/v. Setelah itu dilakukan penyarian selama 5 hari. Remaserasi dilakukan menggunakan pelarut etanol 95% perbandingan bahan baku dan pelarut 1:2 b/v. Remaserasi dilakukan selama 2 hari kemudian dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan kain flanel dan dilakukan penyaringan ulang menggunakan kertas saring sehingga didapatkan maserat. Maserat yang sudah didapat, dikumpulkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60⁰C hingga terbentuk ekstrak kental.

3. Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan suatu identifikasi golongan senyawa kimia yang terdapat dalam suatu simplisia. Uji fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini adalah:

- a. Identifikasi alkaloid

Sejumlah ekstrak sebanyak 2 mg dilarutkan etanol 5 mL lalu diuapkan diatas *waterbath*. Residu yang terbentuk dilarutkan dengan 6mL HCl 2N. Larutan dibagi menjadi 2 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi *Dragendorf*, tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi *Mayer*. Terbentuk endapan jingga pada tabung dan endapan kuning pada tabung dua menunjukkan adanya alkaloid.

b. Identifikasi saponin

Sejumlah ekstrak sebanyak 2 mg dilarutkan etanol 5 mL, ditambahkan 10 mL air panas, dipanaskan diatas *waterbath* selama 5 menit, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 menit, terbentuknya busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama 10 menit dalam tabung reaksi menunjukkan adanya senyawa golongan saponin.

c. Identifikasi Steroid dan Terpenoid

Sejumlah ekstrak sebanyak 2 mg dilarutkan etanol 5 mL, diuapkan menggunakan cawan porselin diatas *waterbath*. Residu yang terbentuk dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform dan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Kemudian ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat secara perlahan melalui dinding cawan porselin. Terbentuk cincin kecoklatan/violet menunjukkan adanya terpenoid. Tebentuknya cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid.

d. Identifikasi *Andrographolide* metode KLT

Ekstrak kental diencerkan etanol 95%. Selanjutnya dilakukan penotolan pada plat KLT silika gel G₆₀F₂₅₄. Plat KLT dielusi dengan fase gerak kloroform : etanol : aquades (4 : 2 : 2) v/v dengan jarak pengembangan 8 cm. Plat KLT yang telah diberi perlakuan dimasukan secara vertikal ke dalam bejana yang telah jenuh dengan fase gerak. Setelah fase gerak mencapai batas yang telah ditentukan pada plat KLT, selanjutnya dikeluarkan dari bejana dan dibiarkan mengering. Deteksi bercak hasil pemisahan menggunakan sinar tampak, lampu UV 254 nm. Bercak yang dihasilkan kemudian disemprot pereaksi vanilin asetat dan dibandingkan hRf hasil dengan hRf pembanding *andrographolide*.

4. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat gelas disterilkan menggunakan oven pada suhu 170⁰C selama 2 jam, media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Ose dan pinset disterilkan bunsen. *Luminar Air Flow* dibersihkan menggunakan alkohol 70%, lalu disterilkan lampu UV selama 15 menit.

b. Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan untuk pengujian adalah sediaan infus siprofloksasin 2mg/mL yang diubah konsentrasinya menjadi

1mg/mL. Larutan kontrol positif dibuat dengan cara 1 mL larutan siprofloksasin ditambahkan 1 mL *Aqua Pro Injection*.

c. Pembuatan Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO.

d. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat variasi konsentrasi 12,5%, 25%, 50%, 75% dan 100%. Pembuatan larutan uji dilakukan dengan cara pengenceran. Ekstrak herba sambiloto (*Andrographis paniculata (Burm f.) Nees*) dibuat larutan induk dengan konsentrasi 100% dengan cara melarutkan 2 gram ekstrak dengan 2 mL DMSO. Untuk membuat konsentrasi 50%, diambil 1 mL konsentrasi 100% ditambahkan DMSO sampai 2 mL. Konsentrasi 25%, diambil 1 mL konsentrasi 50% ditambahkan DMSO sampai 2 mL. Konsentrasi 25%, diambil 1 mL konsentrasi 50% ditambahkan DMSO sampai 2mL. Konsentrasi 12,5%, diambil 1 mL konsentrasi 25% ditambahkan DMSO sampai 2 mL. Konsentrasi 75% dibuat dengan cara melarutkan 0,75 gram ekstrak dengan 1 mL DMSO.

e. Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

Media agar yang digunakan berasal dari Mac Conkey Agar (MCA) dan *Trypticase Soy Agar (TSA)*. Pembuatan media Mac Conkey, sebanyak 26,5 gram serbuk MCA dilarutkan dalam 500 ml aquades. Selanjutnya diaduk hingga larut dan homogen menggunakan batang pengaduk kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada

suhu 121⁰C selama 15 menit. Media Mac Conkey dituangkan pada cawan petri dalam *Laminar Air Flow*, setelah memadat disimpan di lemari pendingin. Pembuatan media TSA, sebanyak 20 gram bubuk TSA dilarutkan dalam 500 ml aquades. Selanjutnya diaduk hingga larut dan homogen, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Media TSA dituang pada cawan petri dalam *Laminar Air Flow*, setelah memadat disimpan di lemari pendingin.

f. Preparasi Bakteri

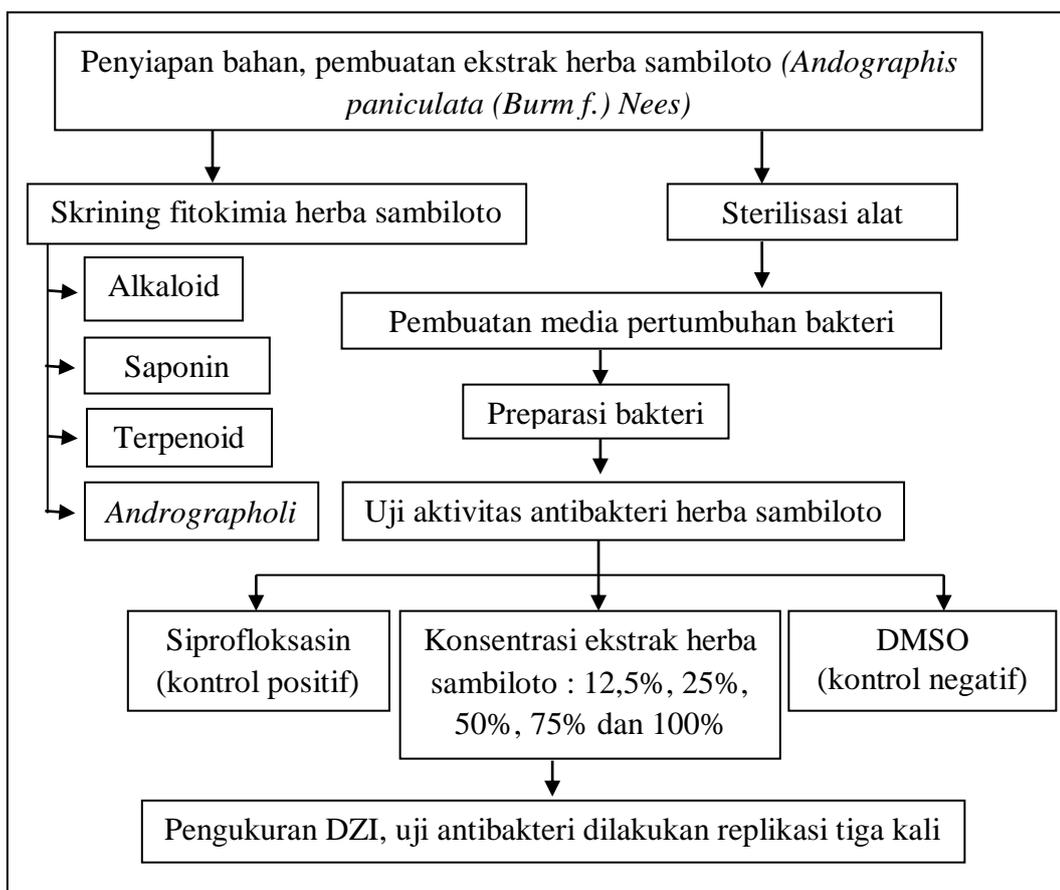
Sebanyak 2 koloni dari masing-masing bakteri *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diambil dan dimasukkan ke dalam NaCl 0,9% steril. Selanjutnya diinkubasi selama 2 hingga 4 jam pada suhu 37⁰C. Larutan suspensi bakteri diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan dengan BHI dengan perbandingan 1:9 dihomogenkan menggunakan *vortex*.

g. Uji Aktivitas Antibakteri

Suspensi bakteri diusap secara merata menggunakan kapas lidi pada cawan petri yang telah berisi media Agar. Kemudian rendam tujuh buah cakram kertas berdiameter 5mm selama 10-15 menit. Lima cakram kertas untuk setiap konsentrasi bahan uji (12,5%, 25%, 50%, 75%, dan 100%), satu cakram kertas untuk DMSO sebagai kontrol negatif dan satu cakram kertas untuk siprofloksasin 1mg/mL. Cakram kertas yang sudah direndam ditempelkan pada permukaan

media. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C didalam inkubator. Perlakuan ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk masing masing bakteri. Hasil dari uji dapat dilihat dengan terbentuknya diameter zona hambatan (DZI) disekitar cakram. DZI diukur menggunakan penggaris/jangka sorong.

G. Skema Langkah Kerja



Gambar 1. Skema Langkah Kerja

H. Analisis Data

1. Analisis Data Uji Fitokimia

Analisis kandungan senyawa aktif dari ekstrak herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm f.) Ness) dilakukan dengan cara membandingkan kesesuaian hasil reaksi pada identifikasi alkaloid, saponin dan terpenoid. Analisis kandungan *andrographolide* dilakukan dengan cara membandingkan kesesuaian warna bercak, hRf senyawa yang timbul setelah dilakukan elusi pada plat KLT dengan standar *andrographolide*.

2. Analisis Data Uji Antibakteri

Penentuan aktivitas daya hambat antimikroba mengacu pada tabel kategori kekuatan aktivitas antibakteri. Data hasil pengukuran diameter zona hambat dibandingkan dengan Tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasi Respon Zona Hambat Bakteri.

Diameter zona hambat	Respon hambatan pertumbuhan
>20 mm	Kuat
16 – 20 mm	Sedang
< 15 mm	Lemah

(Greenwood, 1995)

Data hasil pengukuran diameter zona hambat dianalisa secara statistik menggunakan metode *Kruskal Wallis*. Analisis statistik dilakukan untuk menguji ada tidaknya perbedaan nilai rata-rata secara signifikan variabel terikat pada dua atau lebih kelompok secara bersamaan. Perbedaan yang signifikan antara rata-rata kelompok jika probabilitas $<0,05$ (Walpole & Ronald, 1993).