

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental, dengan pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram kertas yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dengan variasi konsentrasi etanol 40%, 70%, dan 96% terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

B. Lokasi Penelitian

1. Lokasi penelitian

- a. Determinasi daun sirih dilakukan di Laboratorium Ekologi Dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains Dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Universitas Ngudi Waluyo Semarang. Laboratorium yang digunakan yaitu laboratorium bahan alam (penelitian ekstrak) dan laboratorium mikrobiologi (uji aktivitas antibakteri) S1 Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Semarang.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian akan dilaksanakan pada bulan Juni sampai bulan Agustus 2024.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirih (*Piper betle* L) yang berasal dari Ungaran, Kabupaten Semarang.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirih (*Piper betle* L) sebanyak 5 kg yang berasal dari Ungaran, Kabupaten Semarang.

D. Defenisi oprasional

1. Ekstraksi

Metode ekstraksi maserasi yaitu dengan mencampurkan serbuk simplisia yang direndamkan dengan pelarut varian konsentrasi etanol (40%,70%, dan 96%) didalam toples tertutup rapat pada suhu ruangan selama 5 hari.

2. Ekstrak daun sirih (*Piper betle* L)

Ekstrak daun sirih adalah ekstrak yang didapatkan dari proses maserasi dengan pelarut varian konsentrasi etanol (40%, 70%, dan 96%), kemudian dilanjutkan pada proses penguapan menggunakan *evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak pekat.

3. Aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri merupakan uji yang akan dilakukan terhadap sampel ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dengan variasi pelarut terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode difusi cakram dan hasilnya berupa zona hambat.

4. Zona hambat

Zona hamabat merupakan daerah bening di sekeliling cakram dari media pertumbuhan bakteri uji yang tidak ditumbuhi bakteri.

E. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

- a. Ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) menggunakan etanol dengan konsentrasi 40%, 70%, dan 96%.
- b. Ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%.

2. Variabel tergantung

Potensi antibakteri ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) dengan variasi konsentrasi etanol terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* berdasarkan zona hambat.

3. Variabel terkendali

Simplisia daun sirih (*Piper betle* L), cara pembuatan ekstrak, pelarut yang digunakan, media pertumbuhan, suhu inkubasi, lama inkubasi, metode pengujian antibakteri.

F. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf (Hiramaya), oven (Memmert UN-30), inkubator (Memmert), *laminar air flow* (Airtech), timbangan analitik (Ohaus), silet, pengaduk kaca, kertas saring, kertas perkamen, cawan petri, gelas ukur, erlenmeyer, *beaker*

glass (pyrex/Iwaki), pinset, mikro pipet, tabung reaksi (pyrex), jangka sorong, kertas label, *sentrifuge*, penggarais, spidol, cawan porselin, bunsen, jarum ose, plat tetes, kertas cakram, lemari pendingin, kamera digital, kasa, tisu, *moisture analyzer*, kapas, benang dan blender (Philips).

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirih (*Piper betle* L) yang segar, media NA (*Nutrient Agar*), etanol 70%, aquades steril, etanol 96%, NaCl 0,9%, aquades, bakteri *staphylococcus aureus*, asam klorida, FeCl₃, dan larutan Mc.farland standar 0,5 (perkiraan bakteri suspensi/ml $1,5 \times 10^8$).

G. Prosedur Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi daun sirih dilakukan di Laboratorium Ekologi Dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains Dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

2. Pembuatan simplisia

Diambil daun sirih yang masi segar sebanyak 3 kg, dilakukan sortasi basah (pemisahan dari kotoran-kotoran) pada daun sirih, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan bersih, kemudian ditiriskan. Daun sirih diiris lalu dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari tidak langsung dan ditutupi menggunakan kain hitam. Setelah simplisia kering dilakukan sortasi kering, kemudian daun sirih dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk serta diayak dengan pengayak

ukuran 40 mesh. Simpan serbuk di dalam toples dan serbuk siap untuk di ekstrak.

3. Uji kadar air simplisia

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara cawan porselin dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 1 jam dan ditimbang bobotnya. Simplisia ditimbang menggunakan neraca analitik 2 g, dan dimasukkan kedalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Kemudian sampel didinginkan di dalam desikator selama 20 menit dan ditimbang bobotnya (Syafriada *et al.*, 2018)

Rumus % Kadar air sebagai berikut:

$$\text{kadar air (\%)} = \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

a = bobot sampel sebelum pemanasan (gram)

b = bobot sampel setelah pemanasan (gram)

4. Uji kadar abu simplisia

Sejumlah serbuk simplisia dimasukan kedalam krus porselen terlebih dahulu lalu ditimbang sebanyak 2 g. Cawan yang sudah berisi serbuk simplisia dimasukan kedalam *furnace*, perlahan-lahan dipanaskan mulai dari suhu kamar sampai 600°C selama 3 jam. Kemudian didinginkan dalam desikator sampai beratnya konstan, kemudian ditimbang bobotnya (Mayasari & Laoli, 2018).

Kadar abu total dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{kadar abu (\%)} = \frac{\text{Berat abu}}{\text{Berat sampel awal}} \times 100\%$$

5. Pembuatan ekstrak daun sirih

Simplisia daun sirih ditimbang 100 gram direndam di dalam botol gelap menggunakan varian pelarut etanol 40%, 70%, dan 96% sebanyak 800 ml selama 3 x 24 jam setiap hari diaduk menggunakan batang pengaduk. Ekstrak yang diperoleh kemudian di saring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 1 dan residu 1. Residu yang ada kemudian direndam lagi (remaserasi) dengan varian pelarut etanol 40%, 70%, 96% sebanyak 480 ml selama 2x24 jam, dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak semi kental, kemudian dilakukan pemanasan dengan menggunakan *water bath* dengan suhu 50°C sehingga mendapatkan ekstrak kental (Arina *et al.*, 2023). Hasil ekstrak kental kemudian dihitung persen rendemen menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{berat simplisia awal}} \times 100\%$$

6. Uji kadar air ekstrak

Pengukuran kadar air ekstrak dilakukan dengan cara cawan porselin dikeringkan menggunakan oven, pada suhu 105°C selama 1 jam dan ditimbang bobotnya. Sampel ditimbang menggunakan neraca analitik 2 g, dan dimasukkan kedalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Kemudian sampel didinginkan di dalam desikator selama 20 menit dan ditimbang bobotnya (Syafrida *et al.*, 2018).

Rumus % Kadar air sebagai berikut:

$$\text{kadar air ekstrak (\%)} = \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

a = bobot sampel sebelum pemanasan (gram)

b = bobot sampel setelah pemanasan (gram)

7. Uji bebas etanol

Ekstrak daun alpukat diambil sebanyak 1 gram lalu ditambahkan 1 mL kalium dikromat dan 2 tetes H_2SO_4 pekat. Hasil positif etanol ditandai dengan perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan (Scottish Water, 2020)

8. Uji fitokimia

a. Flavanoid

Ekstrak daun sirih ditimbang sebanyak 10 mg masing-masing ekstrak lalu tambahkan serbuk magnesium sebanyak 2 mg dan beri 3 tetes HCl pekat. Terbentuknya perubahan warna merah, kuning atau jingga menandakan reaksi positif terhadap flavonoid (Ramadhani *et al.*, 2020).

b. Saponin

Ekstrak daun sirih masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg, ditambahkan 20 ml air panas. Selanjutnya di kocok kuat selama 10 detik, akan terbentuk buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama 30 menit, dan tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Ramadhani *et al.*, 2020).

c. Fenolik

Timbang 10 mg ekstrak daun sirih, tambahkan 20 ml air panas dan tambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif jika terbentuk warna biru kehitaman atau hijau kehitaman (Ramadhani *et al.*, 2020).

d. Alkaloid

Ditimbang 0,5 g ekstrak, ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk uji dengan pereaksi mayer (positif endapan bening), dragendroff (positif endapan merah bata), dan bouchardat (positif endapan coklat). Bila 2 dari 3 uji tersebut positif, maka sampel dinyatakan positif mengandung alkaloid (Badaring *et al.*, 2020).

e. Tanin

Timbang 0,5 g dimasukkan kedalam cawan lalu ditimbang dengan 20 ml air panas dan larutan NaCl 10% sebanyak 3 tetes, kemudian ditambahkan larutan FeCl_3 , bila terbentuk warna biru hitam menunjukkan adanya tanin (Handayani *et al.*, 2020).

9. Identifikasi bakteri

Langkah pertama mengambil NaCl kemudian ditetaskan ke dalam objek gelas dan dikeringkan, ose disterilkan dengan bunsen dan mengambil satu ose biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, letakkan bakteri pada objek gelas. Langkah kedua, tetaskan pewarnaan gram kristal violet kedalam objek glass tunggu selama 2 menit setelah itu warna

dilunturkan menggunakan aquadest mengalir. Langkah ketiga, teteskan lugol selama 1 menit dilunturkan menggunakan aquadest, ditetes pemucat warna yaitu alkohol 95% selama 1 menit dilunturkan menggunakan aquadest mengalir. Langkah keempat, teteskan safranin selama 2 menit. Kemudian preparat dicuci menggunakan aquades mengalir dan dikeringkan dan diamati morfologi serta warna selnya di bawah mikroskop. Bakteri dikelompokkan menjadi gram positif jika selnya berwarna ungu dan gram negatif jika selnya berwarna merah (Amalia, 2013).

10. Larutan uji kontrol positif dan negatif

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah kloramfenikol disk. Kontrol negatif menggunakan DMSO (dimetil sulfoksida).

11. Pembuatan konsentrasi ekstrak daun sirih

Pembuatan konsentrasi ekstrak daun sirih dibuat dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%. Dipipet berturut-turut sebanyak 0,25 ml, 0,5 ml, 0,75 ml, 1 ml, dan 1,25 ml dan dicukupkan dengan larutan DMSO sampe tanda batas menggunakan labu ukur 5 ml.

12. Sterilisasi alat dan media

Semua alat-alat dan media yang akan digunakan pada penelitian ini terlebih dahulu disterilkan. Alat-alat non gelas dapat disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sedangkan alat-alat gelas disterilkan menggunakan oven dengan suhu 180°C selama 1

jam. Alat dan bahan yang disterilkan adalah alat dan bahan yang tahan dan tidak mengalami kerusakan pada suhu tinggi. Meja dan lemari aseptis disterilkan dengan cara dibersihkan terlebih dahulu dan disemprot dengan etanol 70% serta pinset dan jarum ose dipijar diatas lampu bunsen.

13. Pembuatan media *Nutrien Agar* (NA)

Media NA di timbang sebanyak 4,5 g, kemudian dilarutkan kedalam aquades 250 ml. Medium NA dipanaskan diatas bunsen, sambil dipanaskan media di aduk hingga homogen dan di tunggu hingga mendidih. Media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

14. Peremajaan bakteri uji

Timbang NA masukan kedalam *beaker glass*, tambahkan aquades. Pindahkan kedalam tabung reaksi yang telah di kalibrasi 10 ml, tutup tabung reaksi dengan kapas yang telah dilapisi kasa, kemudian disterilkan di dalam autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

Setelah di sterilisasi miringkan letak tabung reaksi didalam lemari aseptis yang telah disemprot dengan etanol 70% tunggu sampai agar padat, lalu oleskan bakteri *staphylococcus aureus* di atas agar menggunakan jarum ose yang sudah di sterilkan. Inkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37 °C.

15. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri *staphylococcus aureus* di peroleh dari peremajaan pada medium NA di dalam tabung reaksi. Bakteri *staphylococcus aureus* yang

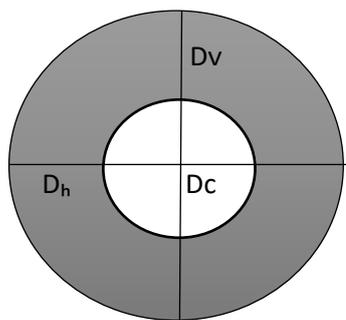
digunakan dalam bentuk suspensi. Suspensi dibuat dengan mengambil masing-masing 1-2 ose isolat, biakan bakteri *staphylococcus aureus* dibiakan kedalam tabung reaksi steril yang telah diisi larutan NaCl 0,9%. Campuran dihomogenkan dengan vortex, kekeruhan campuran dibandingkan dengan kekeruhan Mc.farland standar 0,5 (perkiraan bakteri suspensi/ml $1,5 \times 10^8$) yang ada dilaboratorium.

16. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas bakteri dilakukan menggunakan metode difusi kertas cakram. Suspensi bakteri *staphylococcus aureus* yang telah disamakan dengan standar Mc.farland diambil 1 ml (1000 μ l) pada cawan petri, kemudian tambahkan media NA lalu homogenkan, tunggu sampai media setengah padat, Kemudian cawan petri dibagi menjadi 5 bagian, masing-masing diberi label, kemudian kertas cakram dicelupkan kedalam masing-masing konsentrasi ekstrak daun sirih. Kertas cakram yang telah dicelupkan kedalam konsentrasi ekstrak daun sirih, selanjutnya dikeringkan dengan angin dan diletakkan diatas medium NA yang telah ada bakteri uji dan dibiarkan padat. Kontrol positif menggunakan kloramfenikol disk dan DMSO (dimetil sulfoksida) sebagai kontrol negatif. Kemudian diinkubasi selama 1 kali 24 jam pada suhu 37°C. Diameter zona hambat yang dibentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong.

Rumus pengukuran zona hambat (Magvirah *et al.*, 2019)

$$\text{zona hambat} = \frac{(Dv - Dc) + (Dh - Dc)}{2}$$



Keterangan :

Dv : diameter vertikal

Dh : diameter horisontal

Dc : diameter cakram

H. Analisa data

Data diperoleh dengan cara mengukur diameter zona bening yang terbentuk dari ekstrak daun sirih. Data yang diperoleh dari uji aktivitas ekstrak daun sirih pada masing-masing pelarut dianalisis menggunakan SPSS for windows SPSS versi 22 untuk melihat data yang didapatkan memiliki perbedaan signifikan atau tidak. Dianalisa normalitas terlebih dahulu jika nilai $P >$ dari 0,05 yang berarti data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji oneway anova, jika nilai $P <$ dari 0,05 yang berarti data tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji non parametrik (Purnamasari *et al.*, 2018).