

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium mengenai efek antibakteri bunga kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) terhadap berbagai bakteri penyebab diare yaitu *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholerae*.

#### B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian FKIK UMY dan Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY. Penelitian ini dilakukan kurang lebih 6 bulan dimulai dari September 2014 – Februari 2015.

#### C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

##### 1. Variabel Penelitian

- a. **Variabel bebas:** konsentrasi ekstrak bunga kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan)
- b. **Variabel tergantung:** Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM).
- c. **Variabel terkontrol:** bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella dysenteriae*, Jumlah bakteri, waktu inkubasi, suhu inkubasi bakteri.
- d. **Variabel tidak terkontrol:** zat aktif dalam bunga kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan).

##### 2. Definisi operasional

- a. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal masing-masing konsentrasi ekstrak bunga kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholerae* yang ditunjukkan melalui pengukuran Diameter Zona Inhibisi (DZI). Diameter Zona Inhibisi (DZI) adalah diameter yang menunjukkan hambatan suatu senyawa antibakteri terhadap bakteri yang diuji dan dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

b. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi minimal masing-masing fraksi ekstrak bunga kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) yang diperlukan untuk membunuh bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholerae*.

## D. Instrumen Penelitian

### 1. Alat Penelitian

**Tabel 1.** Alat - alat penelitian

No	Nama Alat	Sumber/Merek dan Tipe
1	Pisau	HB Stainless®
2	Blender	Philip

3	<i>Rotary Evaporator</i>	Heidolph®
4	Penangas	Akebonno®
5	Oven	Shimadzu®
6	Inkubator	Memmert®
7	Autoklaf	All American®
8	Propipet	Glasfirn®
9	Mikropipet	Gilson®
10	Timbangan analitik	Casbee®
11	Alat-alat gelas	Pyrex®
12	Kertas label	<i>Brand</i> ®
13	Kain hitam	
14	<i>Centrifuge</i>	Digisystem Laboratory Instruments®
15	<i>Laminar Air Flow (LAF)</i>	
16	Kapas lidi	
17	Ose steril	
18	<i>Paper disc</i>	
19	Pinset	

## 2. Bahan Penelitian

**Tabel 2.** Bahan-bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Sumber/Merek dan Tipe
1	Bunga kecombrang	Gombang, Kebumen Jawa Tengah
2	Siprofloksasin Infus	Novell Pharmaceutical Laboratories®

3	Etanol 70%	Mandiri Surya® /Grade Teknis
4	Koloni <i>Shigella dysenteriae</i>	Laboratorium FKIK UMY
5	Koloni <i>Vibrio cholera</i>	Laboratorium FKIK UMY
6	NaCl fisiologis	Laboratorium FKIK UMY
7	BHI	Laboratorium FKIK UMY
8	Aquadest	Laboratorium FKIK UMY
9	TSA	Laboratorium FKIK UMY

## E. Cara Kerja

### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi bunga kecombrang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

### 2. Penyiapan Bahan

Bunga kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan), yang telah dikumpulkan dibersihkan dari pengotor, selanjutnya dicuci di bawah air mengalir sampai bersih, ditiriskan, lalu dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam pada bagian permukaan hingga menjadi simplisia kering.

### 3. Ekstraksi

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi. Pertama simplisia kering bunga kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) dihaluskan dengan blender sehingga menjadi serbuk halus. Serbuk halus yang terbentuk selanjutnya direndam dengan pelarut etanol 70%. Perbandingan yang digunakan antara serbuk halus dengan pelarut adalah 1:7

(Depkes RI, 1979). Proses maserasi dilakukan selama 5 hari yang dilanjutkan dengan remaserasi selama 2 hari. Selama maserasi, sesekali serbuk digojog agar penyarian sempurna. Setelah 5 hari, rendaman serbuk disaring dan dipisah antara filtrat dengan ampas yang terbentuk. Filtrat yang telah dipisah diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai terbentuk ekstrak kental. Ampas yang terbentuk diremaserasi selama 2 hari. Proses untuk mendapatkan ekstrak kental dari remaserasi sama seperti pada proses maserasi. Untuk menghitung rendemen dari proses ekstraksi digunakan persamaan 2 berikut:

$$Rendemen = \frac{\text{Hasil ekstrak}}{\text{Berat serbuk}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

#### 4. Analisis Kandungan Kimia Dengan Metode KLT

Analisis ini dilakukan terhadap senyawa flavonoida, Flavonoid merupakan sejenis senyawa fenol terbesar yang banyak manfaatnya salah satunya adalah sebagai antibakteri (juliantina, 2008). Larutan uji dibuat 5% dalam pelarut etanol 70%. Selanjutnya plat KLT diberi 2 totolan, yaitu larutan uji dan larutan pembanding flavonoid untuk senyawa yang akan dianalisis. Plat KLT yang telah diberi perlakuan tersebut kemudian dimasukkan secara vertikal ke dalam bejana yang telah jenuh dengan fase gerak. Fase gerak akan mengelusi ekstrak tersebut melewati fase diam dan memisahkan sampel sesuai komponen-komponennya. Setelah fase gerak mencapai batas atas yang telah ditentukan pada plat KLT, selanjutnya plat dikeluarkan dari bejana dan dibiarkan mengering. Deteksi bercak hasil pemisahan dapat dilihat dengan lampu UV 254. Bercak pada larutan yang telah dipisahkan kemudian dibandingkan pada bercak larutan pembanding melalui perhitungan nilai R<sub>f</sub>. Fase gerak dan fase diam yang di gunakan pada pengujian ini adalah sebagai berikut:

Fase diam: Silika gel GF254

Fase gerak: butanol:asam asetat:air (3:1:1)

## **5. Pembuatan Medium TSA (*Trypton Soya Agar*)**

Medium yang digunakan untuk pembiakan bakteri uji adalah medium TSA. Sebanyak 125 gram TSA dilarutkan dalam 1 liter aquadest dan dipanaskan hingga semuanya menjadi larut. Kemudian dimasukan dalam beberapa cawan petri setelah itu di sterilkan dalam oven pada suhu 100 °C selama  $\pm$  15 menit. Kemudian media dimasukan ke dalam lemari es dalam keadaan sudah dingin.

## **6. Pembuatan Suspensi Bakteri**

Ambil beberapa koloni bakteri diambil dan dimasukkan ke dalam larutan NaCl fisiologis lalu digojok dengan menggunakan vortex sampai kelihatan tercampur merata. Selanjutnya inkubasi selama 2 hingga 4 jam pada suhu 37° C. Setelah itu larutan suspensi bakteri tersebut diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan dengan menggunakan nutrisi BHI dengan perbandingan 1 : 9 sambil dihomogenkan

## **7. Pengujian Aktifitas Antibakteri**

### **a. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)**

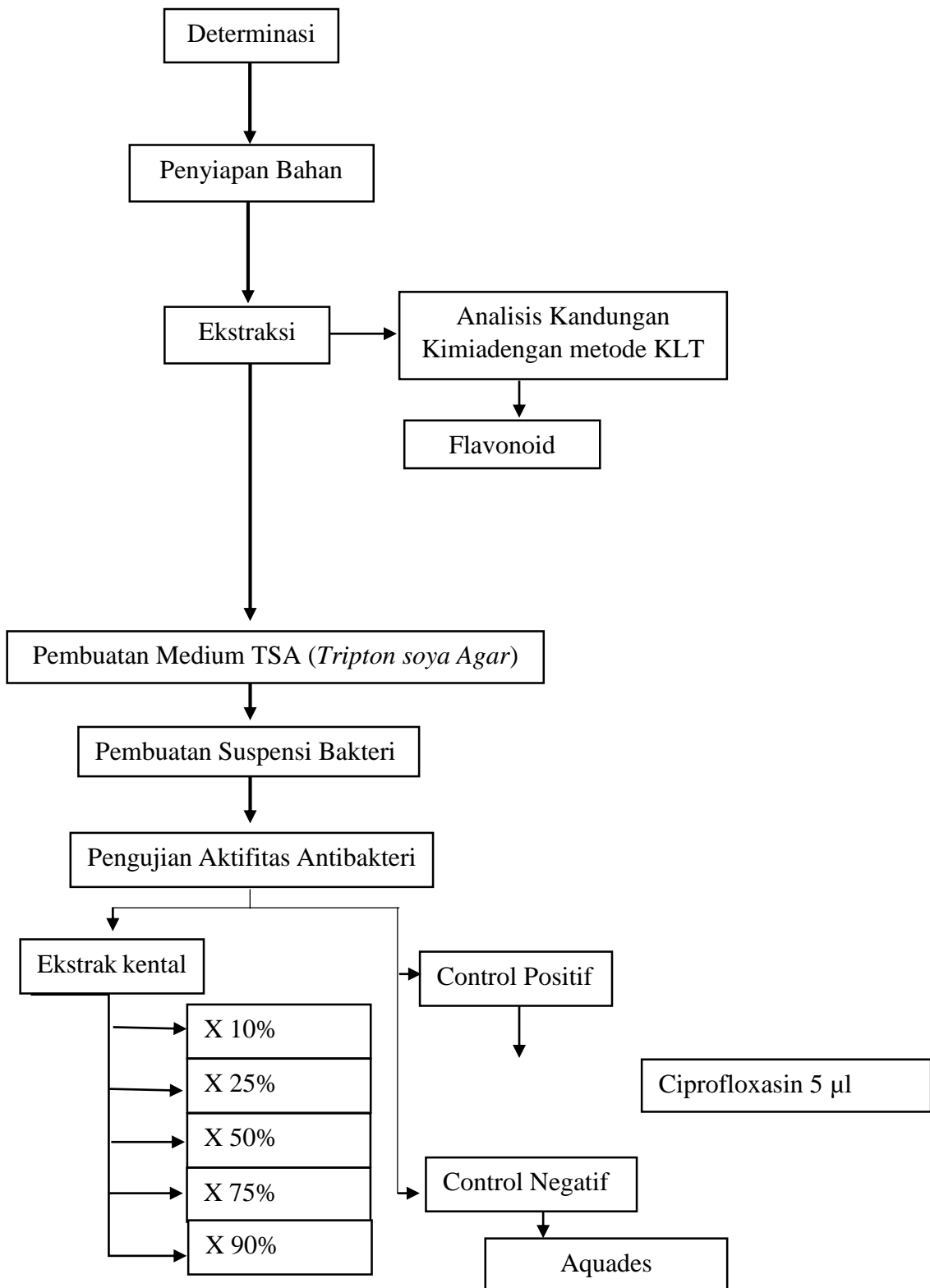
Ekstrak etanol bunga kecombrang dibuat dalam beberapa konsentrasi (10%, 25%, 50%, 75%, 90%). Pembuatan konsentrasi ekstrak di buat dengan cara mengambil beberapa gram ekstrak sesuai dengan konsentrasi yg di inginkan kemudian di larutkan menggunakan aquades yang telah di strilkan, setelah itu rendam *paper disk* ke dalam masing-masing konsentrasi tersebut. Suspensi bakteri diambil sebanyak 1 ml dengan menggunakan mikropipet lalu diletakan ditengah-tengah cawan petri berisi medium

TSA yang sudah memadat. Kemudian diputar-putar cawan petrinya hingga suspensi bakterinya merata. Ambil *paper disk* dengan pinset steril yang telah dipijarkan kemudian tanamkan *paper disk* yang telah direndam dalam masing-masing konsentrasi ekstrak tersebut dan aquadest sebagai control negatif. Dalam cawan tersebut ditanamkan 4 buah cakram dengan jarak minimal antara 28-30 mm, dan jarak minimal cakram dengan tepi cawan petri adal 20-25 mm, lalu diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu 37C, diamati dan diukur daerah hambatnya. Harga KHM dari masing-masing bakteri uji dinyatakan dalam konsentrasi terkecil yang masih memberikan daya hambat.

**b. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)**

Bakteri uji disiapkan dalam larutan NaCl fisiologis (*Shigella* dan *Vibrio*) kemudian dicampurkan dengan kaldu nutrient BHI dan dihomogenkan, siapkan 7 tabung (tabung 1-6 diisi dengan aquades 1 ml). Larutan stok bahan uji dimasukkan dalam tabung 1-5 dengan konsentrasi (10%, 25%, 50%, 75%, 90%) sebanyak 1 ml dan dihomogenkan. Kemudian dimasukkan control positif pada tabung positif (+) sebanya 1 ml, suspensi bakteri 1 ml kedalam tabung 1-6 dan tabung positif dan dihomogenkan, inkubasi semua tabung serta sisa suspensi bakteri pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Setelah itu oleskan bahan uji dalam masing-masing tabung tersebut pada medium TSA menggunakan ose steril yang telah dipijarkan dan beri tanda pada setiap goresan tersebut dan inkubasi selama 24 jam. Kemudian amati apakah ada bakteri yang tumbuh pada setiap goresan tersebut.

## F. Skema Langkah Kerja





## **G. Analisis Data**

Data hasil penelitian disajikan dengan membuat tabel hasil penelitian. Hasil tersebut kemudian dianalisis dengan membandingkan KHM dan KBM ekstrak bunga kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) dan kontrol positif Ciprofloksasin terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholerae*. Data penelitian ini juga dilakukan analisis statistik dengan uji *one way* ANOVA dengan program SPSS. *One way* ANOVA digunakan untuk menganalisis data dengan lebih dari 2 sampel yang berbeda dengan tingkat signifikansi 95%.