

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen untuk menganalisis pengaruh konsentrasi ekstrak daun sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hasil penelitian Hidana (2015) menyatakan bahwa konsentrasi minimal ekstrak daun sirsak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* adalah 20%. Penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 3 kali replikasi. Taraf perlakuan adalah varian konsentrasi ekstrak daun sirsak (20%, 40%, 60%, dan 80%), kontrol positif (antibiotik Ceftriaxone 10%), dan kontrol negatif (Dimetil Sulfoksida (DMSO) 10%).

Tabel 3.1. Rancangan Acak Lengkap (RAL)

Tarf Perlakuan (Konsentrasi Ekstrak Daun Sirsak)	Replikasi		
	1	2	3
P ₀ = Kontrol negatif (DMSO 10%)	X ₁₁	X ₂₁	X ₃₁
P ₁ = Kontrol positif (antibiotik Ceftriaxone 10%)	X ₁₂	X ₂₂	X ₃₂
P ₂ = Ekstrak daun sirsak 20%	X ₁₃	X ₂₃	X ₃₃
P ₃ = Ekstrak daun sirsak 40%	X ₁₄	X ₂₄	X ₃₄
P ₄ = Ekstrak daun sirsak 60%	X ₁₅	X ₂₅	X ₃₅
P ₅ = Ekstrak daun sirsak 80%	X ₁₆	X ₂₆	X ₃₆

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada tanggal 21 Februari 2024-15 Maret 2024 di Laboratorium Fitokimia dan Mikrobiologi Universitas Ma Chung yang berlokasi di Jalan Villa Puncak Tidar N-01 Malang 65151.

3.3. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun sirsak, Etanol 96%, akuades (Hydrobat), bakteri *Escherichia coli* (Duta Jaya), media *Nutrient Broth* (NB) (Merck), media *Muller Hinton Agar* (MHA) (Oxoid), Asam Sulfat (H₂SO₄) (Emsure), Barium Klorida (BaCl₂) (Merck), Natrium Klorida (NaCl), Besi III Klorida (FeCl₃), reagen Mayer, Dimetil Sulfoksida (DMSO) (Merck), antibiotik Ceftriaxone (OGB Dexta), kertas saring, dan kertas steril (kertas roti).

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah oven (Mettler), grinder, *ultrasonic bath* (Elma), *waterbath* (Mettler), neraca analitik (Ohaus), *Laminar Air Flow* (LAF), autoklaf (Hirayama), hotplate, inkubator (Ecocell), bunsen, loyang,

ayakan mesh 60, spatula, beaker glass 250 mL (Duran), corong, erlenmeyer 250 mL (Duran), cawan porselin, pipet ukur 10 mL (Pyrex), pipet tetes (Pyrex), batang pengaduk, tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur 100 mL (Duran), ose bulat, labu takar 100 mL (Duran), *catton swap* (Onemed), pinset, cawan petri, dan pematik api.

3.4. Variabel Penelitian

- Variabel bebas : Konsentrasi ekstrak daun sirsak
- Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

3.5. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Metode	Alat Ukur	Skala
Konsentrasi ekstrak daun sirsak	Ekstrak daun sirsak diperoleh dengan metode ultrasonik. Ekstrak daun sirsak dibagi menjadi 4 konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80%.	-	Neraca analitik	Rasio
Pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i>	Kemampuan dari ekstrak daun sirsak untuk menghambat pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona berwarna bening yang terdapat disekitar kertas cakram yang disebut dengan daya hambat. Daya hambat dikategorikan menjadi 4 yaitu: - Diameter zona hambat < 5 mm dikategorikan lemah. - Diameter zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang. - Diameter zona hambat 11-20 mm dikategorikan kuat. - Diameter zona hambat > 20 mm dikategorikan sangat kuat.	Difusi cakram	Penggaris/ jangka sorong	Ordinal

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pembuatan Simplisia dan Ekstrak Daun Sirsak

Daun sirsak dari Rejoyoso, Kec. Bantur sebanyak 500 g disortasi kering dan dicuci dengan air yang mengalir. Daun dipotong-potong dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 50 °C, hingga berubah warna dan bergemerisik saat diremas. Simplisia daun sirsak dihaluskan menggunakan grinder dan diayak menggunakan ayakan mesh 60, sehingga didapatkan serbuk simplisia.

Sebanyak 100 g serbuk simplisia dimasukkan dalam beaker glass dan ditambahkan dengan 1000 mL Etanol 96%. Diaduk hingga homogen dan diletakkan di atas *ultrasonic bath* selama 20 menit dengan suhu 45 °C. Selanjutnya diaduk hingga homogen dan dilakukan penyaringan, kemudian filtrat diuapkan pelarutnya menggunakan *waterbath* dengan suhu 50 °C, hingga didapatkan ekstrak kental (Handayani dkk., 2016)

3.6.2. Analisis Fitokimia Ekstrak Daun Sirsak

Sebelum dilakukan uji skrining fitokimia ekstrak daun sirsak, dilakukan preparasi terlebih dahulu. 500 mg ekstrak daun sirsak dilarutkan dengan Etanol 96% 50 mL dan diaduk hingga homogen (Harborne, 1987).

1. Alkaloid

Sebanyak 1 mL ekstrak daun sirsak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan reagen Mayer. Sampel mengandung alkaloid, apabila terdapat endapan berwarna putih.

2. Flavonoid

Sebanyak 1 mL ekstrak daun sirsak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan H₂SO₄ 2N sebanyak 2 tetes dan dikocok. Sampel mengandung flavonoid, apabila larutan berubah warna menjadi kuning, merah, atau coklat.

3. Saponin

Sebanyak 1 mL ekstrak daun sirsak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan akuades dan dikocok dengan kuat selama 10 detik. Sampel mengandung saponin, apabila buih tetap stabil selama 10 menit.

4. Tannin

Sebanyak 2 mL ekstrak daun sirsak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan FeCl₃ 1% sebanyak 2-3 tetes. Sampel mengandung tannin, apabila larutan berubah warna menjadi hijau kehitaman.

3.6.3. Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada Ekstrak Daun Sirsak

1) Sterilisasi Alat

Semua peralatan yang terbuat dari kaca dibungkus menggunakan kertas dan disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Sedangkan untuk ose bulat dan pinset disterilkan Etanol 70% dan pemijaran (Armaleni dkk., 2019).

2) Pembuatan Media

a. *Nutrient Broth* (NB)

Melarutkan 0,26 g media NB dalam 20 mL akuades, kemudian diaduk hingga homogen. Selanjutnya media NB dimasukkan dalam erlenmeyer dan disterilkan selama 15 menit dengan suhu 121 °C, kemudian media NB dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 10 mL dan dibiarkan hingga dingin.

b. *Muller Hinton Agar* (MHA)

Melarutkan 3,8 g media MHA dalam 100 mL akuades, kemudian dipanaskan hingga homogen dan mendidih. Selanjutnya media MHA dimasukkan dalam erlenmeyer dan disterilkan selama 15 menit dengan suhu 121 °C, kemudian media MHA dituangkan dalam cawan petri sebanyak 20 mL dan dibiarkan hingga memadat.

3) Pembuatan *Mc. Farland* 0,5

Memipet BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL dan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 mL, kemudian dikocok hingga homogen (Rosmania dan Yanti, 2020).

4) Peremajaan Bakteri *Escherichia coli*

Mengambil bakteri *Escherichia coli* menggunakan ose bulat dan dimasukkan dalam media NB, kemudian media NB dimasukkan dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37 °C (Fazriati dkk., 2020).

5) Pembuatan Suspensi Bakteri *Escherichia coli*

Mengambil biakan bakteri *Escherichia coli* pada media NB dan dimasukkan dalam larutan NaCl 0,9%. Kekeruhannya dibandingkan dengan *Mc. Farland* 0,5 (Misna dan Diana, 2016).

6) Pembuatan Varian Konsentrasi Ekstrak, Kontrol Positif, dan Kontrol Negatif

Ekstrak daun sirsak ditimbang sebanyak 0,2 g, 0,4 g, 0,6 g, dan 0,8 g, kemudian masing-masing dilarutkan dalam 1 mL DMSO 10%. Sehingga diperoleh varian konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik Ceftriaxone 10% (Kumalasari dkk., 2020). Ceftriaxone ditimbang

sebanyak 0,05 g dan dilarutkan dalam 1 mL DMSO 10%. Sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 10% (Pratiwi dkk., 2016). DMSO dipipet sebanyak 1 mL dan dilarutkan dalam 10 mL akuades.

7) Uji Daya Hambat

Pengujian daya hambat ekstrak daun sirsak dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Tahapan uji dimulai dengan inokulasi bakteri *Escherichia coli* pada media MHA menggunakan *catton swap*. Selanjutnya meletakkan kertas cakram yang telah direndam dalam varian konsentrasi ekstrak (20%, 40%, 60%, dan 80%), kontrol positif, dan kontrol negatif selama ± 15 menit pada media MHA dengan menggunakan pinset. Kemudian media MHA dimasukkan dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37 °C dengan posisi cawan terbalik. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Intan dkk., 2021).

3.7. Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data

Hasil analisis fitokimia ekstrak daun sirsak disajikan dalam bentuk tabel dengan memasukkan data hasil reaksi dan hasil positif atau negatif ekstrak daun sirsak.

Hasil pengaruh konsentrasi ekstrak daun sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* disajikan dalam bentuk tabel. Hasil yang diperoleh dianalisis menggunakan *One Way Anova* dengan program SPSS. Jika p-value > 0,05 maka H_0 diterima, berarti tidak terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak daun sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Apabila p-value < 0,05, maka dilanjutkan dengan uji lanjut menggunakan *Post Hoc Test*.