

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan melihat aktivitas antibakteri ekstrak etanol sereh wangi pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Digunakan metode maserasi dalam mengekstraksi sereh wangi dengan pelarut etanol 70% dan metode sumuran digunakan sebagai metode uji aktivitas antibakteri.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi, Prodi Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Juli 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi dari penelitian ini yaitu tanaman sereh wangi yang diambil dari Kebosungo I Kelurahan Dlingo, Kapanewon Dlingo, Daerah Istimewa Yogyakarta pada bulan Mei 2024.
2. Sampel dari penelitian ini yaitu sereh wangi sebanyak 2 kg dengan warna batang kemerahan cenderung mengarah pada warna ungu dan tidak adanya sobekan pada daun. Sampel bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 didapatkan dari Balai Laboratorium Kesehatan Dan Kalibrasi Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas: variasi konsentrasi ekstrak etanol sereh wangi.
2. Variabel Terikat: diameter zona hambat serta konsentrasi hambat minimum dari bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3. Variabel Terkendali: pelarut ekstraksi maserasi, media pertumbuhan bakteri, waktu dan suhu inkubasi media uji, karakteristik sampel sereh wangi yang dipanen.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol sereh wangi merupakan sediaan pekat yang diperoleh dari penguapan pelarut (etanol 70%) yang digunakan pada proses ekstraksi senyawa aktif.
2. Diameter zona hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah area sekitar sumuran yang tidak ditumbuhi bakteri yang selanjutnya diukur dengan jangka sorong secara vertikal, horizontal dan diagonal.
3. Konsentrasi Hambat Minimum adalah konsentrasi minimum zat antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C.

F. Alat dan Bahan

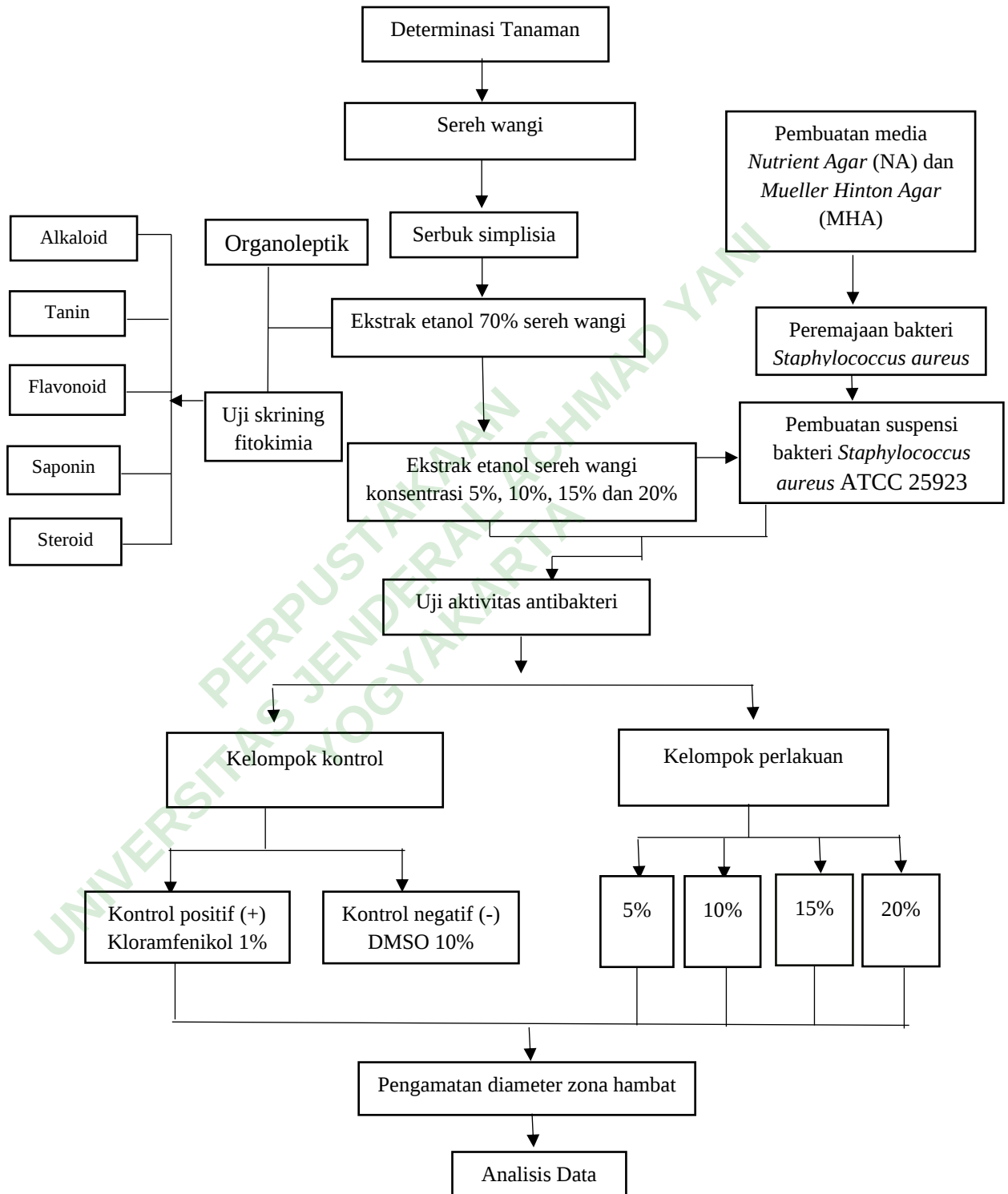
1. Alat

Aluminium foil, autoklaf (B-one), ayakan 40 mesh, batang L, *Biological Safety Cabinet* (Daihan Labtech), blender, cawan petri (Anumbra), *cork borer*, corong pisah 90 mm (Herma), *drop plate*, erlenmeyer 1000 ml (Iwaki), *hot plate* (IKA HS-7), jangka sorong, kertas saring, kompor listrik (Maspion), lampu bunsen, mikropipet 20-200 μ l, *moisture balance* (type MH90), oven (Mettler UN160), pembakar bunsen, pipet tetes, pisau, rak tabung, spatula kayu, timbangan analitik (Ohaus), tabung reaksi (Pyrex Iwaki), Turbidimeter (PhoenixSpec), *yellow tip*.

2. Bahan

Alkohol, amoniak, asam sulfat, aquadest, barium klorida, biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, DMSO 10%, etanol 70%, HCl 2N, kloramfenikol, larutan asetat anhidrat, larutan H₂SO₄, Magnesium, Media *Nutrient Agar* (Darmstadt) dan *Mueller–Hinton Agar* (OXOID), NaCl 0,9%, reagen Dragendorf, reagen Meyer, reagen Wagner.

G. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 4. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman sereh wangi dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

2. Persiapan Sampel

a. Pembuatan Simplisia

Ditimbang tanaman sereh wangi seberat 2 kg kemudian di sortasi untuk memisahkan kotoran-kotoran lalu cuci bersih sereh wangi dengan air mengalir. Sereh wangi yang sudah dicuci kemudian dirajang dengan ukuran 0,5 cm dan dikering anginkan pada suhu kamar untuk menghilangkan air (Sikawin *et al.*, 2018). Dikeringkan sampel yang telah dirajang menggunakan oven selama 24 jam dengan suhu 55°C. Dihaluskan sampel menggunakan blender hingga menjadi serbuk simplisia lalu diayak dengan ayakan 40 mesh (Nurcholis *et al.*, 2019).

b. Pembuatan Ekstrak

Ditimbang 2 x 200 gram serbuk sereh wangi, dimasukkan masing-masing hasil penimbangan ke dalam toples kaca. Dimaserasi serbuk pada masing-masing toples kaca dengan 2000 mL etanol 70%, kemudian diaduk manual selama 5 menit setiap 8 jam, maserasi dilakukan dalam suhu kamar selama 3x24 jam. Setelah 3x24 jam disaring dengan kertas saring *whatman* (Timothy *et al.*, 2023). Rendemen ekstrak didapatkan dari sejumlah ekstrak kental yang diuapkan di atas penangas air (Badriyah *et al.*, 2023). Perhitungan nilai rendemen yang diperoleh, dihitung menggunakan persamaan 1.

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

c. Pengujian Kadar Air Ekstrak

Ditimbang 1 gram ekstrak sereh wangi lalu diukur kadar air menggunakan alat *Moisture Balance*. Ditunggu sampai angka yang tertera berhenti yang menandakan pengujian sudah selesai. Kadar air dibaca dalam satuan persen.

3. Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan untuk simplisia dan ekstrak kental sereh wangi melalui pengamatan warna, tekstur, rasa dan bau.

4. Skrining Fitokimia

a. Uji Tanin

Ditimbang ekstrak sebanyak 1 mg masukkan ke tabung reaksi, ditambahkan larutan FeCl_3 1% sebanyak 2-3 tetes. Hasil positif dilihat dari perubahan warna menjadi hijau kehitaman (Pratiwi *et al.*, 2023).

b. Uji Alkaloid

Ditimbang 0,1 gram ekstrak dilarutkan dalam 2 mL etanol 70%, dimasukkan ke tabung reaksi A, B, dan C sebanyak 2 mL lalu tambahkan 1 mL HCL 2N dan ditambahkan 2-3 tetes reagen Meyer pada tabung A, jika hasil positif akan terbentuk endapan putih. Lalu dimasukkan 2-3 tetes reagen Wagner pada tabung B, jika terbentuk endapan jingga hingga coklat maka hasil dikatakan positif. Dimasukkan 2-3 tetes reagen Dragendroff pada tabung C jika hasilnya positif ditandai ketika terbentuk endapan jingga (Reiza *et al.*, 2019). Ekstrak etanol sereh wangi dinyatakan positif mengandung alkaloid apabila membentuk endapan setidaknya dua reaksi dari golongan reaksi pengendapan yang dilakukan (Srikandi *et al.*, 2020).⁴

d. Uji Saponin

Ditimbang 0,1 gram ekstrak dan masukkan ke tabung reaksi. Ditambahkan 10 mL aquadest dan kocok selama 30 detik. Hasil positif dilihat pada terbentuknya busa setebal 1 cm dan berlangsung selama 30 detik (Saragih, 2016).

e. Uji Triterpenoid/steroid

0,1 gram ekstrak ditimbang kemudian masukkan ke *drop plate*. Ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 dan larutan H_2SO_4 pekat sebanyak 1 tetes ke dalam ekstrak. Hasil positif dilihat saat terbentuknya warna merah membuktikan adanya triterpenoid dan terbentuknya warna hijau membuktikan adanya steroid (Saragih, 2016).

f. Uji Flavonoid

Ditimbang 50 mg ekstrak dilarutkan menggunakan etanol sebanyak 5 mL dan diambil 2 mL lalu masukkan ke tabung reaksi dan tambahkan 30 mg serbuk Mg dan 2 mL HCl pekat. Perubahan warna menjadi merah pada larutan menandakan hasil yang positif (Chairina *et al.*, 2023).

5. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Dicuci beberapa alat yang digunakan seperti cawan petri, tabung reaksi, dan labu erlenmeyer lalu dikeringkan dan disemprotkan menggunakan alkohol 70%. Ditutup rapat wadah yang berlubang menggunakan kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas payung (Hamzah *et al.*, 2021). Alat-alat kaca seperti tabung reaksi dan cawan petri disterilkan dalam oven suhu 170°C selama 1 jam. Ose disterilkan menggunakan api bunsen sampai memijar dan untuk media serta alat-alat yang tidak tahan terhadap panas seperti *blue tip* disterilkan diautoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit (Wahyuni *et al.*, 2020).

b. Pembuatan Media

1) Pembuatan *Nutrient Agar* (NA) Untuk Peremajaan Bakteri

Dimasukkan 1 gram media NA ke erlenmeyer yang berisi 50 mL aquadest dan dipanaskan dengan *hot plate*, dilakukan pengadukkan menggunakan *magnetic stirrer* hingga media larut yang ditandai dengan warna media menjadi kuning bening. Sebelum dilakukan proses sterilisasi, ditutup labu erlenmeyer menggunakan kapas yang dibalut aluminium foil. Sterilisasi media dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm, setelah steril dituang media ke

tabung reaksi sebanyak 10 mL, diamkan sampai memadat pada suhu ruang pada kemiringan 30°. Media yang belum digunakan disimpan pada suhu 4°C (Uzma *et al.*, 2023).

2) Pembuatan *Mueller Hinton Agar* (MHA) Untuk Uji Aktivitas Antibakteri

Dimasukkan 1,5 gram MHA ke erlenmeyer yang berisi 150 mL aquadest. Campuran dipanaskan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga media terlarut. Sebelum dilakukan proses sterilisasi, labu erlenmeyer ditutup kapas yang dibalut *aluminium foil*. Sterilkan media menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm. Setelah steril dipindahkan media ke cawan petri sebanyak 15 mL dan ditunggu sampai memadat (Sudigdoadi, 2015). Media yang belum digunakan disimpan pada suhu 4°C (Utomo *et al.*, 2018).

c. Pembuatan Variasi Konsentrasi Larutan Uji

Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol sereh wangi dimulai dengan pembuatan larutan stok konsentrasi 100%. Ditimbang sebanyak 20 gram ekstrak etanol sereh wangi, lalu larutkan dalam 20 mL DMSO 10%. Larutan stok tersebut diencerkan untuk menghasilkan variasi konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20% menggunakan rumus $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ (Alydrus *et al.*, 2023). Perhitungan pembuatan variasi konsentrasi larutan uji dapat dilihat pada lampiran 1.

d. Pembuatan Larutan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

1) Pembuatan larutan kontrol positif (Kloramfenikol 1%)

Pembuatan larutan kloramfenikol 1% dilakukan dengan menimbang 100 mg serbuk kloramfenikol lalu larutkan dalam 10 mL DMSO 10%.

2) Pembuatan larutan kontrol negatif (DMSO 10%)

Pembuatan larutan DMSO 10% dilakukan dengan cara sebanyak 5 mL DMSO 100% diencerkan menggunakan aquadest hingga 50 mL pada labu ukur 5 mL.

g. Peremajaan Bakteri

Diambil biakan bakteri murni dengan jarum ose steril, lalu diinokulasikan ke permukaan media *Nutrient Agar* dengan goresan zig-zag secara aseptik. Ditutup lalu di sumbat kapas dan dibungkus menggunakan *aluminium foil* kemudian inkubasi diinkubator pada suhu 37°C selama 1x24 jam (Rosmania & Yuniar, 2021).

h. Pembuatan Suspensi Bakteri

Sebanyak 1-2 ose biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 hasil peremajaan bakteri diambil dan suspensikan kedalam 5 mL NaCl 0,9% sampai kekeruhan setara pada standar *Mc Farland* 0,5 (Susanti & Mufadzillah, 2021). Apabila suspensi bakteri kurang keruh ditambahkan biakan bakteri dari media *Nutrient Agar* (NA) dan apabila suspensi terlalu keruh maka diencerkan dengan larutan NaCl 0,9% steril (Jungjunan *et al.*, 2023). Kekeruhan bakteri di cek menggunakan alat Turbidimeter hingga nilai yang ditunjukkan oleh alat sudah sesuai dengan standar *Mc Farland* 0,5.

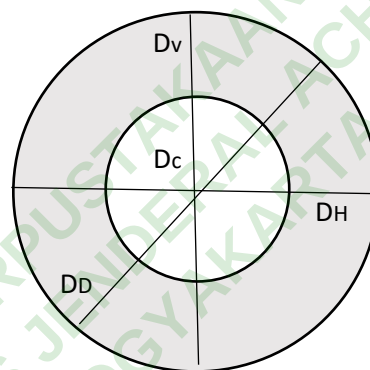
i. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Sumuran

Diinokulasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sebanyak 0,1 mL pada media MHA dan ratakan menggunakan batang L. Dibuat 4 lubang sumuran pada cawan petri sampel dan 2 lubang sumuran pada cawan petri kontrol menggunakan *cork borer* berdiameter 6 mm, sebanyak 50µl ekstrak sereh wangi konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20% dimasukkan ke lubang sumuran cawan petri sampel sedangkan DMSO 10% dan kloramfenikol 1% dimasukkan ke cawan petri sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Diinkubasi cawan petri sampel, cawan petri kontrol dan cawan petri kontrol media pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat bakteri yang

terbentuk pada cawan petri sampel dan kontrol diukur dengan jangka sorong secara horizontal, vertikal dan diagonal (Nofita, 2021).

H. Analisis Data

Diameter zona hambat diukur dengan membalikkan cawan petri. Bagian yang bening di sekitar sumuran menunjukkan seberapa kuat bakteri melawan zat antibakteri dan dinyatakan sebagai luas zona hambat. Setelah diamati diukur diameter vertikal, horizontal dan diagonal pada zona bening (*clear zone*) kemudian hasil dari pengukuran tersebut dijumlahkan dan dibagi 3. Pengukuran dinyatakan dengan satuan milimeter (mm). Hasilnya yaitu rata-rata dari ketiga pengukuran tersebut (Magvirah *et al.*, 2019).



Gambar 5. Diameter Pengukuran Zona Hambat.

Keterangan:

- = Zona hambat
- DH = Diameter horizontal
- DD = Diameter diagonal
- DV = Diameter vertikal
- DC = Diameter sumuran

Data zona hambat antar kelompok perlakuan di analisis menggunakan program SPSS. Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk uji normalitas dengan data yang jumlahnya <50. Data dianggap terdistribusi normal jika ada nilai signifikan >0,05. Variasi dari setiap kelompok diuji homogenitas. Data dianggap homogen jika ada nilai signifikan >0,05 (Daud *et al.*, 2023). Uji homogenitas menggunakan Uji *Levene Test* (Kuntari *et al.*, 2014). Uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA)

digunakan jika data terdistribusi normal dan homogen. Nilai signifikansi $<0,05$, diartikan terdapat perbedaan yang terlihat dari kelompok perlakuan. Analisis *post-hoc*, dengan uji LSD (*Least Significant Different*) dilakukan untuk mengidentifikasi kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan. Jika data tidak memenuhi syarat homogenitas dan normalitas digunakan uji *Kruskall-Wallis* (Daud *et al.*, 2023).

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA