

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel daun sirih hijau dan merupakan jenis penelitian eksperimental. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh durasi rebusan daun sirih hijau terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penentuan identifikasi tanaman dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Pengujian antibakteri dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi, Prodi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan Januari - Maret 2024.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Lokasi Populasi: diperoleh di perkebunan jalan Imogiri Timur Km 7,5, Grojogan, Wirokerten, Kecamatan Banguntapan, Kabupaten Bantul Yogyakarta.
2. Sampel: daun sirih hijau yang masih segar berwarna hijau tua dan diambil secara *random*.
3. Sampel bakteri: diperoleh dari RS AMC Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas
Durasi rebusan dan konsentrasi air rebusan daun sirih hijau.
2. Variabel Terikat
Diameter zona hambat pada bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

3. Variabel Terkendali
 - a. Waktu inkubasi media uji.
 - b. Karakteristik daun sirih hijau yang digunakan.
 - c. Suhu rebusan daun sirih hijau

E. Definisi Operasional Penelitian

1. Rebusan daun sirih hijau yaitu daun sirih direbus selama (10, 20, 30 dan 40) menit pada konsentrasi 25% dan 50%.
2. Zona hambat ialah area di sekitar kertas cakram yang tidak ditumbuhi bakteri. Diameter zona hambat diukur dari sisi horizontal, diagonal, dan vertikal menggunakan jangka sorong.
3. Waktu inkubasi media uji yaitu waktu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri pada media dengan suhu 37°C selama 24 jam.
4. Karakteristik sampel yang digunakan ialah daun sirih hijau yang masih segar berwarna hijau tua dan diambil secara *random*.
5. Suhu rebusan daun sirih hijau yaitu 90°C pada setiap variasi waktu.

F. Alat dan Bahan Penelitian

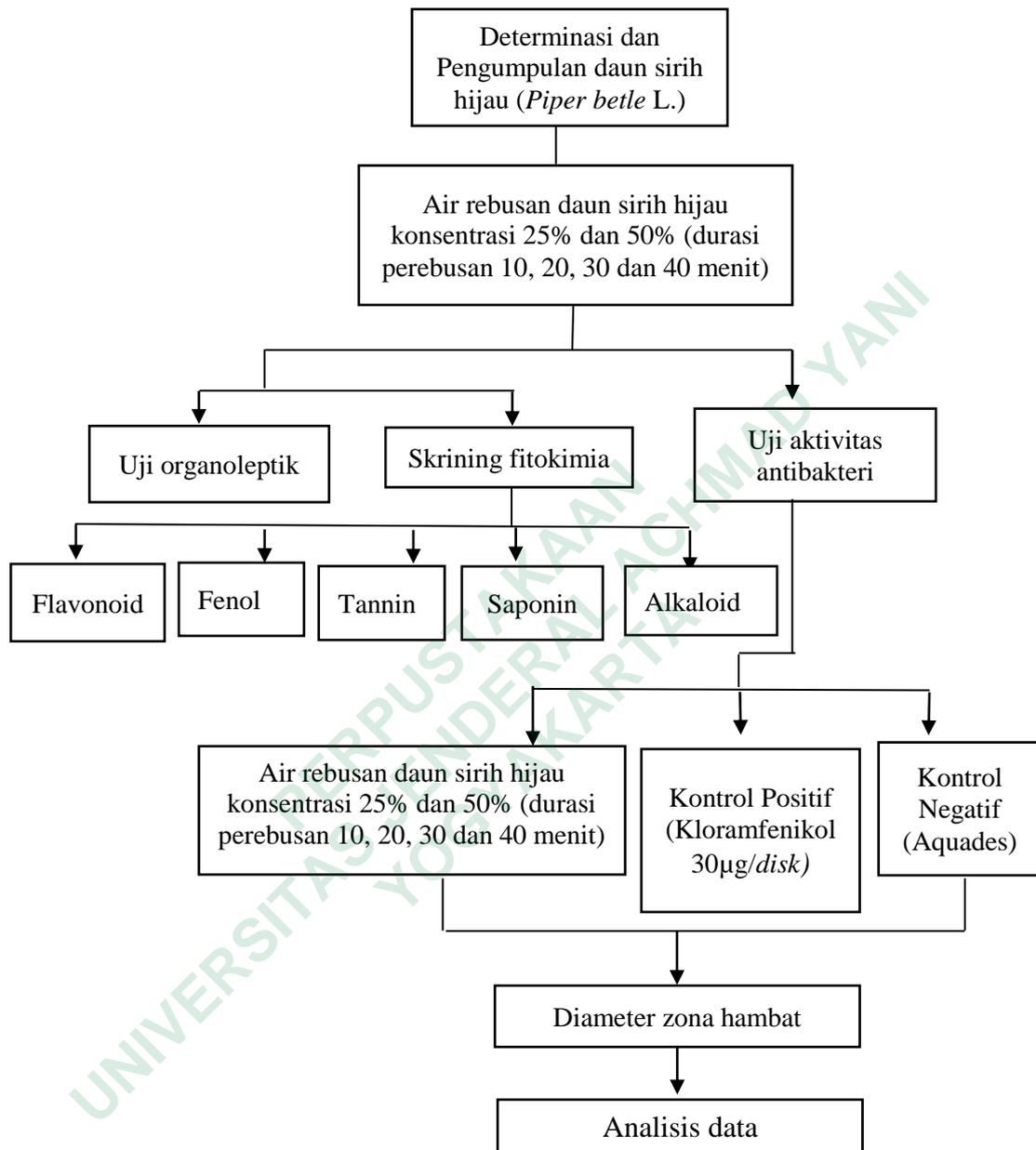
1. Alat
 - a. Peralatan dalam membuat air rebusan daun sirih hijau: batang pengaduk, botol sampel dan tutup, corong (Herma), gelas beaker (Iwaki), kertas saring, kompor (Maspion S-301), *stopwatch*, *thermometer*, panci infusa dan timbangan analitik (Ohaus SW version 10S).
 - b. Peralatan yang digunakan untuk uji antibakteri: autoklaf (Gea), batang L, bunsen, cawan petri (Normax), Erlenmeyer (Iwaki), *hot plate*, inkubator (Memmert IN30), jangka sorong, kapas, kertas payung, label, mikropipet 100–1000 µg (Across), *magnetic stirrer*, oven (Memmert IN60), ose, pinset, rak tabung, spektrofotometri (Genesis 10S UV-VIS), spidol, tabung reaksi (Iwaki), dan vortex.
 - c. Alat yang digunakan pada uji skrining fitokimia: gelas beaker (Iwaki), pipet ukur, rak tabung dan tabung reaksi (Iwaki).

2. Bahan

- a. Bahan untuk membuat air rebusan daun sirih hijau: akuades dan daun sirih hijau.
- b. Bahan yang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri: air rebusan daun sirih hijau pada durasi rebusan (10, 20, 30 dan 40 menit) (konsentrasi 25% dan 50%), aquades, alkohol, BaCl₂, biakan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *blank disk*, *blue tip*, H₂SO₄, media NA (Darmstadt), MHA (OXOID), NaCl 0,9 % dan *paper disk* kloramfenikol 30μg/*disk*.
- c. Bahan-bahhan yang dipakai dalam pengujian skrining fitokimia: air rebusan daun sirih hijau, FeCl₃, HCl pekat (Mallinckrodt), Mg, pereaksi Dragendorf, Mayer dan Wagner.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA

G. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 3. Pelaksanaan Penelitian

Adapun tahap pelaksanaan dalam penelitian ini yaitu:

1. Determinasi Tanaman

Penentuan identitas tanaman dilakukan untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan adalah daun sirih hijau, dengan tujuan mencegah kesalahan dalam pengumpulan bahan penelitian.

2. Pengumpulan Tanaman

Sampel penelitian yang akan digunakan yaitu daun sirih hijau dengan warna hijau tua dan diambil secara *random* di perkebunan jalan Imogiri Timur Km 7,5, Grojogan, Wirokerten, Kecamatan Banguntapan, Kabupaten Bantul Yogyakarta.

3. Pembuatan Rebusan dan Seri Konsentrasi

Rangkaian seri konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini, mengacu pada studi yang dilakukan Rahayu *et al.*, (2017) dengan dilakukan modifikasi. Konsentrasi yang diujikan yaitu 25% dan 50%. Pembuatan rebusan daun sirih hijau dilakukan dengan menimbang sebanyak 25 dan 50 gram daun sirih hijau, daun sirih hijau dibersihkan menggunakan air mengalir, ditiriskan dan dpotong menjadi potongan kecil. Daun sirih hijau dimasukkan kedalam panci infusa dan ditambahkan aquades sebanyak 100 mL. Waktu mulai dihitung pada saat air dalam panci infusa mencapai 90°C. Setelah 10 menit, pemanasan dihentikan dan air rebusan dibiarkan dingin. Dilakukan penyaringan dengan kertas saring dan corong untuk memisahkan daun dengan air rebusan. Diukur air rebusan yang didapatkan, dengan demikian maka didapatkan konsentrasi air rebusan sebesar 25% dan 50% dengan durasi rebusan 10 menit. Hal yang serupa juga dilakukan untuk konsentrasi 25% dan 50% dengan durasi rebusan 20, 30 dan 40 menit.

4. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan pada rebusan daun sirih hijau dengan cara melakukan pengamatan pada air rebusan daun sirih hijau terhadap rasa, bau, bentuk dan warna.

5. Skrining Fitokimia

a. Uji Flavonoid

Masukkan 1 mL air rebusan dan serbuk magnesium (0,1 gram) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok hingga tercampur secara homogen. Setelah itu, HCl pekat (1 tetes) ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Jika timbul warna jingga sampai merah maka menunjukkan positif mengandung flavonoid (Yohanes *et al.*, 2018).

b. Uji Saponin

Masukkan 2 mL air rebusan daun sirih hijau dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan aquades, gojok campuran dengan kuat selama sekitar 10 detik, kemudian diamkan selama 10 menit. Hasil uji dinyatakan kandungan saponin positif ditunjukkan oleh terbentuknya busa hingga bertahan selama 10 menit (Yohanes *et al.*, 2018).

c. Uji Alkaloid

1) Sebanyak 3 mL air rebusan sirih hijau ditambahkan HCl pekat (3 mL) dalam tabung reaksi dan reagen Wagner (3 tetes). Hasil positif mengandung alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan merah kecoklatan (Simaremare & Susanty, 2014).

2) Sebanyak 3 mL air rebusan sirih hijau dalam tabung reaksi ditambahkan HCl pekat (3 mL) dan reagen Dragendorf (3 tetes). Hasil positif mengandung alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan coklat jingga (Simaremare & Susanty, 2014).

3) Sebanyak 3 mL air rebusan, ditambahkan HCl pekat (3 mL) dalam tabung reaksi dan reagen Mayer (3 tetes). Hasil positif mengandung alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada tabung reaksi (Simaremare & Susanty, 2014).

d. Uji Fenol

Sebanyak 1 mL air rebusan daun sirih hijau, lalu di tambahkan pereaksi FeCl_3 1% (2 tetes) kedalam tabung reaksi. Hasil uji positif mengandung fenol ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna

larutan dari hijau kecoklatan menjadi ungu atau biru gelap kehitaman (Yohanes *et al.*, 2018).

e. Tanin

Dimasukkan air rebusan daun sirih hijau sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, lalu 3 tetes FeCl_3 . Hasil positif mengandung tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua (Yohanes *et al.*, 2018).

6. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Peralatan gelas yang akan digunakan dicuci dengan air mengalir sampai bersih hingga tidak ada kotoran, kemudian keringkan. Semprot alat dengan alkohol 70% sebelum dibungkus menggunakan kertas payung. Pada mulut tabung reaksi ditutup terlebih dahulu menggunakan kapas. Peralatan gelas tersebut disterilkan pada suhu 170°C dalam oven selama 1 jam (Toy *et al.*, 2015). Untuk peralatan yang tidak tahan pemanasan dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.

b. Sterilisasi Bahan

NaCl 0,9%, aquades, media NA, *blue tip*, botol sampel, tutup botol sampel dan media MHA disterilisasi dengan metode panas basah dengan tekanan 1 atm dengan suhu 121°C menggunakan autoklaf selama 15 menit (Hamzah *et al.*, 2021).

c. Pembuatan Media *Nutrient Agar* Untuk Peremajaan Bakteri

Timbang dan larutkan 1,4 gram media NA dalam 70 mL aquades didalam erlenmeyer. Panaskan menggunakan *hot plate* dengan *magnetic stirrer* untuk membantu melarutkan media. Sebelum disterilisasi, tutup mulut erlenmeyer dengan kapas dan bungkus menggunakan aluminium foil. Sterilisasi dengan tekanan 1 atm dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media NA yang sudah disterilisasi dibiarkan beberapa menit hingga suhu sekitar $40\text{-}50^\circ\text{C}$, selanjutnya dimasukkan ke dalam 6 tabung reaksi dengan volume media pada masing-masing tabung (10 mL). Tabung yang berisi media lalu ditutup menggunakan kapas pada

bagian mulut tabung dan dimiringkan 30-45° hingga mengeras. Media yang belum digunakan disimpan pada suhu 4°C didalam lemari es (Nurdiansyah, 2018).

d. Pembuatan *Media Mueller Hinton Agar*

Timbang dan larutkan 12,58 gram media MHA dalam 370 mL aquades didalam erlenmeyer. Media tersebut selanjutnya dipanaskan menggunakan *hot plate* dengan *magnetic stirrer* hingga larut sempurna. Mulut erlenmeyer ditutup dengan kapas, di bungkus aluminium foil, lalu sterilkan selama 15 dengan tekanan 1 atm menit menggunakan autoklaf pada suhu 121°C. Media yang sudah steril dituang (\pm 20 mL) kedalam cawan petri dibiarkan hingga memadat. Simpan media yang belum digunakan didalam lemari es pada suhu 4°C (Nurdiansyah, 2018).

e. Pembuatan Larutan *Mc Farland 0,5*

Tambahkan 0,05 mL BaCl₂ (1%) dan 9,95 mL larutan H₂SO₄ (1%) ke dalam tabung reaksi, lalu kocok hingga tercampur secara homogen. Ukur absorbansi campuran dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm (Taufiqurrahman & Pijaryani, 2023). Hal tersebut dilakukan guna memastikan bahwa larutan standar *Mc Farland* mempunyai nilai absorbansi (0,08-0,1). Apabila nilai hasil pengukuran tidak memenuhi persyaratan, maka dilakukan pengenceran atau mengulangi pembuatan hingga memenuhi persyaratan/setara dengan nilai larutan *Mc Farland 0,5* (Anonim, 2014). Larutan standar *Mc Farland 0,5* disimpan di lemari es (Aviany & Pujiyanto, 2020).

f. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan memindahkan satu atau dua ose bakteri uji dari biakan murni menggunakan jarum ose steril ke media peremajaan. Media yang sudah digoreskan bakteri diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil peremajaan bakteri dapat disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C sebagai stok (Hamzah *et al.*, 2021).

g. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Streptococcus mutans* 25175 hasil peremajaan diambil sebanyak satu atau dua ose, lalu diencerkan dengan menggunakan Natrium klorida 0,9% steril sebanyak 5 mL dan divortex. Setarakan kekeruhan standar *Mc Farland* 0,5 dengan suspensi bakteri. Jika kekeruhan belum setara, maka lakukan pengenceran atau penambahan koloni bakteri sesuai kebutuhan hingga didapatkan kekeruhan yang setara dengan standar *Mc Farland* 0,5 (Nurhayati *et al.*, 2020). Suspensi bakteri yang memiliki kekeruhan yang setara dengan *Mc Farland* 0,5 yang dapat digunakan untuk pengujian.

h. Pengujian Aktivitas Antibakteri Air Rebusan Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.)

Pengujian antibakteri dilakukan di dalam BSC dengan cara menginokulasikan sebanyak 0,1 mL atau 100 μ L suspensi bakteri ke permukaan media MHA dan diratakan dengan menggunakan *cotton swab steril*. Disiapkan *blank disk* dengan ukuran diameter 6 mm, selanjutnya *blank disk* direndam selama 10 menit pada air rebusan daun sirih hijau konsentrasi 25% dan 50% (durasi rebusan 10, 20, 30, dan 40 menit). Pada pengujian ini digunakan kontrol negatif aquades steril dan kontrol positif kertas cakram antibiotik (kloramfenikol konsentrasi 30 μ g/*disk*). Kertas cakram yang sudah direndam selanjutnya dikering anginkan, kemudian diletakkan pada media MHA dengan menggunakan pinset dan diberi penandaan pada setiap perlakuan (Chandra, 2023). Media di inkubasi dalam inkubator selama 24 pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, diamati dan dilakukan pengukuran area zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong (Prayoga *et al.*, 2019). Perhitungan diameter zona hambat dihitung dengan rumus pada persamaan 1.

$$\begin{aligned} & \text{Rata - rata diameter zona hambat} \\ & = \frac{(Dh + Dv + Dd)}{3} (\text{mm}) \dots (1) \end{aligned}$$

Keterangan:

Dh : Diameter horizontal

Dv : Diameter vertikal

Dd : Diameter diagonal (Al-hijri *et al.*, 2017)

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Data yang dihasilkan pada penelitian ini ialah diameter zona hambat. Data diameter zona hambat tersebut dilakukan analisis secara statistika dengan program SPSS. Pada tahap awal data diuji menggunakan uji *Shapiro-Wilk* (normalitas) untuk melihat distribusi data. *Shapiro-Wilk* digunakan untuk jumlah data dibawa dari 50. Nilai sig > 0,05 menunjukkan data terdistribusi normal. Uji selanjutnya yaitu uji homogenitas untuk melihat varian dari semua data. Data dianggap homogen jika nilai sig > 0,05. Apabila syarat normalitas dan homogenitas telah terpenuhi, uji selanjutnya yang dilakukan yaitu uji *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95%.