

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan menggunakan teknik difusi cakram untuk melihat perbandingan efektivitas antibakteri daun dan batang seledri (*Apium graveolens* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian berlangsung mulai bulan Juli hingga bulan September 2023 di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Determinasi daun dan batang seledri dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Daun dan batang seledri (*Apium graveolens* L.) yang diambil dari Perkebunan Sayur Sukomakmur Kecamatan Kajoran, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah dengan ketinggian 1.600 mdpl.

2. Sampel

Daun dan batang seledri dikumpulkan sebanyak 3 kg. Daun dan batang seledri yang dipilih yaitu daun dan batang seledri yang masih segar, berwarna hijau, dengan umur tanaman \pm dua bulan.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : seri konsentrasi ekstrak daun dan batang seledri.
2. Variabel terikat : diameter zona hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus*.
3. Variabel terkontrol : waktu inkubasi media uji selama 24 jam dengan suhu 37°C dan usia tanaman seledri.

E. Definisi operasional

1. Ekstrak daun dan batang seledri dibuat seri konsentrasi 0,25%, 0,5%, 1%, 2% dan 4%.
2. Diameter zona hambat merupakan zona bening di sekitar kertas cakram yang tidak ditumbuhi bakteri uji dan diukur menggunakan jangka sorong secara vertikal, horizontal dan diagonal.
3. Usia tanaman daun dan batang seledri yang digunakan yaitu \pm 2 bulan.

F. Alat dan Bahan

1. Alat penelitian

a. Pembuatan simplisia dan ekstrak

Timbangan analitik (Ohaus SW version 10S), ayakan mesh 40 (Test Scieve), toples kaca besar, kertas saring, *aluminium foil*, gelas ukur (Pyrex), kompor listrik (Maspion S-301), spatula kayu, oven (Memmert IN60), grinder (Fomac), penangas air, dan corong.

b. Alat uji organoleptik dan skrining fitokimia

Tabung reaksi (Pyrex), rak tabung, timbangan analitik (Ohaus SW version 10S), gelas beaker (Pyrex), labu ukur, kertas saring, pipet tetes, corong, kompor, baskom, pipet ukur.

c. Alat uji KLT

Gelas bejana, gelas beaker, *white tip*, lampu UV 254 dan 366 nm.

d. Alat uji aktivitas antibakteri

Sarung tangan, masker, cawan petri, kertas cakram, mikropipet (DLab), pinset, bunsen, inkubator (Memmert IN30), jangka sorong, spidol, jarum ose, oven (Memmert IN160), *Biological Safety Cabinet* (Daihan LabTech), autoklaf (GEA), *blue tip*, *beaker glass*, tabung reaksi (Pyrex), batang pengaduk, spektrofotometer UV-Vis (Genesis 10S UV-VIS), erlenmeyer (Pyrex), vortex, batang L, dan *hot plate*.

2. Bahan penelitian

a. Pembuatan ekstrak

Serbuk daun dan batang seledri yang lolos ayakan 40 mesh, etanol 70%.

b. Bahan pengujian organoleptik dan skrining fitokimia

Ekstrak daun dan batang seledri, HCl 2 N, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, asam klorida, magnesium, kuersetin, etanol 70%, H₂SO₄, FeCl₃ 1%, serbuk magnesium.

c. Bahan uji KLT

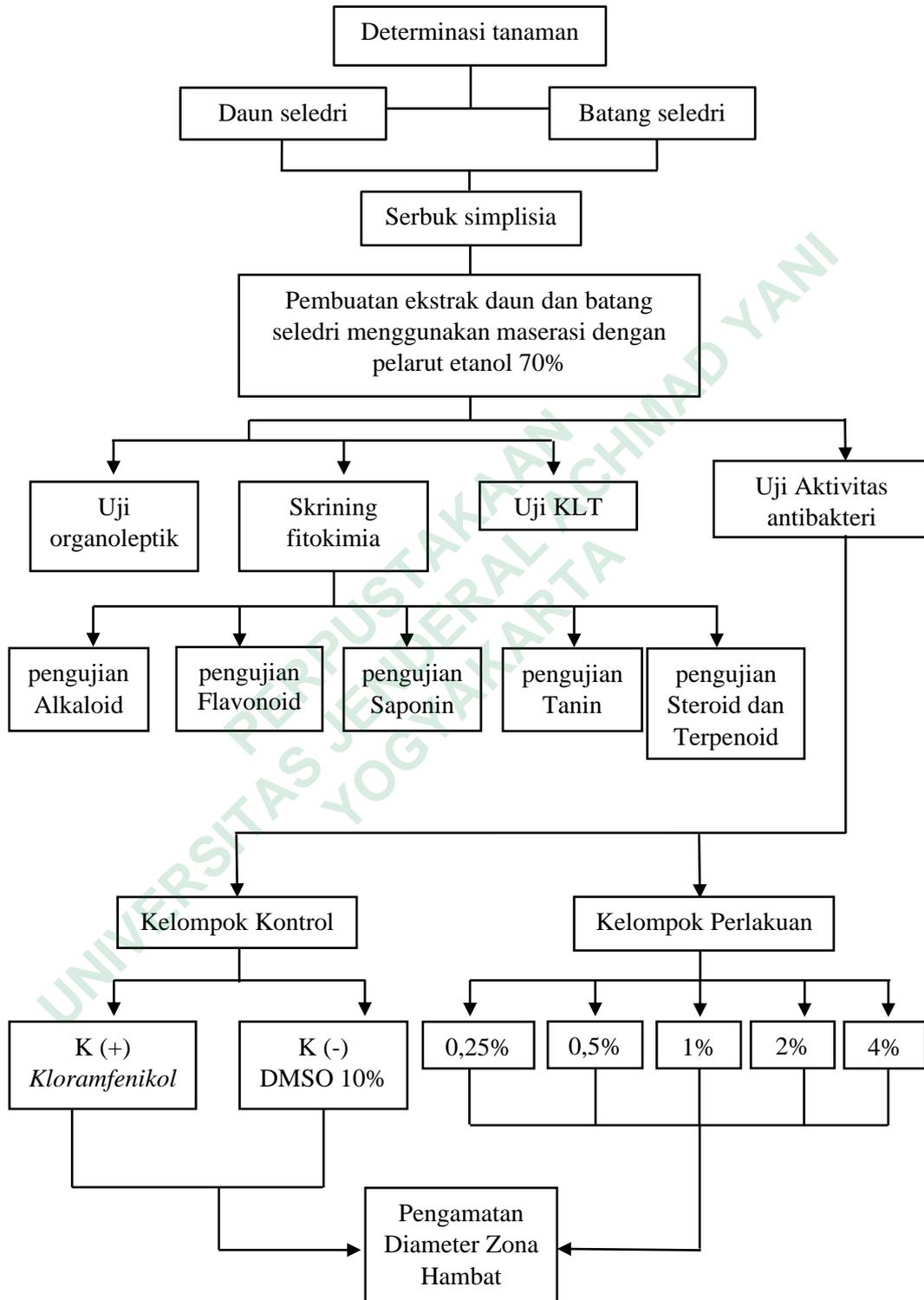
Ekstrak daun dan batang seledri, etanol 70%, kuersetin 0,1%, metanol, kloroform, etil asetat, n-heksan, dan plat KLT

d. Bahan uji aktivitas antibakteri

Ekstrak daun dan batang seledri, media MHA, media NA, biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, *paper blank disk*, *paper disk* kloramfenikol 30 µg, NaCl 0,9%, DMSO, asam sulfat, dan barium klorida

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA

G. Prosedur Penelitian



Gambar 4. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan sampel

a. Determinasi tanaman

Dilakukan identifikasi daun dan batang seledri di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Tujuannya untuk memastikan kebenaran jenis tanaman seledri benar menggunakan seledri (*Apium graveolens* L) sesuai yang diinginkan.

b. Pengumpulan sampel

Sampel penelitian adalah daun dan batang seledri (*Apium graveolens* L) yang baru dikumpulkan di perkebunan Sayur Sukomakmur di Kecamatan Kajoran, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah. Daun dan batang seledri yang diambil harus segar, tidak rusak, hijau muda, dan berusia kurang lebih dua bulan.

c. Pembuatan simplisia

Diambil daun dan batang seledri masing-masing sebanyak 3 kg yang telah dipotong dari akarnya dan dicuci dengan air mengalir. Daun dan batang seledri yang sudah bersih ditiriskan dan dilakukan perajangan. Daun dan batang seledri dikeringkan pada suhu 40°C dalam oven hingga kering. Daun dan batang seledri dikatakan kering apabila daun dan batang seledri hancur saat diremas dengan tangan. Daun dan batang seledri kering kemudian digrinder dan diayak melalui saringan ukuran 40 mesh untuk membuat serbuk halus (Luthfiyani, 2019).

d. Pembuatan ekstrak

Proses maserasi dalam pelarut etanol 70% digunakan untuk membuat ekstrak. Masing-masing batang seledri dan daun ditimbang lalu direndam dalam pelarut yang digunakan dengan perbandingan 1:10. Maserasi berlangsung tiga hari, selama itu terlindung dari sinar matahari dan diaduk setiap dua belas jam. Hasil dari perendaman pertama kemudian disaring, residu direndam dalam etanol 70% kembali selama 1 hari lalu diaduk setiap 12 jam. Filtrat yang dihasilkan dari perendaman pertama dan kedua digabungkan untuk diuapkan dengan penangas air menggunakan suhu 40-50°C hingga dihasilkan ekstrak kental batang dan daun seledri (Luthfiyani,

2019). Setelah itu gunakan rumus persamaan (1) untuk menghasilkan nilai rendemen.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

2. Kontrol kualitas

a. Pemeriksaan organoleptik

Pengujian ini menggunakan panca indera untuk melihat warna, bentuk, aroma, dan rasa dari sampel yang digunakan (Yuliani *et al.*, 2016).

b. Skrining fitokimia

1) Pemeriksaan Alkaloid

Ditimbang masing-masing 1 gram ekstrak daun dan batang seledri kemudian tambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL akuades yang kemudian dipanaskan hingga mendidih lalu disaring. Ditambahkan 3 tetes pereaksi *Mayer* pada tabung reaksi pertama apabila terjadi endapan putih maka menunjukkan hasil positif, tambahkan 3 tetes pereaksi *Dragendroff* pada tabung kedua apabila menunjukkan warna endapan jingga maka hasil positif dan 3 tetes pereaksi *Wagner* pada tabung ketiga jika tabung ketiga terdapat endapan merah kecoklatan maka hasilnya adalah positif mengandung alkaloid (Gustiana *et al.*, 2022).

2) Pemeriksaan Flavonoid

Sebuah tabung reaksi diisi dengan masing-masing 1 gram ekstrak daun dan batang seledri, bubuk Mg, dan asam klorida pekat beberapa tetes. Jika larutan berubah warna kuning jingga hingga merah, berarti terdapat flavonoid (Martha & Zummah, 2019).

3) Pemeriksaan Saponin

Dalam tabung reaksi, 2 gram ekstrak daun dan batang seledri masing-masing dicampur dengan 10 mL air mendidih, didinginkan, dan dikocok hingga terbentuk busa. Campuran kemudian didiamkan selama 2 menit, selanjutnya ditambahkan beberapa tetes HCL 2N. Hasil uji menunjukkan positif apabila terbentuk buih konstan selama 10 menit (Lianah *et al.*, 2021).

4) Pemeriksaan Tanin

Ekstrak daun dan batang seledri masing-masing dipanaskan dengan air hingga mendidih. Proses pemanasan ini dapat membantu dalam ekstraksi senyawa tanin yang terlarut dalam air. Setelah dididihkan, saring ekstrak untuk memisahkan cairan dari padatan yang mungkin ada. Selanjutnya teteskan beberapa tetes larutan FeCl_3 1% ke dalam ekstrak yang telah disaring. FeCl_3 digunakan sebagai reagen untuk mendeteksi keberadaan tanin. Amati setiap perubahan warna yang terjadi setelah penambahan FeCl_3 . Jika muncul warna biru kehitaman atau cokelat kehijauan, menunjukkan hasil uji positif tanin (Ikalinus *et al.*, 2015).

5) Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

Diambil plat tetes bersih dan tambahkan pereaksi Liebermann-Burchard ke dalamnya. Ditambahkan 1 mL kloroform ke dalam plat tetes yang telah berisi reagen *Liebermann-Burchard*. Fase kloroform digunakan sebagai pelarut untuk mengeluarkan senyawa steroid dan terpenoid dari sampel. Tambahkan ekstrak daun dan batang seledri masing-masing sebanyak 0,5 gram ke dalam plat tetes. Amati perubahan warna yang terjadi setelah penambahan sampel. Jika ada pembentukan lapisan cincin biru atau hijau, berarti positif untuk uji steroid. Selanjutnya, jika terdapat warna merah atau ungu, berarti positif pada uji terpenoid (Gustiana *et al.*, 2022).

3. Uji KLT

a. Persiapan KLT

Disiapkan plat KLT GF 254 berukuran 10 x 4 cm. Selanjutnya untuk menunjukkan batas elusi, ditandai garis bagian bawah sejauh 1 cm dan tandai garis pada bagian atas plat sejauh 1 cm. Disiapkan larutan senyawa standar kuersetin 0,1% yang akan digunakan sebagai pembanding.

b. Optimasi fase gerak

Optimasi fase gerak dengan memvariasikan rasio n-heksana, metanol, etil asetat, dan kloroform. Ada lima rasio fase gerak berbeda yang dipakai: n-heksana: etil asetat (3:7), kloroform: metanol: etil asetat (3:5:2), kloroform: etil asetat (7:3), dan kloroform: metanol: etil asetat (8:2) (Nazar, 2023).

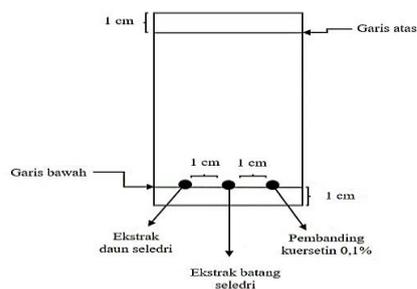
c. Pembuatan larutan standar kuersetin 0,1%

2 mg kuersetin standar dilarutkan dalam 2 mL etanol 70% (Asmorowati & Lindawati, 2019).

d. Penotolan ekstrak pada plat KLT

Untuk menghilangkan kandungan air pada pelat KLT dipanaskan hingga suhu 105°C dalam oven selama 30 menit. Plat ditempatkan dalam wadah jenuh setelah diberi noda dengan sampel (ekstrak daun dan batang seledri) dan standar kuersetin 0,1% di bagian bawah piring dengan jarak 1 cm pada setiap titik (gambar titik sampel ditunjukkan pada Gambar 5). Dengan menggunakan pinset, pelat KLT dikeluarkan dari chamber dan ditempatkan diluar hingga kering di udara terbuka setelah proses elusi mencapai garis batas atas. Agar noda pada pelat KLT lebih terlihat, reagen $AlCl_3$ kemudian disemprotkan pada pelat tersebut. Noda yang muncul ditandai dan dihitung menggunakan rumus pada persamaan (2).

$$R_f = \frac{\text{Jarak elusi sampel (cm)}}{\text{Jarak perambatan fase gerak dari titik penotolan (cm)}} \% \dots\dots\dots (2)$$



Gambar 5. Penotolan dan pemberian Garis Batas Plat KLT

4. Uji aktivitas antibakteri

a. Sterilisasi alat

Perangkat keras kaca termasuk cawan petri dan tabung reaksi dibersihkan dalam oven bersuhu 170°C selama 60 menit. Perlengkapan dicuci, dikeringkan, dan ditutup dengan kertas payung. Sebelum dibungkus dengan kertas payung, wadah yang berlubang ditutup rapat dengan kapas terlebih dahulu. Jarum ose dan pinset langsung disterilkan memakai alkohol 70% dan dipijarkan di atas api bunsen hingga berwarna merah mengkilat. (Armaleni *et al.*, 2019).

b. Pembuatan media

1) *Nutrient Agar* (NA) miring untuk peremajaan bakteri

Disiapkan 1,2 gr *Nutrient Agar* (NA) dan 60 mL akuades ke labu erlenmeyer, masukkan *magnetic stirrer* dan panaskan di atas *hot plate* hingga homogen. Selanjutnya tutup mulut erlenmeyer dengan kapas dan *aluminium foil* untuk mencegah kontaminasi. Sterilkan erlenmeyer yang berisi media yang sudah homogen menggunakan autoklaf bersuhu 121 °C tekanan 1 atmosfer selama lima belas menit. Selanjutnya tuang dalam 6 tabung reaksi tiap tabung sebanyak 5 mL. Tabung yang berisi media diletakkan pada posisi miring dan biarkan hingga dingin dan memadat (Pangemanan *et al.*, 2022).

2) Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

Dituangkan akuades terlebih dahulu sebanyak 250 mL ke dalam erlenmeyer lalu masukkan media MHA sebanyak 8,5 gram. Masukkan *magnetic stirrer* dan letakkan erlenmeyer yang berisi media di atas *hot plate* untuk menghomogenkan media. Ditutup lubang pada leher labu erlemeyer dengan menggunakan kapas dan bungkus menggunakan *aluminium foil* untuk mencegah kontaminasi. Sterilkan erlenmeyer yang berisi media yang telah homogen tersebut dengan autoklaf suhu 121°C tekanan 1 atmosfer selama 15 menit. Media yang sudah disterilisasi selanjutnya dituangkan ke cawan petri. Media yang sudah dituang jangan langsung ditutup untuk menghindari jatuhnya uap air ke dalam media. Jika

sudah dingin dan mengeras tutup cawan petri (Nurdiansyah, 2018). Selama media belum digunakan dapat disimpan pada suhu 4°C (Utomo *et al.*, 2018).

c. Pembuatan Larutan *McFarland* 0,5

Sebanyak 9,95 mL asam sulfat (H₂SO₄) 1% dicampur dengan 0,05 mL BaCl₂ 1% . Larutan standar *McFarland* diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan frekuensi 625 nanometer. Pengukuran absorbansi untuk melihat larutan standar mempunyai nilai serapan 0,08-0,1. Jika hasilnya tidak di antara 0,08-0,1 maka digunakan pengenceran dengan akuades dan hasilnya diuji sekali lagi menggunakan spektrofotometer UV-Vis hingga kisaran yang diperlukan tercapai. Standar *McFarland* yang digunakan yaitu *McFarland* 0,5 yang artinya mengandung sekitar 1,5x10⁸ CFU/mL suspensi bakteri (Nuria, 2010). Setelah itu, larutan *McFarland* yang telah disiapkan disimpan pada suhu ruang yang terhindar dari matahari langsung (Aviany & Pujiyanto, 2020).

d. Peremajaan bakteri

Bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dengan jarum ose steril dan dimasukkan ke dalam media NA miring. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Hasanuddin & Salnus, 2020).

e. Pembuatan suspensi bakteri

Satu ose bakteri uji yang menghasilkan peremajaan diambil dan kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi dengan dua mililiter larutan natrium klorida 0,9% steril. Suspensi kemudian divortex hingga homogen. Ketika dibandingkan dengan standar *McFarland*, tingkat kekeruhan adalah 0,5 (Kurniawan *et al.*, 2019).

f. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak uji

Untuk memperoleh konsentrasi stok 10%, 1 gram ekstrak daun dan batang seledri dilarutkan dalam 10 mL DMSO 10%. Konsentrasi diubah menjadi 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, dan 4% dalam DMSO 10% dengan menggunakan rumus pengenceran $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ (Khaerati & Ihwan,

2011). Lampiran 12 berisi rincian perhitungan untuk pembuatan seri konsentrasi.

g. Pengujian antibakteri

Diambil suspensi bakteri menggunakan mikropipet (sebanyak 0,1 mL) lalu dituangkan ke media MHA (*Muller Hinton Agar*), ratakan bakteri pada permukaan media dengan menggunakan metode *spread plate*. Setelah itu, gunakan batang L untuk meratakan bakteri hingga ke seluruh permukaan media. Selanjutnya diambil kertas cakram dengan pinset steril kemudian rendam ke dalam cawan petri yang berisi larutan sampel dengan seri konsentrasi yang sudah dibuat (0,25%, 0,5%, 1%, 2% dan 4%) selama kurang lebih 10 menit dan tiriskan. Kertas cakram yang sudah ditiriskan, diletakkan di atas cawan petri, berikan jarak antara masing-masing konsentrasi, tekan kertas cakram perlahan agar menempel pada permukaan cawan. Kertas cakram dicelupkan DMSO 10% sebagai kontrol negatif, dan *paper disk* kloramfenikol 30 µg sebagai kontrol positif. Diletakkan masing-masing di atas permukaan media MHA secara aseptis dengan menggunakan pinset. Kemudian media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening di sekitar cakram diukur dengan menggunakan jangka sorong. (Lianah *et al.*, 2021).

Kelompok pengujian aktivitas antibakteri yaitu:

- 1) Kelompok kontrol: kloramfenikol sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif
- 2) Kelompok perlakuan:
 - a) Ekstrak daun seledri konsentrasi 0,25%, 0,5%; 1%; 2%; dan 4%.
 - b) Ekstrak batang seledri konsentrasi 0,25%, 0,5%; 1%; 2%; dan 4%.

H. Analisis Data

Analisis yang dilakukan yakni secara deskriptif menggunakan program SPSS. Zona hambat yang terbentuk dari beberapa seri konsentrasi dianalisis untuk mengetahui perbedaannya signifikan atau tidak. Sebelum dilakukan analisis secara statistik, data yang diperoleh harus di cek

normalitas dan homogenitasnya. Untuk menentukan normalitas data digunakan uji *Shapiro-Wilk*. Pengujian ini dipakai apabila jumlah datanya < 50 . Jika tingkat signifikansi $> 0,05$ maka datanya dinyatakan terdistribusi normal. Kemudian uji homogenitas ditujukan guna melakukan pengujian varian data semua kelompok yaitu menggunakan uji *Lavene's*. Data disebut homogen apabila menghasilkan nilai signifikansi $> 0,05$. Setelah data normal akan di uji parametrik *One-Way ANOVA (Analysis of Variance)* atau metode satu arah dengan tingkat kepercayaan 95%. Metode *One-Way ANOVA* untuk memastikan apakah data ada pengaruh konsentrasi pada zona hambat yang dibuktikan dengan nilai signifikan. Selanjutnya jika tidak normal akan diuji non parametrik *Kruskal-Wallis*.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANUWIS
YOGYAKARTA