

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental yang menganalisis pengaruh cara pengeringan daun sirih hijau (*Piper betle* L) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi sumuran. Daun sirih hijau dikeringkan dengan berbagai macam cara antara lain Oven (O) dengan suhu 40 °C, Sinar Matahari Langsung (SML) dengan menggunakan sinar matahari langsung dan Sinar Matahari Tidak Langsung (SMTL) menggunakan sinar matahari tidak langsung dengan penutup kain hitam. Daun sirih yang sudah kering akan diekstraksi dengan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) dan ekstrak yang dihasilkan akan diuji aktivitas antibakterinya dengan menggunakan metode difusi sumuran.

#### **B. Lokasi dan Waktu**

Uji determinasi dilakukan di Laboratorium Pengembangan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan. Proses ekstraksi dan uji kontrol kualitas dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi, sementara uji aktivitas antibakteri dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian ini dilakukan pada bulan April-Juni 2025.

#### **C. Populasi dan Sampel**

1. Populasi yaitu daun sirih hijau yang diambil di Perumahan Jl. KH. Agus Salim Gang Cendana No. 3, Kepek, 1, Gunung Kidul, Kecamatan Wonosari, Kabupaten Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta (55813).
2. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 9 kg daun sirih hijau berukuran sedang, dalam kondisi segar, utuh, tidak rusak, dan berwarna hijau yang diambil pada pagi hari pada pukul 08.00 WIB.
3. Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diperoleh dari Balai Labkes dan Kalibrasi Yogyakarta (Lampiran 3).

#### D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirih hijau yang dibuat dengan cara pengeringan O, SML, dan SMTL.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah aktivitas antibakteri berupa zona hambat dari pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan % rendemen.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah daun sirih hijau berukuran sedang, dalam kondisi segar, utuh, tidak rusak, dan berwarna hijau

#### E. Definisi Operasional

1. Metode pengeringan O merupakan pengeringan menggunakan oven dengan suhu 40 °C, metode SML merupakan pengeringan dibawah sinar matahari langsung, metode SMTL merupakan sinar matahari langsung dengan pengeringan yang ditutupi kain hitam.
2. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia menggunakan pelarut yang sesuai.
3. *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) adalah metode ekstraksi yang berbantu gelombang ultrasonik terjadinya efek kavitasi pada dinding sel dan membran sel tanaman yang disebabkan adanya amplitude besar yang memberikan efek pada penetrasi pelarut pada membran sel yang dapat meningkatkan laju perpindahan massa sehingga mempermudah proses ekstraksi dan mendapatkan nilai rendemen serta kadar sisa pelarut yang sesuai
4. *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah bakteri patogen Gram-Negatif berbentuk batang yang umumnya ditemukan dalam saluran pencernaan manusia yang digunakan dalam penelitian ini. Pertumbuhan bakteri ini diukur melalui zona hambat yang terbentuk pada media MHA setelah diberi perlakuan dengan ekstrak daun sirih

hijau yang diperoleh dari tiga cara pengeringan yaitu oven, sinar matahari langsung, dan sinar matahari tidak langsung.

5. Metode difusi sumuran adalah metode uji antibakteri yang dilakukan dengan membuat lubang pada media agar padat yang telah dihomogenkan dengan bakteri kemudian dinkubasi sampai terlihat zona hambat disekitar sumuran.

## F. Alat dan Bahan

### 1. Alat

- a. Ekstraksi: Ayakan ukuran 40 mesh, batang pengaduk, corong, gelas ukur 100 mL (Iwaki), *grinder*, *hot plate*, labu erlenmeyer, labu takar 10 mL (Iwaki), kaca arloji, kertas saring, kompor listrik (Maspion), spatula kayu, timbangan analitik (Ohaus), wajan.
- b. Uji skrining fitokimia: Gelas beaker 20 mL (Iwaki), gelas ukur 10 mL (Iwaki), kompor Listrik (Maspion), mikropipet 100-1000  $\mu\text{L}$  (Ohaus), rak tabung reaksi, tabung reaksi (Iwaki), timbangan analitik (Ohaus).
- c. Uji aktivitas antibakteri: Autoklaf (GEA), *Biological Safety Cabinet* (Daihan Labtech), bunsen, cawan petri (10x15 Anumbra), erlenmeyer 50 mL dan 150 mL (Iwaki), gelas beaker 100 mL (Iwaki), gelas ukur 10 mL (Iwaki), hotplate (IKA® C-MAG HS 7), inkubator (Mammert IN30), jarum ose, korek api, magnetic stirrer, oven (Mammert UN60), rak tabung reaksi, tabung reaksi (Iwaki), timbangan analitik (Ohaus), turbidimeter (BD), vortex (DLAB).

### 2. Bahan

- a. Ekstraksi: Akuades, aluminium foil, daun sirih hijau, etanol 96%, kain mori. kasa.
- b. Uji skrining fitokimia: *Blue tip*, HCL 2 N, Dragendroff, Mayer, Wagner, etanol 70% serbuk magnesium, akuades,  $\text{FeCl}_3$  1%, asam sulfat 1%.
- c. Uji aktivitas antibakteri: alkohol 70%, aluminium foil, bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, bluetip, kapas, kasa, kertas payung, larutan standar McFarland 0,5, media Mueller Hinton Agar (MHA) (Hemedia), media

Nutrient Agar (NA) (Merck), media Nutrient Broth (NB) (Merck), NaCl 0,9%, plastik wrap, spiritus, tissue.

## G. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Persiapan Sampel

#### a. Determinasi Tanaman

Dilakukan identifikasi daun sirih hijau di Laboratorium Pengembangan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan karena untuk meyakinkan bahwa sampel menggunakan daun sirih hijau (*Piper betle* L) sesuai yang diinginkan.

#### b. Pembuatan Sampel

Daun sirih hijau sebanyak 9 kg dibagi menjadi tiga bagian masing-masing 3 kg sesuai dengan cara pengeringan lalu dicuci di bawah air mengalir, kemudian dikeringkan dengan menggunakan tiga cara pengeringan yaitu pengeringan O dengan suhu 40°C dalam waktu 30 menit, SML dijemur langsung dibawah sinar matahari, dan SMTL dijemur dengan ditutupi kain hitam, hingga mencapai kondisi kering sempurna. Daun sirih hijau yang telah kering, kemudian diserbuk menggunakan *grinder*, kemudian dilakukan proses pengayakan dengan ukuran ayakan 40 mesh untuk memperoleh hasil yang sesuai. Serbuk daun sirih hijau yang diperoleh selanjutnya diekstraksi dengan metode UAE.

#### c. Pembuatan Ekstrak

Serbuk dari masing-masing cara pengeringan ditimbang sebanyak 50 gram dan ditempatkan dalam gelas erlenmeyer, kemudian 500 mL etanol 70% ditambahkan kedalam wadah yang sama untuk proses ekstraksi dengan perbandingan (1: 10) (b/v). Gelas erlenmeyer lalu ditutup dengan aluminium foil kemudian dimasukkan kedalam sonikator. Dilakukan proses selama ekstraksi 30 menit dengan suhu 40°C dan frekuensi gelombang 40 kHz, setelah itu dilakukan penyaringan untuk memisahkan larutan ekstrak dengan ampasnya. Larutan ekstrak kemudian diuapkan hingga mendapatkan

ekstrak kental (Rival et al 2014). Ekstrak yang diperoleh kemudian di hitung nilai % rendemennya dengan menggunakan persamaan (1)

$$\text{Rendemen (\% h/h)} = \frac{\text{Berat ekstrak (gram)}}{\text{Berat simplisia (gram)}} \times 100\% \dots \dots (1)$$

## 2. Kontrol Kualitas

### a. Uji Organoleptik

Ekstrak etanol daun sirih hijau yang telah diperoleh diuji secara organoleptik dengan mengamati warna, bentuk, rasa, dan bau.

### b. Skrining Fitokimia

#### 1) Identifikasi Alkaloid

Ditimbang 0,5 g ekstrak daun sirih hijau dari masing-masing cara pengeringan, lalu ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air, dipanaskan selama dua menit. Setelah itu, biarkan dingin dan saring filtrat yang diperoleh kemudian dibagi menjadi tiga tabung reaksi untuk pengujian alkaloid. Pada tabung pertama tambahkan 2 tetes pereaksi Mayer. Positif mengandung alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau kuning. Pada tabung yang kedua ditambahkan dua tetes larutan pereaksi Wagner jika hasil positif terbentuk endapan coklat, pada tabung yang ketiga tambahkan dua tetes preaksi Dragendroff jika hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna merah atau jingga (Purba et al., 2024)

#### 2) Identifikasi Flavonoid

Ditimbang 0,5 g ekstrak daun sirih hijau dari masing-masing cara pengeringan kemudian dilarutkan kedalam air dan dipanaskan selama dua menit. Setelah itu, ditambahkan sebanyak 0,2gram serbuk magnesium (Mg) dan tiga tetes asam klorida (HCL) pekat. Uji positif mengandung flavonoid jika terbentuk warna kuning, jingga, atau merah (Purba et al., 2024)

#### 3) Identifikasi Saponin

Ditimbang 0,5 g ekstrak daun sirih hijau dari masing-masing cara pengeringan kemudian dimasukan kedalam tabung reaksi ditambahkan

10mL aquades panas didiamkan lalu dikocok kuat selama 10 detik jika hasil positif mengandung saponin maka terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit menunjukkan positif adanya saponin (Purba et al., 2024)

#### 4) Identifikasi Tanin

Ditimbang sebanyak 0,5 g ekstrak daun sirih hijau dari masing-masing cara pengeringan kemudian dimasukan kedalam tabung reaksi dilarutkan dengan 10 mL aquades ditambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$  1% (3 tetes) dinyatakan positif tanin jika terbentuk warna kehijauan dan biru kehitaman (Purba et al., 2024)

### 3. Uji Aktivitas Antibakteri

#### a. Sterilisasi Alat

Sebelum menggunakan cawan petri, tabung reaksi, *beaker glass*, dan batang L, dibersihkan alat dibawah air yang mengalir dan ditunggu sampai kering. Sebelum cawan petri, tabung reaksi, beaker glass, dan batang L dibungkus dengan kertas payung semprotkan alkohol 96% kemudian ditunggu sampai kering pada semua alat untuk meminimalisir keberadaan bakteri lain, kemudian alat disterilkan kedalam oven pada suhu  $171^\circ\text{C}$  selama 1 jam. Pinset, skalpel disterilkan dengan dipijarkan pada api Bunsen (Wulandari et al., 2021).

#### b. Sterilisasi Bahan

Bahan yang harus disterilisasikan antara lain *blue tip*, NaCl 0,9%, media peremajaan bakteri dan media uji, serta akuades. Sterilisasi dilakukan dengan metode sterilisasi panas basah yaitu autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit (Sunan et al., 2021)

#### c. Pembuatan Media

Pembuatan media dilakukan sebanyak dua kali yaitu pada Nutrient Agar sebagai peremajaan bakteri dan Mueller-Hinton Agar untuk uji aktivitas antibakteri.

1). Media Nutrient Agar (NA)

Peremajaan ini dilakukan agar bakteri dapat aktif dan tumbuh secara optimal. Sebanyak 0,6 gram Nutrient Agar (NA) merk dilarutkan dalam 30 mL akuades didalam erlenmeyer kemudian larutan tersebut dipanaskan diatas *Hot plate* dengan bantuan *magnetic stirrer* hingga homogen kemudian dituangkan kedalam enam tabung reaksi yang steril masing-masing berisi 5 mL. Lubang tabung reaksi ditutup menggunakan kain kasa atau kapas, lalu dibungkus dengan aluminium foil, selanjutnya media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C 1 atm selama 15 menit. Selanjutnya media didiamkan pada suhu ruangan sampai media memadat dengan kemiringan 30° (Wahyuni, Kaswi, et al., 2024).

2). Mueller-Hinton Agar (MHA)

Sebelum melakukan uji aktivitas antibakteri langkah yang pertama yakni menimbang 9,5gram Mueller-Hinton Agar dan dilarutkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 250 mL akuades selanjutnya panaskan di atas hot plate sampai mendidih kemudian aduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut homogen, kemudian ditutup lubang erlenmeyer dengan kapas dan aluminium foil, disterilisasi dengan suhu 121°C menggunakan autoklaf. Media tersebut kemudian dimasukkan kedalam cawan petri ± 20 mL dan biarkan hingga memadat.

d. Peremajaan Bakteri

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu biakan murni bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Proses peremajaan bakteri dilaksanakan dengan langkah awal yaitu mengambil satu ose inokulum dari bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Inoculum ini kemudian digoreskan secara merata di permukaan media agar miring secara aseptis. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C dan dibiarkan selama 24 jam

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Sebanyak 3 mL larutan NaCl 0,9% steril dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril. Selanjutnya, diambil satu mata ose koloni bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9%, kemudian divortex hingga homogenkan. Selanjutnya, kekeruhan suspensi bakteri diukur menggunakan turbidimeter yang telah diverifikasi dengan larutan standar. Hasil kekeruhan suspensi bakteri yang sesuai dengan standar kekeruhan *McFarland* 0,5 ditunjukkan melalui angka yang muncul pada alat turbidimeter.

f. Pembuatan Seri Konsentrasi Ekstrak Uji

Ditimbang 20 gram ekstrak daun sirih hijau dilarutkan dalam 20 mL akuades untuk memperoleh konsentrasi 100%. Selanjutnya, dilakukan pembuatan seri konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30% dalam 5 mL akuades. Sebagai kontrol positif, digunakan antibiotik klindamisin, sedangkan kontrol negatif menggunakan akuades.

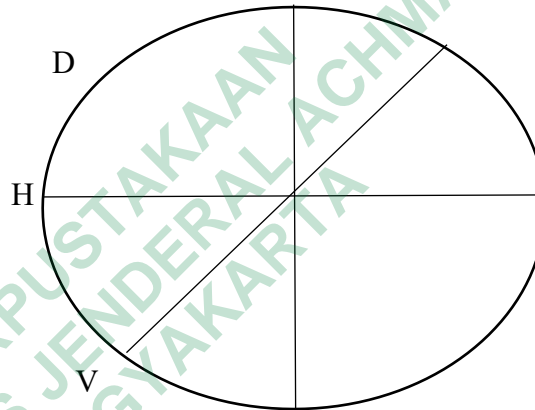
g. Pembuatan Suspensi Kontrol Positif

Kontrol positif menggunakan klindamisin (150 mg) dengan konsentrasi 1 %, dilarutkan 300 mg serbuk klindamisin dalam akuades steril 100 mL, sehingga didapatkan konsentrasi klindamisin 100%. Perhitungan konsentrasi dapat dilihat pada lampiran 4 (Athailah & Lestari, 2020).

h. Pengujian Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Hijau

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan cara bakteri uji diinokulasi pada media padat *Mueller Hinton Agar* sebanyak 0,1 mL dengan menggunakan mikropipet 20-200  $\mu$ L. Suspensi kemudian diratakan dengan batang L secara menyeluruh pada permukaan media dan dibiarkan hingga mengering selama  $\pm 5$  menit. Lakukan pembuatan lubang sumuran pada media dengan *cork bore* berukuran 6 mm. Dibuat sebanyak 4 lubang sumuran pada tiap media uji, kemudian masukkan masing-masing 50  $\mu$ L konsentrasi uji (10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%)

pada lubang sumuran. Larutan klindamisi sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif masing-masing ditambahkan ke cawan petri kontrol sebanyak 50  $\mu\text{L}$  dengan menggunakan mikropipet. Setiap perlakuan dilakukan dalam tiga ulangan. Setelah itu, cawan uji serta cawan kontrol diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Dilakukan pengamatan pada hasil inkubasi untuk mendeteksi zona hambat di sekitar sumuran. Diameter zona hambat diukur dalam arah vertikal, diagonal, dan horizontal menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat yang dihitung dapat dilihat pada gambar 3.



**Gambar 4. Luas Zona Hambat**

Keterangan:

- D : Diagonal
- V : Vertikal
- H : Horizontal

**Tabel 2. Klasifikasi Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri**

<b>Luas Zona Hambat</b>	<b>Zona Hambat Petumbuhan</b>
Zona Hambat > 20 mm	Daya Hambat Sangat Kuat
Zona Hambat 10-20 mm	Daya Hambat Kuat
Zona Hambat 5-10 mm	Daya Hambat Sedang
Zona Hambat 0-5 mm	Daya Hambat Lemah

Sumber: (Bryan et al., 2024)

### H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Data zona hambat yang diperoleh dari metode difusi sumuran akan dihitung diameter dari 3 sisi yaitu diagonal, vertikal, dan horizontal sisi diameter yang dihitung dapat dilihat pada gambar 3 dan hasil yang yang didapatkan akan dihitung berdasarkan persamaan 2.

$$D \text{ Rata-rata} = \frac{D_1 + D_2 + D_3}{3} \dots \dots \dots (2)$$

Data zona hambat yang dianalisis berdasarkan statistik yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan signifikan antar tiap kelompok data. Data berupa diameter zona hambat yang diperoleh terlebih dahulu diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk menentukan apakah data berkontribusi dengan normal. Jika data berkontribusi dengan normal, maka analisis dilanjutkan dengan uji ANOVA satu arah (*One-Way ANOVA*) untuk melihat apakah terdapat perbedaan signifikan antara ketiga sampel. Namun, jika data tidak berdistribusi normal, maka digunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* sebagai alternatif. Jika hasil ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ), maka dilakukan uji lanjut *post-hoc Tukey* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan nyata.