

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang diperoleh dari daerah Sragen, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang segar, tidak terlalu kuncup dan tidak terlalu tua saat mekar.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah hasil maserasi bertingkat bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan pelarut etanol 70% dan *n*-heksan untuk memperoleh ekstrak yang akan diujikan terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah dan dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi dari ekstrak yang digunakan sebagai uji antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Variabel tergantung adalah akibat dari variabel utama. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah diameter hambatan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti yang lain secara tepat. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah ekstrak etanol dan *n*-heksan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), penanaman bakteri, waktu pengamatan, kondisi laboratorium, massa inkubasi, dan peneliti.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, bunga telang adalah bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang diperoleh dari daerah Sragen, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) adalah serbuk yang diperoleh dari bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang dicuci bersih, dikeringkan, digiling sampai halus, kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 40.

Ketiga, ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) adalah ekstrak kental yang diperoleh dari maserasi bertingkat serbuk bunga telang menggunakan pelarut polar etanol 70 % dan non polar *n*-heksan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu maksimum 40°C hingga diperoleh ekstrak kental bunga telang (*Clitoria ternatea* L.)

Keempat, uji aktivitas antibakteri adalah uji aktivitas yang dilakukan dengan metode difusi untuk mengukur luas daerah hambatan terhadap pertumbuhan bakteri pada ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan konsentrasi 50%, 100%, kontrol negatif DMSO 10%, dan kontrol positif kloramfenikol 5%.

Kelima, bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Salmonella typhi* ATCC 13311 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Keenam, diameter zona hambat adalah daerah hambatan jernih yang mengelilingi sumuran yang berisi sampel uji dan dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri *Salmonella typhi*.

Ketujuh, metode uji antibakteri adalah metode difusi agar.

Kedelapan, DMSO 10% digunakan sebagai kontrol negatif dan kloramfenikol 5% sebagai kontrol positif.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), *n*-heksan, etanol 70%, bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311, dan kloramfenikol.

2. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi rangkaian alat *Bidwell- sterling*, botol gelap, blender, ayakan mesh 40, neraca analitik, *rotary evaporator*, autoklaf, oven, inkubator, pipet mikro, jarum ose, cawan petri steril, kapas lidi steril, gelas ukur, corong kaca, pipet volume steril, tabung reaksi, erlenmeyer, labu ukur, pipet tetes, batang pengaduk, kertas saring, penangas air, *stopwatch*, kulkas, bunsen, pelubang sumuran (*cork borer*).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi, Surakarta. Proses ini dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah benar sesuai spesies yang tercantum dalam literatur ilmiah, serta untuk menghindari kesalahan identifikasi akibat adanya kemiripan morfologi dengan spesies lain. Proses determinasi dilakukan dengan mengamati morfologi tanaman seperti bentuk daun, warna bunga, dan struktur batang. Identifikasi morfologi ini penting dilakukan sebelum tanaman digunakan lebih lanjut dalam proses ekstraksi atau uji biologis, karena kesalahan identifikasi dapat mempengaruhi validitas data penelitian, terutama dalam studi yang melibatkan senyawa aktif tumbuhan (Zahara, 2022).

2. Pengumpulan bahan

Tanaman bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari daerah Sragen, Jawa Tengah. Bagian yang digunakan yaitu bunga yang masih segar.

3. Pencucian

Pencucian bunga telang dilakukan menggunakan air mengalir yang bersih. Pencucian bunga telang dilakukan untuk menghilangkan kotoran serta zat lain yang tidak dibutuhkan yang menempel pada bunga telang. Setelah bersih bunga telang kemudian ditiriskan. Bunga telang diambil 500 gram untuk dikeringkan.

4. Pengeringan

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang telah dicuci bersih kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan bagian yang rusak atau tidak layak. Selanjutnya, bunga telang dikeringkan menggunakan oven pengering (oven drying) pada suhu 50°C selama 6-8 jam hingga mencapai kadar air rendah. Pengeringan menggunakan oven bertujuan untuk mengurangi kadar air agar mencegah reaksi enzimatis dan pertumbuhan mikroorganisme, serta untuk mempertahankan stabilitas dan kualitas senyawa aktif seperti antosianin. Metode ini dipilih karena dapat mengontrol suhu dan waktu pengeringan secara konsisten, sehingga risiko degradasi zat aktif akibat paparan sinar matahari langsung dapat diminimalisasi. Bunga yang telah kering kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat dan kedap udara sebelum proses selanjutnya.

5. Penyerbukan

Pembuatan serbuk dilakukan menggunakan blender, setelah simplisia sudah halus kemudian diayak menggunakan ayakan mesh no 40, dan ditimbang. Serbuk yang sudah ditimbang disimpan dalam wadah bersih, dan kering untuk proses ekstraksi selanjutnya (Widjajanti *et al.*, 2023).

6. Susut Pengeringan

Susut pengeringan serbuk bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dilakukan dengan menimbang sebanyak 2 gram serbuk simplisia yang kemudian dianalisis menggunakan alat Moisture Balance. Proses dilakukan dengan mengatur suhu pengeringan sebesar 105°C dan dibiarkan hingga alat berhenti secara otomatis menandakan proses telah selesai. Proses ini bertujuan untuk menurunkan kadar air agar bahan tidak mudah rusak akibat aktivitas enzim atau pertumbuhan mikroorganisme. Susut pengeringan dihitung berdasarkan selisih bobot bahan sebelum dan sesudah dikeringkan hingga mencapai berat konstan. Menurut penelitian oleh Fithriyah *et.al.* (2021), nilai susut pengeringan yang terlalu tinggi dapat mengindikasikan bahan terlalu basah dan berisiko mengalami degradasi, sedangkan nilai yang terlalu rendah dapat menunjukkan bahwa pengeringan belum sempurna. Pengaturan suhu dan waktu selama proses pengeringan menjadi faktor utama yang mempengaruhi hasil susut pengeringan serta kualitas akhir simplisia.

7. Pembuatan Ekstrak Bunga telang

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut polar etanol 70% dan non polar n-heksan. Serbuk kering bunga telang dimasukkan ke dalam maserator, kemudian ditambahkan pelarut n-heksan dengan perbandingan 1:10 (b/v). Campuran tersebut direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, lalu didiamkan selama 18 jam. Setelah proses maserasi selesai, campuran disaring menggunakan kain flanel untuk memisahkan filtrat dan residu. Residu atau endapan hasil maserasi pertama kemudian dikeringkan dan dimaserasi kembali menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan yang sama (1:10), dan proses perendaman dilakukan dengan cara yang sama seperti sebelumnya. Tujuan dari maserasi bertingkat ini adalah untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolaran pelarut, sehingga dapat mengoptimalkan ekstraksi senyawa aktif yang berbeda (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

8. Skrining Fitokimia

8.1 Identifikasi Alkaloid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL aquadest, dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan disaring filtrat yang diperoleh. Ambil 2 tabung reaksi, kemudian masukkan filtrat sebanyak 0,5 mL pada masing-masing tabung, tabung pertama tambahkan 2 tetes pereaksi dragendorff, dan tabung kedua tambahkan 2 tetes reagen bouchardat. Alkaloid positif apabila erjadi endapan atau keruh pada tabung tersebut (Shallsyabillah & Kartika, 2023).

8.2 Identifikasi Flavonoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 2 mL aquadest, lalu ditambahkan 0,5 gram serbuk magnesium dan beberapa tetes HCL pekat. Terbentuknya warna orange sampai merah (jingga) menunjukkan adanya tanin (Rahminiwati *et al.*, 2024).

8.3 Identifikasi Tanin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan FeCl_3 0,1%. Terbentuknya warna biru-hitam, hijau atau biru-hijau dan endapan menunjukkan adanya tanin (Rahminiwati *et al.*, 2024).

8.4 Identifikasi Saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 20 mL aquadest, kemudian dikocok, terbentuknya busa yang stabil selama beberapa menit menunjukkan adanya saponin (Rahminiwati *et al.*, 2024).

8.5 Identifikasi Minyak Atsiri. Serbuk simplisia di letakkan di atas object glass. Kemudian diteteskan dengan pereaksi merah sudan, lalu ditutup dengan cover glass. Setelah itu, dimasukkan preparat, preparat, lalu ditentukan perbesaran yang dikehendaki dan dilihat bagian-bagian yang hendak diamati diamati dengan mikroskop. Diatur perbesaran untuk didapatkan hasil yang optimal.

Jika positif mengandung minyak atsiri akan berwarna merah muda sampai merah. (Ningsih *et al.*, 2016)

8.6 Identifikasi Steroid. Pemeriksaan steroid dilakukan dengan reaksi Liebermann-Burchard. Larutan uji sebanyak 2 mL diuapkan dalam cawan porselin. Residu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Asam sulfat pekat sebanyak 2 mL selanjutnya ditambahkan melalui dinding tabung. Terbentuk warna biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Abriyani & Lidia Putama Mursal, 2021).

8.7 Identifikasi Terpenoid. Pemeriksaan terpenoid dilakukan dengan reaksi Liebermann-Burchard. Larutan uji sebanyak 2 mL diuapkan dalam cawan porselin. Residu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Asam sulfat pekat sebanyak 2 mL selanjutnya ditambahkan melalui dinding tabung. Terbentuk warna merah kehijauan menunjukkan adanya terpenoid (Abriyani & Lidia Putama Mursal, 2021).

8.8 Identifikasi Antosianin. Identifikasi kandungan antosianin pada sampel dilakukan dengan menggunakan 2 reagen yaitu HCl 2 M dilakukan pemanasan pada suhu 100°C (5 menit). Warna sampel diamati untuk jika warna sampel tetap merah maka positif mengandung antosianin. Selanjutnya dengan penambahan NaOH 2M sedikit demi sedikit. Adanya antosianin ditunjukkan dengan warna merah menjadi hijau, perlahan memudar (Herlina, *et al.*, 2023).

9. Sterilitas

Sterilisasi adalah proses yang bertujuan untuk menghilangkan semua bentuk kehidupan dari suatu bahan atau objek. Proses ini penting dalam berbagai penelitian yang bertujuan untuk mengevaluasi dampak inokulasi mikroorganisme tertentu tanpa adanya pengaruh dari mikroorganisme local (Anugroho *et al.*, 2024). Semua alat yang akan digunakan dicuci bersih kemudian dikeringkan. Peralatan kaca seperti beker, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, dan batang pengaduk dibungkus menggunakan kertas HVS. Selanjutnya, peralatan tersebut ditempatkan dalam oven pada suhu 180°C selama satu jam. Ose disterilisasi dengan cara dibakar di atas lampu bunsen hingga menyala (Misna & Diana, 2016).

10. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar

Media MHA disiapkan dengan cara menimbang 38 gram MHA dilarutkan dalam 1 liter akuades. Larutan kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga homogen dan mendidih. Setelah larut sempurna, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah autoklaf, media dibiarkan hingga suhu 45–50°C sebelum dituangkan ke cawan petri secara aseptis (Munawir & Basir, 2021).

11. Kultur Bakteri *Salmonella typhi*

Kultur bakteri *Salmonella typhi* diperoleh dari laboratorium mikrobiologi dalam bentuk stok kultur. Kultur tersebut kemudian diinokulasikan ke media agar miring (nutrient agar slant) dan diinkubasi

pada suhu 37°C selama 24 jam untuk mengaktifkan kembali pertumbuhannya (Khair *et al.*, 2021).

12. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri hasil kultur diambil menggunakan ose steril, kemudian disuspensiakan ke dalam larutan NaCl fisiologis (0,9%). Suspensi bakteri dihomogenkan hingga menyerupai kekeruhan standar McFarland 0,5. Suspensi ini digunakan untuk pengujian antibakteri (Pisacha *et al.*, 2023).

13. Pembanding Standar Mc Farland

Standar McFarland 0,5 digunakan untuk menyetarakan jumlah koloni bakteri dalam suspensi uji, setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Pembanding McFarland diperoleh secara komersial atau dibuat dari campuran barium klorida (BaCl_2) dan asam sulfat (H_2SO_4) yang menghasilkan kekeruhan tertentu (Mulyati, 2015).

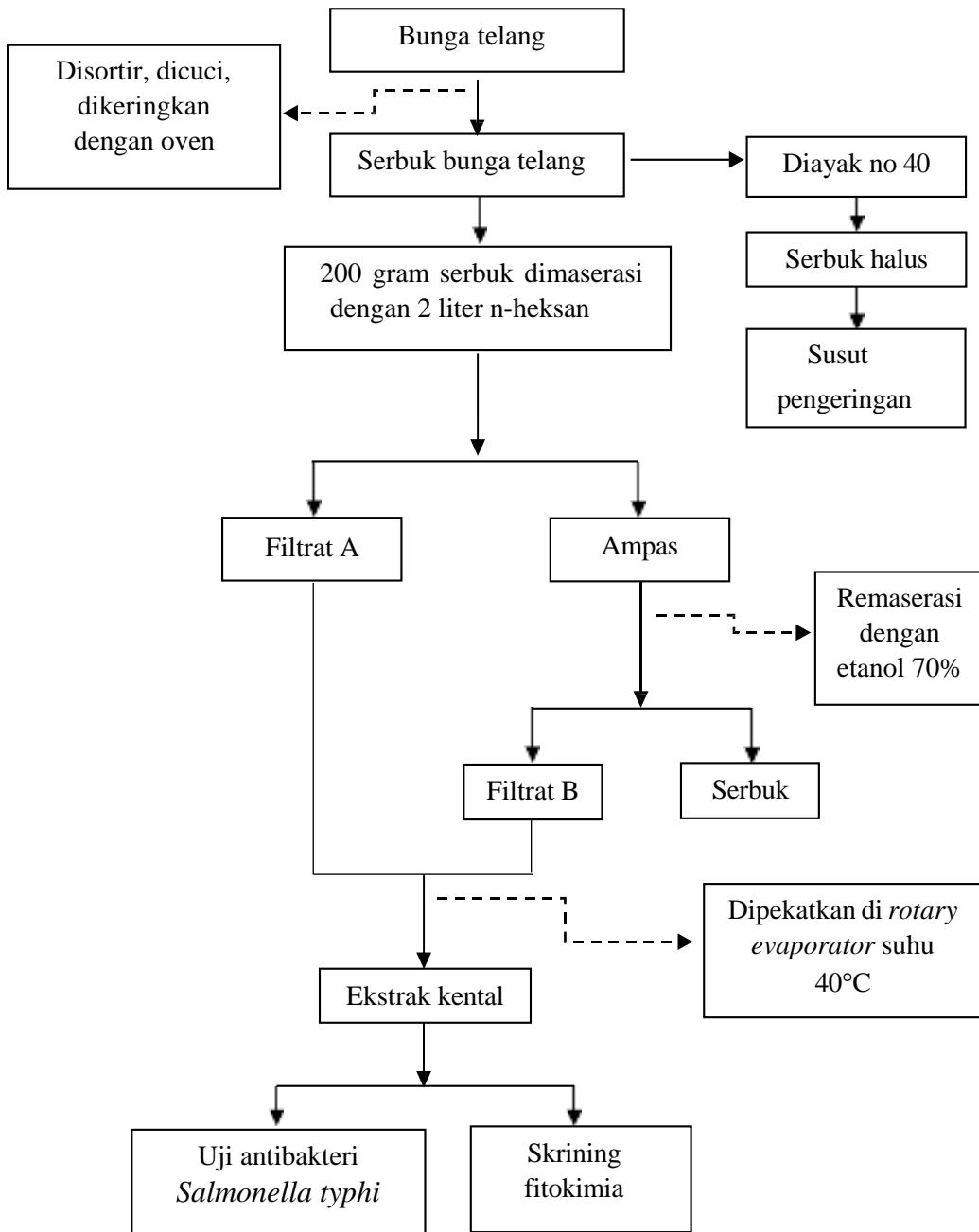
14. Identifikasi Bakteri *Salmonella typhi*

Identifikasi dilakukan berdasarkan morfologi koloni (mikroskopis), pewarnaan gram, serta serangkaian uji biokimia seperti SIM (Sulfur Indole Motility), KIA, LIA, Simon Citrat (Khair *et al.*, 2021).

15. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bunga Telang

Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi sumuran (well diffusion). Media Mueller Hinton Agar (MHA) yang telah dituangkan ke dalam cawan petri dan memadat, diinokulasi secara merata dengan suspensi bakteri *Salmonella typhi* yang telah disesuaikan dengan standar McFarland 0,5. Setelah proses inokulasi, dibuat enam sumuran (lubang kecil) pada setiap cawan petri menggunakan alat penusuk steril dengan diameter ± 6 mm. Masing-masing sumuran diisi dengan sampel yang berbeda, yaitu: ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) hasil maserasi dengan pelarut n-heksan konsentrasi 50% dan 100%, etanol 70% konsentrasi 50% dan 100%, kontrol positif (kloramfenikol), dan kontrol negatif (DMSO 10%). Volume ekstrak atau kontrol yang diteteskan ke masing-masing sumuran adalah ± 50 μL . Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, diamati adanya zona bening di sekitar sumuran sebagai indikator terbentuknya zona hambat, yang menunjukkan aktivitas antibakteri dari ekstrak bunga telang terhadap *Salmonella typhi* (Nisma *et al.*, 2024).

16. Skema Penelitian



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak bunga telang

E. Analisis Hasil

Data hasil pengukuran diameter zona hambat dari ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) terhadap *Salmonella typhi* dianalisis secara statistik menggunakan metode One-Way ANOVA. Analisis ini digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antar perlakuan yang terdiri dari lima kelompok, yaitu ekstrak etanol 70% (konsentrasi 50% dan 100%), ekstrak n-heksan (konsentrasi 50% dan 100%), serta kontrol positif (kloramfenikol).

Sebelum dilakukan analisis One-Way ANOVA, data diuji terlebih dahulu untuk memenuhi asumsi parametrik, yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Hasil uji Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa data dari setiap kelompok terdistribusi normal ($p > 0,05$). Uji Levene menunjukkan bahwa data memiliki varians yang homogen ($p = 0,451$), sehingga memenuhi syarat untuk dilakukan analisis ANOVA.

Hasil One-Way ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p = 0,000$). Oleh karena itu, dilakukan uji lanjut menggunakan metode Tukey HSD untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang berbeda secara signifikan. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol 100% memberikan diameter zona hambat yang secara signifikan lebih besar dibandingkan perlakuan lainnya, termasuk kontrol positif.

Analisis ini menunjukkan bahwa variasi pelarut dan konsentrasi ekstrak berpengaruh signifikan terhadap aktivitas antibakteri ekstrak bunga telang terhadap *Salmonella typhi*, dan ekstrak etanol 70% konsentrasi 100% merupakan perlakuan paling efektif.

F. Jadwal Penelitian

Tabel 2. Jadwal penelitian

No	Keterangan	Minggu Ke-					
		1	2	3	4	5	6
1	Studi Literatur						
2	Pengumpulan Bahan						
3	Proses Ekstraksi						
4	Uji Aktivitas Antibakteri						
5	Analisis Data						
6	Penyusunan Laporan						