**3.1 Rancangan Penelitian**

**BAB III METODE PENELITIAN**

Penelitian ini bersifat eksperimental, sampel yang digunakan adalah daun pletekan. Data yang dikumpulkan berupa data kuantitatif dan kualitatif yang diambil dari pengumpulan dan penyiapan sampel, karakteristik simplisia, skrining fitokimia, pembuatan ekstrak daun Pletekan *(Ruellia tuberosa L*) dengan metode maserasi, uji toksisitas ekstrak daun pletekan (*Ruellia tuberosa L*) dengan metode BSLT dan antibakteri terhadap bakteri *salmonella thypi dan Escherichia coli*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al- Washliyah.

**3.1.1 Variabel Penelitian**

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu ekstrak dan konsentrasi esktrak Pletekan *(Ruellia tuberosa L*) dan variabel terikatnya yaitu karakterisasi, metabolit sekunder, LC5O dan Aktivitas Antibakteri *salmonella thypi dan Escherichia coli.*

**3.1.2 Parameter Penelitian**

Parameter penelitian yang di lihat adalah makroskopik, mikroskopik, kadar air, kadar abu total, kadar abu larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol dan senyawa metabolit yang terkandung dan zona hambat bakteri.

**3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian**

**3.2.1 Jadwal Penelitian**

Penelitian ini di laksanakan selama 4 bulan di mulai pada bulan januari – mei 2024.

**3.2.2 Lokasi Penelitian**

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim

Nusantara Al-Washliyah Medan.

47

**3.3 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun pletekan (*Ruellia tuberosa L*) , telur Artemia Salina Leach (Supreme plus), garam laut (Mandanics), etanol 96%, aquades, kalium idodida, iodium, raksa (II) klorida, besi (III) klorida

1%, bismut nitrat, asam nitrat, alfa-naftol, timbal (II) asetat, natrium hidroksida 2N, asam asetat anhidrat, toluene (Emsure), kloroform (Smart lab), asam klorida pekat, Aquadest, natrium hidroksida, asam sulfat pekat, kloralhidrat, MHA*(Mueller Hilton Agar*) (Himedia), NA*(Nutrinet Agar*) (Himedia), biakan *salmonella thypi dan Escherichia coli*, larutan fisiologi 0,9%, dan suspense standar Mc. Farland, DMSO (Supelco).

**3.4 Peralatan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (kren)

, aluminium foil, mikroskop, chopper (Meat Max), rotary evavorator (IKA), tanur (pyrex), hot plate (Thermo Scientific Cimarec), cawan penguap (pyrex), desikator, labu tentukur (pyrex), wadah maserasi, vial, wadah tempat penetasan telur Artemia salina Leach, rak tabung reaksi, jarum ose,cawan petri (Iwaki), laminar air *flow,* cufet, autoclave (Memmert UN55), incubator (Memmert UN55), kertas cakram, jangka sorong, bunsen, wadah kaca toples tertutup.

**3.5 Penyiapan Sampel dan Pengolahan Sampel**

**3.5.1 Penyiapan Sampel**

Sampel tumbuhan daun pletekan (*Ruellia tuberosa L*.) diambil dari daerah

Kecamatan Medan Timur, Sumatera Utara.

**3.5.2 Determinasi Sampel**

Determinasi/identifikasi sampel tumbuhan pletekan (*Ruellia tuberosa* L)

lakukan oleh Herbarium Medanese (MEDA) Universitas Sumatera Utara.

**3.5.3 Pengolahan Sampel**

Daun Pletekan dan terlebih dahulu dikumpulkan sebanyak 5 kilogram lalu dipisahkan dari batangnya, kemudian disortasi basah selanjutnya dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang kemungkinan masih menempel dan ditiriskan, lalu dikeringkan dengan cara diangin - anginkan tanpa terkena paparan sinar matahari langsung hingga daun menjadi kering. Setelah kering daun di bersihkan kembali dari kotoran yang tertinggal saat pengeringan. Sampel daun selanjutnya diserbukkan dan disimpan (Widodo et al, 2019).

**3.6 Pembuatan Larutan Pereaksi**

**3.6.1 Larutan Pereaksi Natrium Hidroksida 2 N**

Sebanyak 8 gram natrium hidroksida, dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL, lalu dilarutkan dengan aquades hingga volume 100 mL (Depkes RI,1995).

**3.6.2 Larutan Pereaksi Asam Nitrat 0,5 N**

Asam nitrat pekat sebanyak 44,3 mL dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL

lalu diencerkan dengan aquades sampai garis tanda (Depkes RI,1995).

**3.6.3 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2 N**

Asam sulfat pekat 10,32 mL dipipet lalu dimasukkan kedalam gelas kimia

100 mL lalu diencerkan dengan aquades sampai garis tanda (Depkes RI,1995).

**3.6.4 Larutan Asam Klorida 2 N**

Asam klorida pekat sebanyak 19,71 mL dipipet lalu dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL lalu diencerkan dengan aquades sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

**3.6.5 Larutan Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 M**

Timbal (II) asetat sebanyak 15,17 gram dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu dilarutkan dalam aquades bebas CO2 sampai garis tanda (Depkes RI,1995).

**3.6.6 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1 %**

Besi (III) klorida sebanyak 1 gram dilarutkan dalam aquades dalam labu ukur

100 mL dan dicukupkan sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

**3.6.7 Larutan Pereaksi Kloral hidrat 70%**

Kloral hidrat sebanyak 50 gram ditimbang lalu dilarutkan dalam 20 mL

aquades didalam labu erlemeyer (Depkes RI, 1995).

**3.6.8 Laratan Pereaksi Molish**

Sebanyak 3 gram alfa-naftol dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL lalu dilarutkan dalam asam nitrat 0,5N samp ai garis tanda (Depkes RI, 1995).

**3.6.9 Larutan Pereaksi Liebermann-Burchard**

Asam asetat anhidrat sebanyak 20 mL dipipet lalu dicampurkan dengan 1 mL

asam sulfat pekat dalam gelas ukur (Depkes RI, 1995).

**3.6.10 Larutan Pereaksi Mayer Raksa (II)**

Klorida sebanyak 1,35 gram dilarutkan dengan 60 mL aquades didalam gelas ukur 100 mL. Pada wadah lain dilarutkan 5 gram kalium iodida dalam 10 mL aquades. Kedua larutan dicampur dalam labu ukur 100 mL, lalu diencerkan dengan aquades sampai daris tanda (Depkes RI, 1995).

**3.6.11 Larutan Pereaksi Dragendorff**

Sebanyak 20 mL larutan bismuth nitrat 40% b/v dalam asam nitrat P dicampur dengan 50 mL larutan kalium iodide P 54,4% b/v, diamkan sampai memisah

sempurna. Ambil larutan jernih dan encerkan dengan air secukupnya hingga 100 mL (Depkes RI 1995).

**3.6.12 Larutan Pereaksi Bouchardat**

Ditimbang sebanyak 4 gram kalium iodida, dimasukkan dalam labu tentukur 100 mL, dilarutkan dengan aquades secukupnya, kemudian ditimbang 2 gram iodida dan dilarutkan dalam larutan kalium iodida, lalu ditambahkan dengan aquades hingga batas tanda (Depkes RI, 1995).

**3.7 Karakterisasi Simplisia**

Pemeriksaan karakterisasi simplisia meliputi: pemeriksaan makroskopik simplisia, pemeriksaan mikroskopik serbuk simplisia, penetapan kadar air penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam (Depkes RI, 2000).

**3.7.1 Pemeriksaan Makroskopik**

Analisis makroskopik dilakukan dengan pengamatan secara organoleptis antara lain bentuk, bau, warna dan rasa pada pletekan *(Ruellia tuberosa* L) (Yulia et al., 2020).

**3.7.2 Pemeriksaan Mikroskopik**

Analisis mikroskopik dilakukan dengan mengamati bentuk sel dan jaringan tumbuhan pada penampang melintang dan membujur. Dimana simplisia yang sudah dihaluskan di letakkan diatas kaca objek, di tetesi aquadest, ditutup dengan kaca penutup dan diamati dengan mikroskop kemudian diambil gambarnya (Yulia et al.,

2020).

**3.7.3 Penetapan Kadar Air**

Penatapan kadar air dilakukan dengan metode Azeotropi. Alat terdiri dari labu alas bulat 500 mL, alat penampung dan pendinginan, tabung penyambung dan penerima 10 mL.

a. Penjenuhan toluen

Sebanyak 200 mL toluene dan 2 mL air suling dimasukkan kedalam labu alas bulat, dipasang alat penampang dan pendingin, kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0, 05 mL.

b. Penetapan Kadar Air

Sebanyak 5 gram serbuk simplisian pletekan ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam labu yang berisi toluen jenuh. Kemudian dipanaskan dengan hati-hati selama

15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian air terdestilasi. Lalu kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes tiap detik. Setelah semua air terdestilasi, bagian pendingin dibilas dengan toluen. Destilasi di lanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan dingin pada suhu kamar. Setelah air dan toluene memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,05 mL. Selisih kedua volume air dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat pada simplisia yang diperiksa. Lalu kadar air dihitung

dalam persen (v/b) (Depkes RI, 1989).

% Kadar Air Simplisia =

(������𝑒 ��ℎ�� ���−������𝑒 ���� ���)

𝐵����� �������� (𝑔���)

𝑥 100%

**3.7.4 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air**

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL

kloroform P (2,5 mL kloroform dalam 100 mL aquadest) dalam labu bersumbat

sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian diamkan selama 18 jam. Disaring cepat 20 mL filtrat diuapkan dalam cawan dangkal dasar rata (yang telat ditara) di atas penangas air hingga kering, sisa dipanaskan pada suhu 105˚C hingga bobot tetap. Hitung kadar persen terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 1989).

% Kadar Sari Larut dalam Air = Berat c awan is i− Berat c awan ko so ng x 5 x100%;

Berat sampel

**3.7.5 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol**

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia di maserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 96% dalam labu bersumbat sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama, lalu dibiarkan selama 18 jam. Setelah itu disaring cepat untuk mengindari penguapan etanol, lalu di uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan penguap berdasarkan rata yang telah ditara 20 mL. Di panaskan sisa pada suhu 105℃ hingga bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 96% dihitung terhadap simplisia yang dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

% Kadar Sari Larut dalam Etanol = Berat c awan isi− Berat c awan ko so ng x 5 100%

Berat sampel

**3.7.6 Penetapan Kadar Abu Total**

Sebanyak 2 gram serbuk di masukkan kedalam krus porselin yang telah dipijarkan dan ditara, lalu krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis. Pemijaran dilakukan pada suhu 500-600℃ selama 3 jam. Setelah didinginkan dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kemudian kadar abu dihitung terhadap simplisia yang di uji (Depkes RI, 1989).

% Kadar Abu Total = 𝐵𝑒 � �� �� �� ��� − � 𝑒 ��� �� �� �� ���𝑔 𝑋 100%

𝐵����� ����������

**3.7.7 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam**

Hasil abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, di dinginkan dengan

25 mL asam klorida encer selama 5 menit. Kemudian sebagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, lalu di saring dengan kertas saring bebas abu. Setelah itu dicuci dengan air panas, residu dengan kertas saring di pijarkan sampai bobot tetap. Kemudian didinginkan dan ditimbang. Dihitung kadar abu tidak larut asam yang telah di keringkan diudara (Depkes RI, 1989).

% Kadar Abu Tidak Larut Asam = 𝐵𝑒 � �� �� ��+ �� � − 𝐵��� �� �� �� �����𝑔 𝑋 100

𝐵����� ���������� (𝑔�)

**3.8 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pletekan (*Ruellia tuberosa L*)**

Pembuatan ekstrak daun Pletekan dengan metode maserasi. Sebanyak 500 gram serbuk dimaserasi dengan 5000 mL etanol 96%. Serbuk simplisia dimasukkan ke dalam wadah maserasi kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 3750 mL. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama

18 jam dan wadah di tutup dan dibiarkan selama 5 hari dan diletakkan ditempat yang terlindung dari sinar matahari. Selama proses maserasi, sesekali diaduk. Simplisia yang sudah larut di saring kemudian filtrat di tampung sebagai maserat I. Proses perendaman di lakukan kembali dengan etanol 96% sebanyak 1250 mL hingga diperoleh maserat II didiamkan selama 2 hari. Maserat I dan maserat II digabungkan, lalu diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk memisahkan ekstrak dari pelarutnya. Ekstrak yang sudah di *rotary evaporator* kemudian di pindahkan ke cawan keramik dan dipanaskan di atas *water bath* pada suhu 50⁰C untuk mendapatkan ekstrak kental. Setelah di peroleh ekstrak kental di masukkan kedalam wadah tertutup (Depkes RI, 1979).

Perhitungan cairan penyari:

Berat serbuk 10 bagian : 500 gram Berat etanol 100 bagian : 5000 gram Volume etanol 96% yang di butuhkan dalam 5000 gram; Volume 75 bagian etanol 96% yang digunakan:

V= 75 x 5000 mL = 3.750 mL

100

Volume 25 bagian etanol 96% yang digunakan:

V= 25 x mL= 1.250 mL

100

**3.9 Skrining Fitokimia**

**3.9.1 Pemeriksaan Flavonoid**

Sebanyak 1 gram esktrak daun pletekan ditambahkan 100 mL air panas, di didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 mL lalu di tambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL asam klorida pekat dan 2 mL ambil alkohol lalu dikocok kemudian dibiarkan memisah. Flovonoid positif jika terbentuk warna merah, kuning, jingga pada lapisan alkohol (Depkes RI, 1995).

**3.9 2 Pemeriksaan Alkaloid**

Ditimbang sebanyak 0,5 gram ekstrak simplisia daun pletekan lalu ditambahkan 1 mL HCl 2 N dan 9 mL aquadest. Selanjutnya dipanaskan diatas hot plate magnetic stirrer. Kemudian didinginkan lalu disaring untuk mendapatkan filtrat. Setelah itu dilakukan pemeriksaan alkaloid:

a. Tabung Reaksi I : diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer mengahasilkan endapan putih/kuning.

b. Tabung Reaksi II : diambil 3 tetes filtrat, lalu di tambahkan 2 tetes pereaksi bouchardat menghasilkan endapan coklat kehitaman

c. Tabung Reaksi III : diambil 3 tetes filtrat, lalu di tambahkan 2 tetes pereaksi dragendrof menghasilkan endapan merah bata atau jingga kecoklatan (Depkes RI, 1989).

**3.9.3 Pemeriksaaa Tanin**

Di timbang sebanyak 1 gram ekstrak daun pletekan lalu dilarutkan dalam 10 ml air suling, didihkan 3 menit, dinginkan dan saring, larutan diambil 2 mL dan ditambahkan sampai 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Depkes RI, 1995).

**3.9.4 Pemeriksaan Saponin**

Di timbang 0,5 gram ekstrak daun pletekan lalu dilarutkan dalam 10 mL aquadest panas, dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Penambahan 1 tetes larutan HCL 2 N, apabila busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

**3.9.5 Pemeriksaan Triterpenoid/Steroid**

Sebanyak 1 gram ekstrak dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (pereaksi liberman-burchard). Terbentuknya warna ungu sampai merah ungu menunjukkan adanya triterpenoida dan terbentuknya warna biru hijau menunjukkan adanya steroid (Depkes RI, 1995).

**3.9.6 Pemeriksaan Glikosida**

Di timbang serbuk 3 gram pletekan ditambahkan 30 mL campuran etanol

96% dengan aquadest (7:3) selama 10 menit, dinginkan lalu saring. Di ambil 20 ml filtrat tambahkan 25 mL air dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M. Lalu dikocok, diamkan selama 5 menit, saring filtrat 3 kali tiap kali dengan 20 mL campuran 3 bagian kloroform P dan 2 bagian isopropanol P. Setelah itu kumpulkan sari tambahkan natrium sulfat anhidrat P, saring dan uapkan pada suhu tidak lebih 50℃. Lalu larutkan sisa dengan 2 mL metanol P, lalu uapkan 0,1 mL larutan sisa tambahkan 5 mL asam asetat anhidrat P lalu tambah 10 tetes asam sulfat P kemudian masukkan 0,1 mL larutan dalam tabung reaksi, uapkan di *water bath*. Filtat ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes Molish LP. Tambahkan hati-hati 2 mL asam sulfat P. Setelah itu akan terbentuk cincin warna ungu (Depkes RI, 1995).

**3.10 Pengujian Toksisitas dengan Metode BSLT**

**3.10.1 Pembuatan Air Laut Buatan**

Air laut buatan (artificial sea water) dibuat dengan cara melarutkan 38 gram garam tanpa iodium dalam 1 liter air, lalu diaduk sampai homogen. Setelah itu, disaring menggunakan kertas Whatman (Aqiila et al., 2018).

**3.10.2 Penetasan Telur Artemia salina Leach**

Penetasan telur dilakukan dalam wadah bening dengan menggunakan media air laut. Wadah yang digunakan dibagi menjadi dua bagian oleh sekat berlubang, yaitu bagian gelap dan bagian terang. Sekat berlubang menjadi jalan untuk larva yang telah menetas untuk bergerak secara alamiah ke arah terang wadah di isi dengan satu liter air laut buatan. Kemudian pada bagian gelap dimasukkan satu sendok telur. Pada wadah bagian gelap ditutup dengan alumunium foil atau lakban

hitam. Pada wadah bagian terang diberi penerangan dengan cahaya lampu agar suhu penetasan 25-30°C tetap terjaga. Telur udang dibiarkan terendam selama 48 jam sampai telur menetas. Telur akan menetas dalam waktu 24-36 jam dan akan bergerak secara alamiah menuju daerah terang sehingga larva udang terpisahkan dari bagian telur atau kulit telur, Larva yang telah aktif bergerak siap digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian (Aqiila et al., 2018).

**3.10.3 Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol Daun Pletekan (*Ruellia tuberosa L)***

Dibuat larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan stok dibuat dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25, 30, 35 dan 40 ppm dengan cara pengenceran. Untuk kontrol (0 ppm) dilakukan tanpa penambahan ekstrak.

**3.10.4 Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Pletekan (*Ruellia tuberosa L)***

Pada pengujian digunakan 7 seri konsentrasi yang berbeda, dimana konsentrasi yang digunakan adalah 10, 15, 20, 25, 30, 35 dan 40 ppm. 10 ekor larva artemia yang telah berumur 48 jam diambil, dimasukan dalam vial yang berisi ekstrak dengan konsentrasi tertentu. Kemudian ditambahkan air laut sebanyak 10 mL. Setiap pengujian disertai dengan kontrol negatif dan dibuat 3 kali replikasi. Vial dijaga agar selalu mendapat penerangan. Setelah 24 jam, jumlah larva yang mati di hitung untuk mengetahui nilai probit dan dianalisis untuk mengetahui harga LC50 (Meyer et al, 1982).

**3.11 Analisis Data**

Pengaruh ekstrak daun pletekan dan terhadap *Artemia salina Leach* dilakukan dengan perhitungan analisis probit. Perhitungan dilakukan dengan membandingkan antara larva mati terhadap jumlah keseluruhan, sehingga diperoleh

persen kematian dilihat dalam nilai tabel probit. Dari data tersebut akan diketahui nilai probit di masukkan kedalam persamaan regresi, sehingga dapat nilai LC50.

Persamaan regresi:

y = a +bx

LC50 = arc log x

Keterangan :

X : Log Konsentrasi

a : intercept (garis potong)

sy : Nilai Probit

b : Slope (kemiringan dari garis regresi linear)

Data hasil penelitian uji toksisitas diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan kurva. Data dari uji toksisitas tersebut akan dianalisis dengan analisis probit serta menggunakan Microsoft Office Excel untuk mencari regresi linear dengan hubungan antara nilai probit dengan log konsentrasi. Nilai LC50 dapat dihitung dengan memasukkan nilai log konsentrasi. Antilog nilai x tersebut merupakan nilai LC50 (Idris et al., 2019).

**3.12 Sterilisasi Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam uji antibakteri ini, disterilkan terlebih dahulu sebelum dipakai. Alat-alat gelas dibungkus dengan kertas perkamen disterilkan dioven pada suhu 170°C selama 1 jam. Media disterilkan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan erlemeyer tersumbat kapas. Alat-alat logam disterilkan dengan lampu bunsen selama 30 detik (Putri et al., 2020).

**3.13 Pembuatan Larutan Uji**

Dibuat larutan uji 40, 30, 20, dan 10% , pada konsentrasi 40% ditimbang 4 gram kemudian dilarutkan 10 mL ditambahkan DMSO (didapatkan larutan induk

baku) kemudian dibuat konsentrasi 30, 20, dan 10% menggunakan larutan induk baku, cukupkan dengan pelarut DMSO (Mardina et al., 2021).

**3.14 Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)**

*Nutrient Agar* (NA) sebanyak 1gram dilarutkan dalam 50 mL aquadest, dilarutkan dengan cara ditambahkan aquadest sedikit demi sedikit hingga NA kemudian dipanaskan dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirer* sampai homogen. Media disterilkan dengan mengguanakan autoklaf pada suhu 121ºC, tekanan 1,5 atm dan selama 15 menit ( Samputri et al, 2020).

**3.15 Pembuatan Agar Miring**

Sebanyak 10 mL media NA yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dan dibungkus mulut tabung lalu disterilkan didalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121oC. Kemudian tabung yang berisi agar diletakkan pada kemiringan 30-40oC. Diperhatikan bahwa media tidak menyentuh tutup tabung kemudian agar dibiarkan menjadi dingin dan padat (Arina et al., 2023).

**3.16 Pembuatan Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)**

Sebanyak 9,5 gram MHA dilarutkan dalam 250 mL aquades kemudian dipanaskan dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirer* sampai homogen. Media disterilkan dengan mengguanakan autoklaf pada suhu 121ºC, tekanan 1,5 atm dan selama 15 menit. Setelah disterilisasi dimasukkan kedalam cawan petri sebanyak 15 mL yang akan digunakan sebagai medium dalam uji antibakteri (Mardina et al., 2021).

**3.17 Pembuatan Suspensi standar 0,5 Mc. Farland**

Suspensi standar yang menunjukkan konsetrasi kekeruhan suspensi bakteri

Sama dengan 108 CFU/ml.

Komposisi : Larutan Asam Sulfat 1% : 9,95 mL Larutan Barium Klorida 1% : 0,05 mL

Cara pembuatan :

Kedua larutan dicampurkan ke dalam labu ukur 10 mL steril, dikocok sampai homogen dan ditutup. Apabila kekeruhan hasil suspense bakteri sama dengan kekeruhan suspense standar berarti konsentrasi 108 CFU/mL (Depkes RI,

1995).

**3.18 Peremajaan Bakteri**

Mengambil bakteri uji dengan jarum steril, lalu ditanamkan pada media MHA dengan cara menggores. Selanjutnya di inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam, bakteri uji dari yang telah diremajakan diambil dan disuspensikan kedalam 10 mL NaCL 0,9% (Mardina et al., 2021).

**3.19 Pembuatan Suspensi Bakteri**

Bakteri *Salmonella thypi dan Escherichia coli* dari hasil inkubasi diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 10 mL larutan Nacl 0,9% steril, kemudian di homogenkan dengan vortex hingga di peroleh kekeruhan suspense bakteri yang sama dengan kekeruhan standar Mc Farland. Ini berarti konsentrasi bakteri adalah 108 CFU/mL. Setelah itu dilakukan pengenceran dengan memipet 0,1 mL biakan bakteri (108 CFU/mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi larutan Nacl 0,9% sebanyak 10 mL kemudian homogenkan dengan vortex, maka di peroleh suspense bakteri dengan konsentrasi 106 (Ditjen POM,1995).

**3.20 Uji Aktivitas Antibakteri**

Pengujian aktivitas antibakteri metode difusi cakram dengan cara dituangkan sebanyak 20 mL media MHA ke cawan petri kemudian digoyangkan dan dibiarkan sampai memadat kemudian suspense bakteri *Salmonella thypi dan Escherichia coli* diswab dengan menggunakan swab steril secara merata pada media MHA. Kemudian diletakkan kertas cakram yang direndam ekstrak daun pletekan dengan konsentrasi 40, 30, 20, dan 10%, chloramphenicol kapsul sebagai kontrol positif dan aquadest sebagai kontrol negatif diletakkan diatas media dengan menggunakan pinset steril, percobaan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Kemudian diinkubasi selama 18- 24 jam pada suhu 37oC dalam inkubator, setelah itu diukur zona hambat (bening) (Mardina et al., 2021).

**3.21 Pengamatan dan Pengukuran Diameter Zona Hambat**

Pengamatan untuk penghambatan pertumbuhan bakteri *Salmonella thypi dan Escherichia coli* dilakukan dengan mengukur diameter zona jernih disekitar cakram kertas dengan menggunakan jangka sorong yang merupakan diameter zona penghambatan (Mardina et al., 2021).

**3.22 Analisis Data**

Data yang diperoleh akan dianalisa secara manual. Kemudian data hasil pengukuran diamteter zona hambat ekstrak daun pletekan terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella thypi dan Escherichia coli* dengan menggunakan media agar akan disajikan dalam bentuk tabel untuk menilai kekuatan daya hambat bakteri dikategorikan menurut Davis dan Stout (1979) dalam jurnal Alouw et al., (2022) sangat kuat (zona bening >20mm), kuat (zona bening 10-20mm), sedang (zona bening 5-10mm), lemah <5 mm.