

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) merupakan tanaman herbal tahunan. Bunga telang tumbuh subur di seluruh daerah negara Indonesia. Tanaman ini bisa tumbuh dengan baik dengan jenis tanah yang beragam. Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) mempunyai beragam varietas, akan tetapi yang sering digunakan untuk pengobatan adalah bunga yang berwarna biru. Penggunaan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) bukan hanya sebagai tanaman hias melainkan dapat digunakan sebagai obat tradisional. Penggunaan ini sangat berguna untuk meningkatkan kesehatan saat ini karena bunga telang (*Clitoria ternatea* L.). Bunga telang memiliki beberapa potensi farmakologis sebagai antimikroba, antioksidan, antidepresan, antidiabetes, dan antikanker (Purba, 2020).

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) mempunyai senyawa metabolik sekunder flavonoid, alkaloid, tannin, flobatin, saponin, triterpenoid, flavanol glikosida, antisianin, steroid, minyak volatile, dan stigmasit 4-ena-3,6 dion (Apriani, 2020). Dengan adanya kandungan senyawa metabolik sekunder tersebut bunga telang mempunyai manfaat sebagai antibakteri (Ramdani dkk., 2021), antiinflamasi (Zona, 2021), antioksidan (Purwanto dkk., 2022), antidiabetes (Indriyani & Dewi., 2022), antihistamin, antikanker dan hepatoprotektif (Marpaung, 2020). Senyawa metabolik sekunder flavonoid dan alkaloid mempunyai potensi sebagai antibakteri (Anto, 2020).

Hasil penelitian yang dilakukan Sumitriasih dkk (2019), pada uji aktivitas antibakteri terhadap ekstrak kulit batang kayu eboni (*Diospyros celebica Bakh.*) menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menunjukkan pelarut yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* adalah etanol, sedangkan bakteri *Escherichia coli* adalah etil asetat. Penelitian ini menunjukkan hasil zona hambat bakteri *Escherichia coli* pada pelarut n-heksan menghasilkan sebesar 0 mm, etil asetat sebesar 26,14 mm dan etanol sebesar 23,78 mm, pada bakteri *Staphylococcus aureus* zona hambat yang dihasilkan pada pelarut n-heksan sebesar 0 mm, etil asetat sebesar 23,38 mm, dan etanol sebesar 25,97 mm.

Penelitian yang dilakukan oleh Ganis dkk (2022), pada uji efektivitas ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dalam sediaan gel *hand sanitizer* menggunakan metode perkolasi berpelarut etanol 96% dengan konsentrasi 1%, 5%, 10%, 20% dan 40% tidak menunjukkan hasil zona hambat pada konsentrasi 1% *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, sedangkan sediaan gel *hand sanitizer* pada konsentrasi 10% menunjukkan rata-rata zona hambat 9,5500 mm dengan efektivitas sebesar 88,55% terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* serta 8,6250 mm efektivitas sebesar 85,65% terhadap bakteri *Escherichia coli*. menghasilkan pada bakteri tidak Penelitian lain yang dilakukan oleh Maulid W & Jati, (2022) pada uji antibakteri ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* menggunakan cara maserasi berpelarut etanol 70% dengan metode difusi disk dalam berbagai konsentrasi 10%, 20%, dan 30% menunjukan

hasil zona hambat tertinggi dihasilkan pada konsentrasi 30% sebesar 6,2 mm. Penelitian yang akan dilakukan kali ini menggunakan ekstrak etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan variasi konsentrasi 30%, 50%, 70% dan 100%.

Dalam pengujian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi. Maserasi adalah metode ekstraksi dengan perendaman bahan menggunakan pelarut sesuai tanpa adanya proses pemanasan. Metode maserasi memiliki kelebihan yaitu peralatan sederhana, mudah dilakukan, tidak membutuhkan keahlian khusus, bisa mengikat zat metabolik sekunder lebih banyak dan hasil ekstrak zat aktif yang tidak akan rusak (Hasriyani dkk., 2020). Pelarut yang digunakan pada maserasi adalah etil asetat 70% adalah pelarut semi polar memiliki kelebihan dapat menarik senyawa yang bersifat polar atau non polar, sehingga mempunyai kelebihan menangkap senyawa metabolik sekunder (Pranoto dkk., 2021).

Penelitian ini menggunakan pelarut etil asetat 98% dengan perbedaan konsentrasi ekstrak sebesar 30%, 50%, 70%, dan 100%. Konsentrasi pelarut berbeda digunakan untuk mengetahui konsentrasi mana yang efektif dalam penghambatan bakteri. Metode yang digunakan yaitu difusi cakram. Sampel dibagi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan perlakuan. Kontrol positif dengan Kloramfenikol 0,01%, kontrol negatif dengan Na. CMC 1%. Kloramfenikol mempunyai mekanisme kerja dalam menghambat sintesis protein dengan berikatan pada ribosom subunit 50S terutama bakteriostatik. Kloramfenikol dapat melawan bakteri gram positif dan negatif seperti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Na. CMC 1% digunakan karena

tidak mempunyai aktivitas antibakteri dan digunakan dalam mensuspensi ekstrak bunga telang (Isnaeni dkk., 2021).

Staphylococcus aureus dan *Escherichia coli* merupakan bakteri gram positif dan gram negatif, sehingga kedua bakteri tersebut menggambarkan pengelompokan bakteri pada umumnya. Bakteri pada umumnya dibagi menjadi dua yaitu bakteri gram negatif dan gram positif. Oleh karena itu, diharapkan ekstrak etil asetat pada bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) bisa mengcover dua bakteri tersebut.

1.2 Rumusan masalah

Bagaimanakah aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* ?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 30%, 50%, 70%, dan 100%.
2. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi 30%, 50%, 70% dan 100%.

1.4 Manfaat penelitian

1. Bagi peneliti

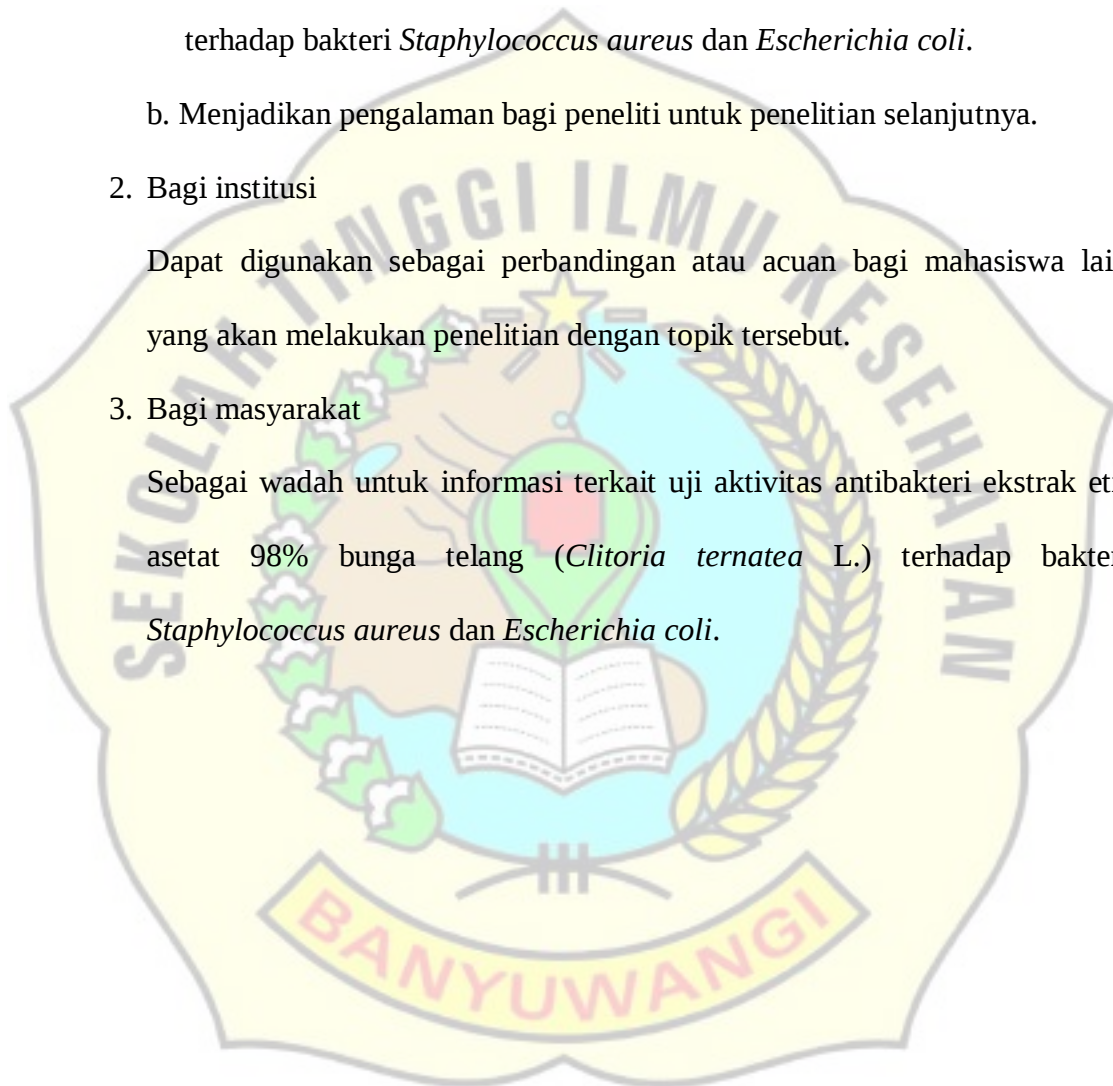
- a. Dapat menambah wawasan dan pengetahuan baru terkait uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat 98% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.
- b. Menjadikan pengalaman bagi peneliti untuk penelitian selanjutnya.

2. Bagi institusi

Dapat digunakan sebagai perbandingan atau acuan bagi mahasiswa lain yang akan melakukan penelitian dengan topik tersebut.

3. Bagi masyarakat

Sebagai wadah untuk informasi terkait uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat 98% bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bunga Telang

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) merupakan anggota dari suku polong-polongan yang berasal dari Asia tropis, namun telah menyebar ke berbagai daerah tropika. Bunga Telang merupakan tumbuhan monokotil yang hidup secara merambat biasa ditemukan di pekarangan maupun hutan. Bunga Telang dibedakan menjadi 3 jenis warna biru, coklat dan putih biasa digunakan sebagai tanaman hias. Bunga telang memiliki beragam nama di setiap daerah di Indonesia. Telang merupakan bunga berkelamin dua (*hermaphrodites*) karena mempunyai benang sari (alat kelamin jantan) dan putik (alat kelamin betina) sehingga disebut dengan bunga sempurna atau biasa disebut bunga lengkap. Daun telang termasuk daun yang tidak lengkap karena tidak mempunyai upih daun (pelepah daun), hanya memiliki petiolus (tangkai daun) dan lamina (helai daun). Telang berakar tunggang dan berwarna putih kotor, sedangkan biji bunga telang berbentuk mirip ginjal, Ketika muda berwarna hijau dan tua berwarna hitam (Dalimartha, 2008). Potensi farmakologi bunga telang yaitu sebagai antibakteri, antioksidan, antihistamin, antiparasit, anti inflamasi, analgesik, antisida, antikanker, antidiabetes, immunomodulator, dan berperan dalam susunan syaraf pusat, CNS (*Central Nervous System*) (Budiasih, 2017). Kandungannya bunga telang yaitu tanin, karbohidrat, flobatanin, protein, saponin, triterpenoid, flavanol glikosida,

fenolmfavanoid, antrakuinon, minyak volatile, antisianin, steroid dan stigmasit 4-ena-3,6 dion (Hussain dkk., 2008).



Gambar 2.1. Morfologi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) (Manjula, 2013)

2.1.1 Klasifikasi Bunga Telang

Kingdom : Plantae
 Divisi : Tracheophyta
 Infrodivisi : Angiospermae
 Kelas : Mangnoliopsida
 Ordo : Fabales
 Familia : *Fabacea*
 Genus : *Clitoria* L
 Spesies : *Clitoria ternatea* L.

2.1.2 Kandungan Senyawa Bunga Telang

Table 2.1. Kadar Senyawa Aktif Mahkota Bunga Telang

No.	Senyawa	Konsentrasi (mmol/mg bunga)
1.	Flavonoid	20,07 ± 0,55
2.	Antosianin	5,40 ± 0,23
3.	Flavonol glikosida	14,66 ± 0,33
4.	Kaempferol glikosida	12,71 ± 0,12
5.	Quersetin glikosida	1,92 ± 0,12
6.	Mirisetin glikosida	0,04 ± 0,01

Sumber : (Kazuma, 2003)

Kandungan yang ada pada bunga telang adalah tanin, karbohidrat, flobatanin, protein, saponin, triterpenoid, flavanol glikosida, fenolmfavanoid, antrakuinon, minyak volatile, antisianin, steroid dan stigmasit 4-ena-3,6 dion (Hussain dkk., 2008).

2.2 Bakteri

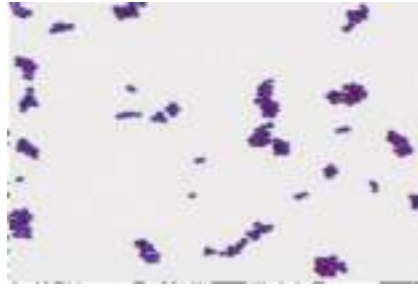
Bakteri adalah kelompok mikroorganisme bersel tunggal yang tidak mempunyai membrane inti sel, berukuran kecil dan termasuk ke dalam domain prokariotik. Memiliki informasi genetik berupa DNA. Bakteri dapat dibedakan menjadi dua berdasarkan pewarnaan yaitu bakteri gram positif dan negatif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel tersusun dari satu lapisan yaitu peptodiglikan yang relative tebal. Bakteri gram negatif memiliki dua lapisan yaitu lapisan luar dan lapisan dalam, lapisan luar tersusun dari protein dan

polisakarida, sedangkan lapisan dalam tersusun dari peptidoglikan tetapi lebih tipis daripada bakteri gram positif (Pratiwi, 2009).

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri patogen penting yang berkaitan dengan invasif, virulensi toksin, dan ketahanan terhadap antibiotik (Rahmi dkk., 2015). *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan berbagai jenis infeksi dari infeksi kulit ringan, infeksi sistemik, sampai keracunan makanan.

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif berbentuk bulat yang koloni mikroskopiknya menyerupai buah anggur. Menurut bahasa Yunani, staphyle artinya anggur dan coccus berarti bulat. Berdiameter sekitar 0,8-1,0 μm yang menghasilkan pigmen warna kuning emas sehingga dinamakan aureus (berarti emas). Hidup secara berpasangan ataupun berkelompok. *Staphylococcus aureus* bakteri patogen utama untuk manusia. Bakteri *Staphylococcus aureus* paling kuat daya tahannya. Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu optimum 37°C. tetapi pembentukan pigmen terbaik pada suhu 20-25°C. Koloni perbenihan padat berwarna ke abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk menonjol, bundar, halus dan berkilau. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri flora normal pada manusia, yang terdapat pada kulit dan saluran pernapasan atas, pada kulit dan saluran pernapasan atas *Staphylococcus aureus* jarang menyebabkan penyakit, hanya berperan sebagai karier pada individu sehat (Todar, 2002).



Gambar 2.2. *S. aureus* (Jawetz, 2013)

2.2.2 Klasifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu :

Domain : Bacteria
 Kerajaan : Eubacteria
 Filum : Firmicutes
 Kelas : Bacilli
 Ordo : Bacillales
 Famili : *Staphylococcaceae*
 Genus : *Staphylococcus*
 Spesies : *Staphylococcus aureus* (Soedarto, 2015).

2.2.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif bergerak dengan flagel, berbentuk batang pendek (kokobasil) dan masuk ke dalam family Enterobacteriaceae. *Escherichia coli* adalah bakteri yang sering dijumpai pada usus manusia, bisa menyebabkan infeksi primer seperti diare sehingga bersifat unik (Karsinah dkk., 2011).

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif yang masuk ke dalam family Enterobacteriaceae. Bersifat anaerob fakultatif. Bentuk batang pendek (kokobasil), mempunyai flagel dengan ukuran 0,4-0,7 μm x 1,4 μm dan memiliki

simpai (Radji, 2011). Panjang sekitar 2 μm , lebar 0,4 – 0,7 μm dan berdiameter 0,7 μm . *Escherichia coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi nyata (Hidayati dkk., 2016). *E-coli* memiliki 150 tipe antigen O, 50 tipe antigen H, dan 90 tipe antigen K. Bakteri anaerob fakultatif ini dapat hidup dalam keadaan anaerob maupun aerob. Hidup aerob dengan cara fermentasi sebagai penghasil energi untuk kelangsungan hidup (Manning, 2010).



Gambar 2.3. *E. coli* (Anggraeni, 2015)

2.2.4 Klasifikasi Bakteri *Escherichia coli*

Klasifikasi bakteri *Escherichia coli* yaitu :

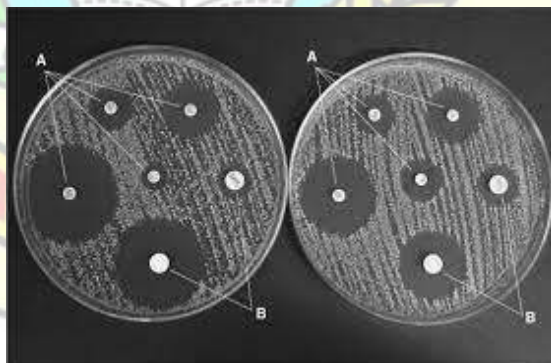
Kingdom : Bacteria
 Filum : Proteobacteria
 Kelas : Gamma Proteobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Famili : *Enterobacteriaceae*
 Genus : *Escherichia*
 Spesies : *Escherichia coli*

2.3 Metode Uji Antibakteri

Uji aktivitas merupakan metode untuk menentukan tingkat kerentanan pada zat antibakteri serta mengetahui senyawa murni yang mempunyai aktivitas antibakteri. Uji aktivitas antibakteri bisa dilakukan dengan difusi dan dilusi (metode pengenceran).

2.3.1 Difusi

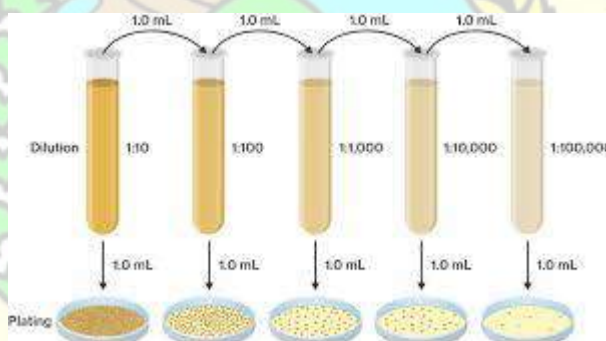
Metode difusi biasa digunakan untuk menentukan sensitivitas mikroba terhadap agen antimikroba. Difusi dilakukan dengan kertas cakram. Media agar yang sudah diinokulasi dengan bakteri dimasukkan kertas cakram, kemudian diisi dengan senyawa uji. Bila area permukaan jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba. Kelebihan metode ini mudah dilakukan karena tidak menggunakan alat khusus dan dapat mencakup fleksibilitas lebih besar dalam memilih obat yang akan diperiksa (Katrín *et al.*, 2015).



Gambar 2.4. Uji Antibakteri Metode Difusi (Sari dkk, 2022)

2.3.2 Dilusi

Metode dilusi dibagi 2 yaitu dilusi padat dan cair. Dilusi cair digunakan untuk mengukur Kadar Hambat Minimum (KHM) sedangkan dilusi padat digunakan untuk menentukan Kadar Bakterisidal Minimum (KBM). Metode dilusi cair dilakukan dengan cara membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan mikroba uji. Metode dilusi padat dapat dilakukan dengan cara menginokulasi mikroba uji pada media agar yang mengandung agen antimikroba. Kelebihan metode ini yaitu konsentrasi agen antimikroba yang diuji bisa digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi, 2008).



Gambar 2.5. Uji antibakteri metode dilusi (Sari dkk, 2022)

2.4 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat dari campurannya dengan bantuan pelarut. Ekstraksi dibagi menjadi dua macam yaitu ekstraksi secara panas dan dingin. Ekstraksi secara dingin ada maserasi, perkolasi, sedangkan yang panas ada refluks, sohletasi, faktor-faktor yang mempengaruhi ekstraksi adalah perlakuan pendahuluan misal pengeringan bahan, pengecilan ukuran, temperatur, faktor pengadukan (Kirk-Othmer, 1998; Perry R *et al.*, 1984).

2.4.1 Ekstraksi Dingin

A. Maserasi

Maserasi adalah ekstraksi sederhana yang dilakukan dengan merendam bahan ke dalam pelarut selama beberapa hari dengan temperatur kamar dan terlindung dari cahaya/sinar matahari langsung. Keuntungan dari metode ini adalah peralatan sederhana, operasional biaya relatif rendah, pengerjaan teknik sederhana dan mudah, dan dapat digunakan untuk mengekstrakan senyawa yang memiliki sifat termolabil karena maserasi dilakukan tanpa pemanasan. Pelarut yang biasa digunakan pada metode ini etanol (Marjoni, 2016).

B. Perkolasi

Perkolasi adalah penyarian dengan mengalirkan penyari melalui serbuk simplisia yang sudah dibasahi. Keuntungan metode ini tipe filtrasi cairan menghasilkan perubahan ruang antara larutan dan partikel. Partikel serbuk simplisia membentuk saluran kapiler dimana fluida yang disaring mengalir. Keduanya meningkatkan tingkat kemungkinan perbedaan konsentrasi Proses penyaringan lebih canggih. Perkolasi bertujuan supaya zat berkhasiat tertarik seluruhnya dan biasanya dilakukan untuk zat berkhasiat yang tahan ataupun tidak tahan pemanasan (Sudarwati & Fernanda, 2019).

2.5.2 Ekstraksi Panas

A. Infusi

Infusi adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara mengekstraksi simplisia nabati menggunakan air pada suhu 90°C selama 15 menit. Keuntungan metode ini sederhana, biaya operasionalnya rendah, dan lebih mudah digunakan oleh orang awam (Ditjen POM, 2014).

B. Refluks

Refluks adalah suatu metode ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Kelebihan dari metode refluks yaitu senyawa lebih efektif ditarik oleh pelarut dan bisa membuat ekstraksi berlangsung efisien (Susanty dkk., 2016).

C. Soxhletasi

Soxhletasi adalah proses pemisahan komponen dalam zat padat dengan penyaringan berulang-ulang menggunakan pelarut tertentu, sehingga komponen yang diinginkan terisolasi. Kelebihan dari metode ini yaitu proses ekstraksi yang kontinyu, jumlah pelarut yang kecil dibandingkan maserasi, dan sampel terekstraksi oleh pelarut murni dari kondensasi (Mukhriani, 2014).

D. Dekoksi

Dekoksi adalah metode ekstraksi dengan pelarut berupa air dibuat dengan menyari simplisia dengan air pada waktu 30 menit dengan suhu 90°C. metode ini digunakan umumnya masyarakat menggunakan teknik

seduhan, perasaan dan perebusan dalam pengolahan obat herbal (Haryono, 2009).

2.5 Pelarut

Pelarut merupakan suatu zat yang melarutkan zat terlarut misal cair, gas, padat yang berbeda secara kimiawi, dan menghasilkan larutan. Pelarut bisa berupa padat, cair, dan gas. Pelarut biasa mempunyai titik didih rendah, mudah menguap dan meninggalkan substansi terlarut yang didapat. Terdapat jumlah yang lebih besar, untuk dapat membedakan antara pelarut dengan zat yang dilarutkan. Pelarut ada 3 macam yaitu pelarut polar, non polar, dan semi polar. Pelarut polar seperti etanol, metanol, aseton, dan air (Sudarmadji *et al.*, 1997). Pelarut semi polar seperti diklorometan, etil asetat, sedangkan pelarut non polar contohnya seperti kloroform, n-heksan, petroleum eter dan lain-lain (Sutrisna, 2016).

2.5.1 Pelarut Polar

Pelarut polar adalah pelarut yang mempunyai tingkat kepolaran tinggi, sehingga cocok untuk mengekstraksi senyawa-senyawa polar dari tanaman. Pelarut ini cenderung universal, walaupun polar biasanya tetap digunakan, karena dapat menyari senyawa yang memiliki tingkat kepolaran lebih rendah. Contoh dari pelarut ini yaitu air, metanol, asam asetat dan etanol (Sudarmadji *et al.*, 1997).

2.5.2 Pelarut Semi Polar

Pelarut semi polar adalah pelarut yang mempunyai tingkat kepolaran rendah dibanding dengan pelarut polar. Pelarut ini baik dalam mendapatkan senyawa-senyawa semipolar yang terdapat pada tumbuhan.

Contoh pelarut semi polar yaitu diklorometan, etil asetat (Sutrisna, 2016).

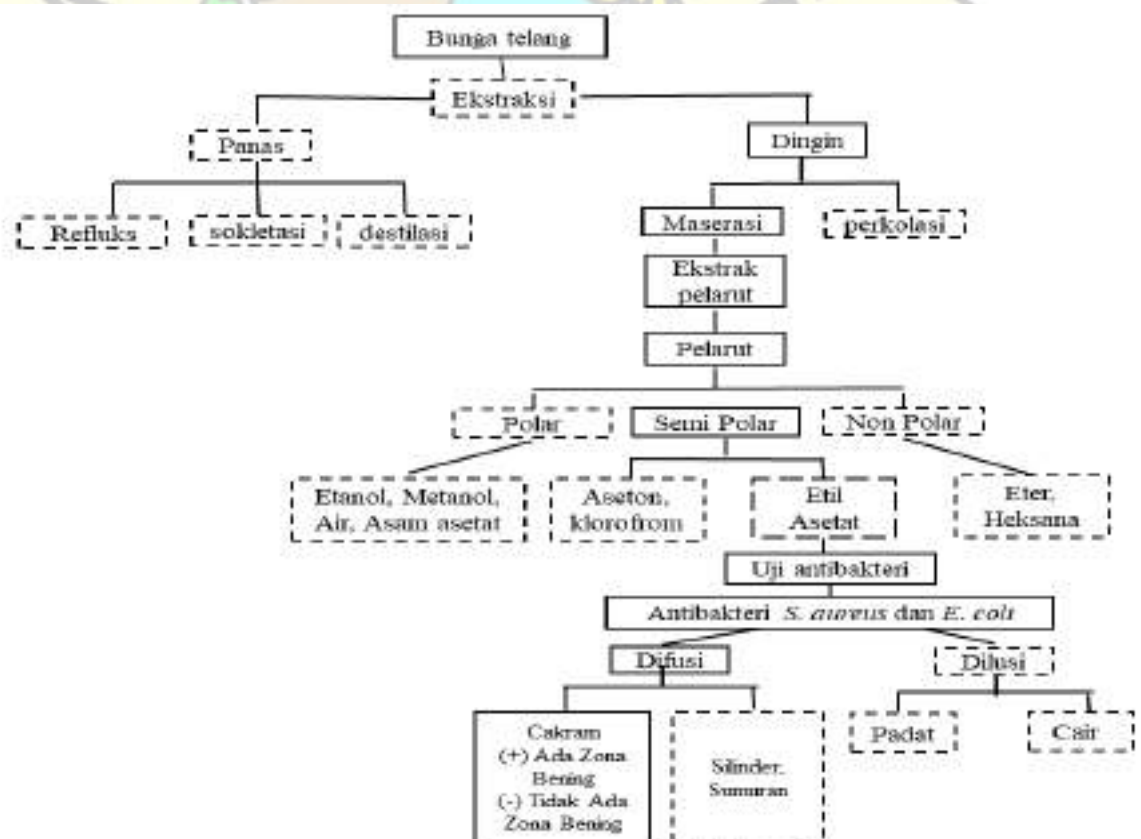
2.5.3 Pelarut Non Polar

Pelarut non polar adalah pelarut yang hampir sama sekali tidak polar.

Pelarut ini baik dalam mengekstraksi senyawa-senyawa yang sama sekali tidak bisa larut dalam pelarut polar dan berbagai senyawa jenis minyak.

Contoh pelarut non polar yaitu kloroform, n-heksan, petroleum eter dan lain-lain (Sutrisna, 2016).

2.6 Kerangka konseptual



Keterangan :

 = Tidak teliti

 = Diteliti

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium. Eksperimen jenis ini dilakukan didalam ruangan, yang eksperimennya dikumpulkan atau ditempatkan dalam sebuah ruangan dan diberikan perlakuan (Roger, 2006), dengan tujuan untuk menganalisis pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada media agar yang telah ditambahkan ekstrak etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan konsentrasi 30%, 50%, 70% dan 100%. Hasil dari penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

3.2 Waktu dan Tempat

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Mei tahun 2023.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian metode uji aktivitas anti bakteri ekstrak etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi STIKES Banyuwangi, Laboratorium Biologi Fakultas MIPA UNIBA untuk uji determinasi.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Timbangan analitik, autoklaf, cawan petri, jarum ose, mikropipet, pinset, *water bath*, kapas steril, oven, dan jangka sorong, inkubator, blender, alat gelas laboratorium, lemari aseptis, kertas label, tip , spirtus, dan kertas cakram.

3.3.2 Bahan

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), etil asetat 70%, bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, aquades, NA (nutrient agar), Kloramfenikol 0,01%, Na. CMC 1%, dan *aluminium foil*, NaCl 0,9%.

3.4 Prosedur kerja

3.4.1 Penyiapan bahan

Bunga telang diambil di Glagah Banyuwangi dan ditimbang sebanyak 1.250 g, selanjutnya disortir untuk dipisahkan kotoran atau benda asing, dan dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Bunga telang yang bersih lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 20 jam hingga diperoleh berat kering sebesar 125 g. Bunga telang yang telah kering digiling hingga menjadi serbuk halus menggunakan blender. Selanjutnya diayak menggunakan pengayak ukuran *mesh* nomer 60.

3.4.2 Ekstraksi sampel

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan cara direndam 125 g serbuk bunga telang menggunakan etil asetat sebanyak 840 ml selama 3 jam dalam toples tertutup sambil diaduk, kemudian dimaserasi selama 3x24 jam. Setelah itu dipisahkan antara filtrat dan residu. Kemudian filtrat disaring dengan

kertas saring, dan diuapkan dalam *waterbath* dengan suhu 60°-70°C hingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 12,5 g.

- Perhitungan etil asetat 840 ml

$$150 \text{ gr} \times \dots L = 125 \text{ gr} \times 1 \text{ L}$$

$$L = 125 \text{ gr} / 150 \text{ gr}$$

$$L = 0,833 \text{ L} = 833,33 \text{ ml}$$

3.4.3 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak

- Pembuatan larutan induk Na CMC 1% dibuat dengan cara ditimbang Na. CMC sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquadest.
- Konsentrasi ekstrak 30% : ekstrak seberat 1,5 gram ditambahkan larutan Na. CMC sebanyak 5 ml.
- Konsentrasi ekstrak 50% : ekstrak seberat 2,5 gram ditambahkan larutan Na. CMC 5 ml.
- Konsentrasi ekstrak 70% : ekstrak seberat 3,5 gram ditambahkan larutan Na. CMC 5 ml.
- Konsentrasi ekstrak 100% : ekstrak seberat 5 gram ditambahkan larutan Na. CMC 5 ml.

3.4.4 Sterilisasi

Sebelum melakukan penelitian semua alat yang digunakan khususnya alat-alat gelas dicuci dengan deterjen, kemudian dibilas dengan air suling dan dikeringkan. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm (Waluyo, 2007). Alat lain seperti pinset dan ose disterilkan diatas api spirtus dengan cara pemijaran.

3.4.5 Pembuatan Media Agar

Timbang NA sebanyak 23 gram dan dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1 L. selanjutnya dipanaskan sampai mendidih diatas hot plate sambil diaduk dengan batang pengaduk hingga homogen. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml. Media disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm. Kemudian media digunakan untuk pengujian antibakteri.

3.4.6 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Kontrol negatif Na. CMC 1% dibuat dari 0,5 gram serbuk Na. CMC ditaburkan diatas 50 ml aquadest yang steril dan ditunggu hingga mengembang.

3.4.7 Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Kontrol positif dibuat menggunakan antibiotik Kloramfenikol . Pembuatan larutan Kloramfenikol 0,01% yaitu b/v dengan dilarutkan 0,1 gram Kloramfenikol dalam 10 ml Na.CMC. Kemudian diaduk hingga larutan homogen.

- Konsentrasi kontrol positif 0,1%

Kontrol positif dibuat dengan cara ditimbang serbuk Kloramfenikol 250 mg sebanyak 11,32 mg, kemudian dilarutkan menggunakan aquadest ad 10 ml.

Perhitungan stok Kloramfenikol :

Stok konsentrasi Kloramfenikol 0,1%

$$\text{b/v } 0,1\% = 0,1 \text{ g/100 ml}$$

$$= 0,1 \text{ g} : 10$$

$$= 0,01 \text{ g} \times 1000$$

$$= 10 \text{ mg (Kloramfenikol yang dihitung)}$$

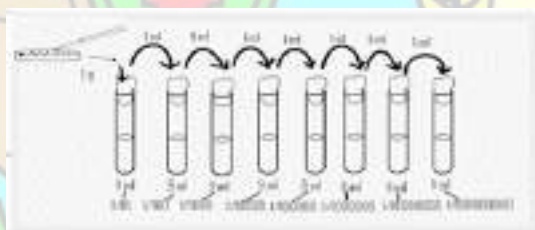
$$= \frac{\text{Berat 1 kapsul} \times 10 \text{ mg}}{\text{Kandungan kloramfenikol}}$$

$$= \frac{283 \text{ mg} \times 10 \text{ mg}}{250 \text{ mg}}$$

$$= 11,31 \text{ mg ad 10 ml}$$

3.4.8 Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang sudah diinokulasi diambil sekitar 1 ose. Disuspensikan dengan 10 ml larutan NaCl 0,9% . Larutan suspensi bakteri tersebut diambil 1 ml, kemudian diencerkan dengan 9 ml larutan NaCl 0,9% di tabung reaksi. Lakukan hal tersebut sampai 5-6 kali pengenceran. Suspensi bakteri yang digunakan diambil dari tabung pengenceran 10^{-5} (Misna & Khusnul 2016).



Gambar 3.1. Pengenceran Suspensi Bakteri

3.4.9 Uji Antibakteri

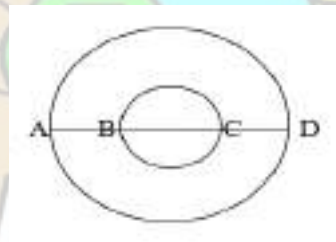
Uji antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dilakukan dengan disiapkan cawan petri steril dan ditambahkan suspensi bakteri ke dalam tabung pengenceran 10^{-5} sebanyak 1 ml. Kemudian ditambahkan kurang lebih 10 ml medium NA cair steril dan homogenkan. Ditunggu hingga media NA memadat selama kurang lebih 10-15 menit. Lalu ditempatkan cakram yang mengandung ekstrak 1 μL bunga telang dengan konsentrasi 30%, 50%, 70% dan 100% dalam cawan petri yang berisi media NA dan suspensi bakteri. Diulangi

sebanyak 3 kali untuk masing-masing konsentrasi ekstrak dan masing-masing bakteri.

3.4.10 Pengukuran Zona Hambat

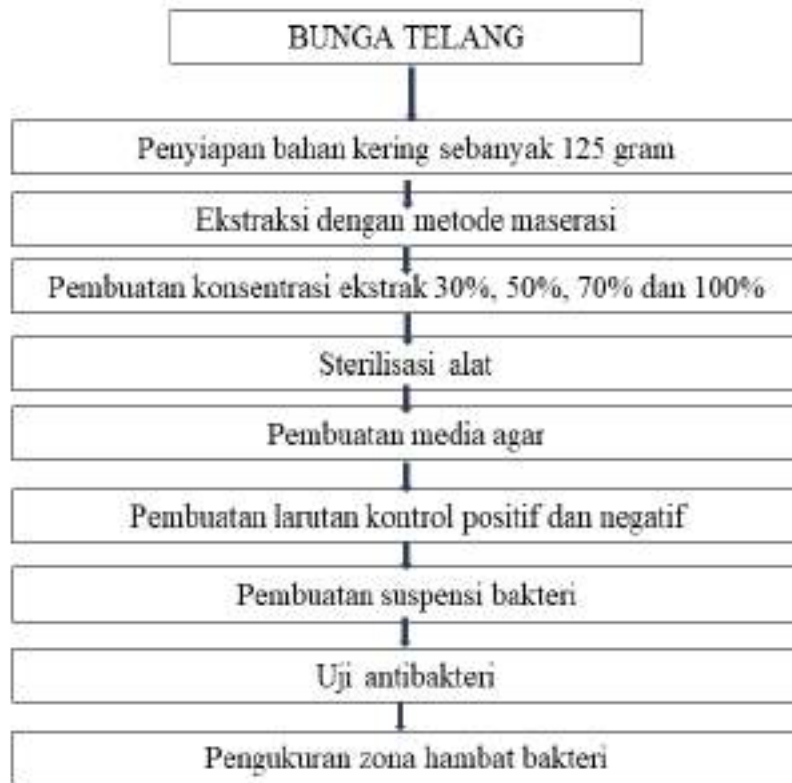
Pengamatan masa inkubasi dilakukan setelah 24 jam. Daerah sekitar cakram menunjukkan kepekaan ekstrak terhadap bakteri. Pada ekstrak bahan antibakteri yang digunakan untuk bahan uji dinyatakan dengan diameter zona bening. Diameter zona bening diukur dengan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm).

Pengukuran zona hambat ditentukan dengan rumus zona hambat = $AD - BC$, AD adalah zona keseluruhan, BC adalah diameter cakram (Rachmawaty, 2016).



Gambar 3.2 Pengukuran Zona Hambat

3.5 Alur Penelitian



3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini adalah data eksperimental laboratorium dari aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) konsentrasi 30%, 50%, 70% dan 100% pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Data eksperimental laboratorium tersebut berupa zona hambat (mm) yang dapat disajikan dalam metode deskriptif berbentuk tabel dan gambar.

