

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan eksperimental untuk menganalisis pengaruh cara pengeringan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATTC 25922 dengan metode difusi cakram. Ekstrak daun sirih hijau dikeringkan dengan berbagai metode antara lain metode oven (O) dengan suhu 40°C, sinar matahari langsung (SML) dijemur langsung dibawah matahari, sinar matahari tidak langsung (SMTL) dijemur dengan ditutupi kain hitam. Kemudian akan diserbuk dan diekstrasikan menggunakan metode UAE lalu diuji efektivitas antibakterinya.

B. Lokasi dan Waktu

Uji determinasi dilakukan di Laboratorium Pengembangan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan, pengeringan Oven dilakukan di Laboratorium Penelitian Terpadu Universitas Gadjah Mada dan uji organoleptik, skrining fitokimia, dan uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi, Prodi Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta dan waktu pelaksanaannya pada bulan April- Mei 2025

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi yaitu daun sirih hijau yang diperoleh dari perumahan Jl. Kh. Agus Salim Gang Cendana no 3, Kepek, 1, Gunung Kidul, Kecamatan Wonosari, Kabupaten Gunung Kidul Yogyakarta.
2. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah 9 kg daun sirih hijau berukuran sedang, dalam kondisi segar, utuh, tidak rusak dan berwarna hijau tua yang diambil pada pukul 8 pagi.
3. Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diperoleh dari koleksi Balai Labkes dan Kalibrasi Dinas Kesehatan DIY.

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 terikatnya adalah pertumbuhan *Escherichia coli* ATTC 25922 yang diukur berdasarkan diameter zona hambat abakteri yang terbentuk pada metode difusi cakram.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah waktu pengeringan ekstrak waktu panen, dan kriteria daun sirih hijau yang berupa daun sirih hijau berukuran sedang dalam kondisi segar, utuh tidak rusak, dan berwarna hijau.

E. Definisi Operasional

1. Cara pengeringan O merupakan pengeringan menggunakan Oven dengan suhu 40°C, SML merupakan pengeringan di bawah sinar matahari langsung, SMTL merupakan pengeringan di bawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam.

2. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia menggunakan pelarut yang sesuai.

3. *Escherichia coli* termasuk dalam kelompok bakteri gram-negatif dan merupakan bagian dari flora dalam tubuh manusia. Namun pada kondisi tertentu, bakteri ini dapat bersifat patogen.

4. *Ultrasound-assisted extraction* (UAE)

Metode UAE adalah metode ekstraksi yang lebih ramah lingkungan (*green extraction*) dengan memanfaatkan energi gelombang ultrasonik. Kelebihan metode UAE dibandingkan dengan metode lainnya adalah hasil ekstrak lebih pekat, zat aktif lebih banyak, dan waktu yang digunakan lebih singkat karena proses kerja alat ini adalah dengan bantuan gelombang ultrasonik yang mampu meningkatkan pemecahan dinding sel, pada fase cair di bawah titik didihnya mampu menimbulkan gelembung spontan dan meningkatkan permeabilitas dinding sel.

5. Metode cakram merupakan salah satu teknik yang banyak digunakan dalam pengujian aktivitas antimikroba terhadap ekstrak tanaman, minyak atsiri. Prinsip kerja ini didasarkan pada difusi senyawa antibakteri kedalam media padat yang telah diinokulasi dengan mikroba uji uji menggunakan kertas cakram.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Alat yang digunakan untuk persiapan sampel yaitu ayakan 40 mesh, sonikator, Erlenmeyer, ginder, timbangan analitik, *beaker glass*, termometer, tampah, kain hitam.
 - b. Alat uji organoleptik dan uji fitokimia yaitu tabung reaksi, rak Tabungan, timbangan analitik, *beaker glass* 250 mL, labu ukur 10mL, kertas saring, *hot plate (IKAHS-7)*, labu erlenmeyer 250 m, *droplate*, pipet tetes.
 - c. Alat untuk uji aktivitas antibakteri yaitu autoklaf (*Gea LS-50L*), *Biological Safety Cabinet (Daihan Labtech)*, Beker Gelas 250 mL, Batang L, Cawan, *Hot Plate*, Inkubator, Jarum Ose, Jangka Sorong, Lemari Pendingin, Labu Erlenmeyer, Mikropipet 100- 1000 μ l, *Blue Tip*, *Magnetic Stirrer*, Oven, Pembakar Bunsen, Pinset, Tabung Reaksi, Batang Pengaduk.
2. Bahan
 - a. Bahan yang digunakan pada saat determinasi yaitu tanaman daun sirih hijau. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi yaitu serbuk simplisia, etanol 70% dan kain mori.
 - b. Bahan yang digunakan untuk uji fitokimia yaitu ekstrak daun sirih hijau, HCL 2 N, dragendroff, mayer, wagner, etanol 70 %, serbuk Mg, aquades, FeCl₃ 1%.
 - c. Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu ekstrak daun sirih hijau, bakteri *Escherichia coli* ATTC 25922, nutrient agar (merck), aquades , aluminium, foil, kassa, asam sulfur 1%, barium klorida 1%, NaCl 0,9 %, media muller hinton agar (merck), gentamisin 10 μ g/disk.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan Sampel ,

d. Determinasi Tanaman

Uji determinasi dilakukan di Laboratorium pengembangan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan. Uji ini bertujuan untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan merupakan daun sirih hijau (*Piper betle* L.).

e. Pembuatan Sampel

Daun sirih hijau ditimbang sebanyak 3 kg untuk setiap cara pengeringan total daun sirih yang ditimbang yaitu 9 kg. kemudian cuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, selanjutnya daun sirih dikeringkan menggunakan 3 cara pengeringan yaitu O dengan suhu 40°C, 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* hingga menjadi serbuk, kemudian dilakukan proses pengayakan dengan ayakan 40 mesh untuk memperoleh hasil yang sesuai.

f. Pembuatan Ekstrak.

Serbuk dari tiap cara pengeringan ditimbang masing-masing sebanyak 50 gram kemudian dimasukkan dalam Erlenmeyer. Tambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 500 mL kedalam Erlenmeyer untuk diekstrasikan dengan perbandingan (1:10) (b/v) lalu ditutup dengan aluminium foil, kemudian dimasukkan ke dalam sonikator. Dilakukan ekstraksi selama 30 menit dengan suhu 40°C, frekuensi gelombang yang digunakan adalah 40 kHz setelah itu dilakukan penyaringan untuk memisahkan filtrat dari ampasnya. Filtrat kemudian diuapkan menggunakan waterbath hingga mendapatkan ekstrak kental (Fitri et al., 2021). Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dihitung % rendemen menggunakan persamaan 1.

$$\% \text{ Rendemen } (\%b/b) = \frac{\text{berat ekstrak (gram)}}{\text{berat simplisia (gram)}} \times 100 \% \dots\dots \text{ (Persamaan 1)}$$

2. Kontrol Kualitas Ekstrak

a. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan pengamatan secara visual antara lain warna, tekstur, serta bau sediaan.

b. Skrining Fitokimia

1) Identifikasi Alkaloid

Masing – masing sampel ekstrak etanol daun sirih ditimbang sebanyak 0,5 g lalu ditambahkan 1 mL HCl dan 9 mL air kemudian panaskan selama dua menit, lalu didinginkan dan disaring. Larutan yang diperoleh selanjutnya dibagi kedalam tiga tabung reaksi untuk proses analisis lebih lanjut reaksi untuk pengujian alkaloid. Pada tabung pertama, tambahkan dua tetes pereaksi Mayer. Positif mengandung alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning. Pada tabung 2, ditambahkan 2 tetes pereaksi Wagner, hasil positif terbentuk endapan coklat. Pada tabung ketiga, tambahkan dua tetes larutan pereaksi Dragendroff. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna merah atau orange (Maharani *et al.*, 2025)

2) Identifikasi Flavonoid

Masing – masing sampel ekstrak etanol daun sirih ditimbang sebanyak 0,5 g, kemudian dilarutkan dalam air dan dipanaskan selama dua menit. Tambahkan sebanyak 0,2 gram serbuk magnesium (Mg) dan 3 tetes asam klorida (HCl) pekat. Uji positif mengandung flavonoid jika terbentuk warna kuning, jingga, atau merah (Maharani *et al.*, 2025)

3) Identifikasi Saponin

Masing – masing sampel ekstrak etanol daun sirih ditimbang sebanyak 0,5 g, kemudian masukan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL akuades panas, didiamkan lalu dikocok kuat selama 10 detik. Positif mengandung saponin jika terbentuk busa

setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit menunjukan positif adanya saponin (Maharani *et al.* 2025)

4) Identifikasi Tanin

Masing – masing sampel ekstrak etanol daun sirih ditimbang Sebanyak 0,5 g, lalu masukan kedalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan kedalam 10 mL akuades. Selanjutnya, ditambahkan tiga tetes larutan FeCl_3 1%. Reaksi dinyatakan positif mengandung tanin apabila terbentuk warna kehijauan dan biru kehitaman. (Setyowati *et al.*, 2014).

3. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Alat yang harus disterilkan yaitu *beaker glass*, cawan petri, tabung reaksi dan erlenmeyer yang telah dicuci bersih dan disemprot alkohol 70% kemudian dibungkus menggunakan kertas payung terlebih dahulu, disterilkan dengan menggunakan oven bersuhu 171°C selama 1 jam. Untuk alat tabung reaksi dan erlenmeyer menggunakan kapas dan kasa agar terhindar dari kontaminasi setelah dikeluarkan dari oven dan untuk alat logam seperti ponset, jarum ose disterilkan menggunakan bunsen dengan cara dipijarkan sesaat sebelum digunakan (Astriani *et al.*, 2021)

b. Sterilisasi Bahan

Bahan yang harus disterilkan antara lain *blue tip*, NaCl 0,9%, media peremajaan bakteri, media uji dan akuades . Proses Sterilisasi dilakukan dengan metode sterilisasi panas basah yaitu dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit (Astriani *et al.*, 2021)

c. Pembuatan Media

Pembuatan media dibuat dalam dua tahap, yaitu pertama menggunakan Nutrient Agar untuk peremajaan bakteri dan kedua Muller- Hinton Agar untuk pengujian aktivitas antibakteri.

1) Media Nutrient Agar (NA)

Media NA sebanyak 0,6 g yang dilarutkan dengan aquades 30 mL dalam erlenmeyer, kemudian aduk sampai homogen menggunakan *magnetic stirrer*. Media NA kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, dan didiamkan sampai cukup dingin. Media NA sebanyak 5 mL yang telah disterilkan sebelumnya dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian disumbat dengan kapas steril dan dimiringkan sekitar 45°C. Didiamkan hingga memadat pada suhu ruangan. Media agar miring digunakan sebagai peremajaan bakteri. (Fitriani *et al.*, 2021).

2) Muller-Hinton Agar (MHA)

Sejumlah 12,5 gram serbuk MHA ditimbang, kemudian campurkan dalam aquades sampai 250 mL dan aduk sampai homogen. Larutan Media MHA yang telah merata selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi, media dibiarkan hingga dingin. Media MHA yang masih cair kemudian dituangkan ke dalam cawan petri dibiarkan hingga mengalami pememadatan (Astriani *et al.*, 2021).

d. Peremajaan Baketri

Proses peremajaan bakteri dilakukan didalam BSC. Jarum ose terlebih dahulu dibakar dengan api bunsen, kemudian digunakan mengambil satu ose bakteri *Escherichia coli* ATTC 25922 dan digoreksan pada media agar miring dengan teknik aseptis. Setelah itu, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Sebanyak 3 mL larutan NaCl 0,9% steril dimasukkan ke tabung reaksi steril. Satu ose bakteri *Escherichia coli* ATTC 25922 diambil lalu dimasukkan ke tabung tersebut, kemudian diaduk hingga

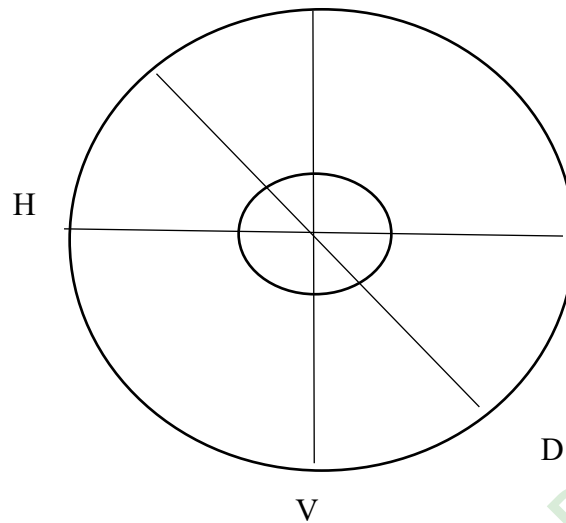
homogen. Kekeruhan suspensi bakteri yang dihasilkan disesuaikan dengan standar *Mc Farland 0,5* menggunakan turbidimeter (Purnamasari, 2013).

f. Pembuatan Seri Konsentrasi Ekstrak Uji

Ditimbang sebanyak 20 gram ekstrak daun sirih hijau, kemudian dilarutkan dalam 20 mL akuades untuk memperoleh konsentrasi 100%. Selanjutnya, dibuat larutan dengan konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30% dalam 5 mL akuades Gentamisin 10 µg/disk digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan kertas cakram kosong digunakan sebagai kontrol negatif.

g. Pengujian Antibakteri Daun Sirih Hijau

Pada penelitian ini, uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Sebanyak 0,1 mL bakteri *Escherichia coli* ATTC 25922 dimasukkan ke dalam media Mueller-Hinton Agar. Selanjutnya, bakteri dioleskan secara merata pada permukaan media menggunakan cotton swab steril. Kemudian, kertas cakram direndam ke dalam larutan sampel selama 5 menit agar menyerap senyawa dari ekstrak hingga seluruh permukaan kertas cakram basah merata. Untuk kontrol negatif menggunakan kertas cakram kosong diletakkan langsung di permukaan media yang telah tanam bakteri. Sementara itu, gentamisin 10 µg digunakan sebagai kontrol positif, karena antibiotik ini memiliki aktivitas terhadap berbagai infeksi bakteri gram positif dan gram negatif. Setiap cakram dipindahkan ke media yang sudah ditanami bakteri dan diinkubasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi diamati zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram diamati menggunakan jangka sorong. Pengukuran zona hambat dilakukan dalam tiga arah, yaitu horizontal, vertikal, dan diagonal yang dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Diameter zona hambat

Keterangan :

D : Diagonal

V : Vertikal

H : Horizontal

H. Metode Pengolahan Dan Analisis Data

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

$$\text{Rumus : D rata-rata} = \frac{D1+D2+D3}{3} \dots\dots\dots (\text{Persamaan 2})$$

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 berdistribusi normal. Jika data berdistribusi 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.