

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental yang dilakukan di Laboratorium dengan membandingkan aktivitas antibakteri antara kelompok kontrol dan perlakuan. Metode yang digunakan untuk mengekstraksi bunga lempuyang gajah yaitu metode maserasi dengan etanol 70% digunakan sebagai pelarut. Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan yaitu metode sumuran.

B. Lokasi dan Waktu

Determinasi atau identifikasi tanaman dilakukan di Universitas Ahmad Dahlan Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan. Pengeringan sampel dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Unit II. Proses ekstraksi, uji organoleptik, skrining fitokimia dan uji kadar air ekstrak dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi dan uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Pelaksanaan penelitian berlangsung selama bulan Maret hingga Juni 2025.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bunga lempuyang gajah yang diambil di Jl. Merto Ijoyo samping kali bedog, Gg. Garuda, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta (7,80599° S, 110,33041° T).
2. Sampel dalam penelitian ini yaitu bunga lempuyang gajah yang berwarna merah tua dan tidak rusak sebanyak 5 Kg.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: variasi konsentrasi ekstrak etanol bunga lempuyang gajah.
2. Variabel terikat: diameter zona hambat pada bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 6919.
3. Variabel terkontrol: kriteria bunga yang diambil, suhu pengeringan simplisia, pelarut ekstraksi, waktu dan suhu inkubasi media uji.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol bunga lempuyang gajah merupakan ekstrak kental yang dihasilkan dari proses ekstraksi bunga lempuyang gajah dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.
2. Diameter zona hambat merupakan zona bening disekitar sumuran yang diukur dengan jangka sorong secara vertikal, horizontal dan diagonal.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Peralatan yang digunakan dalam ekstraksi yaitu ayakan ukuran 60 Mesh (Fomac), toples kaca besar, spatula kayu, timbangan neraca analitik, wajan, gelas beaker (Iwaki), grinder (Fomac), kompor listrik (Maspion), *moisture balance* (Ohaus) dan termometer.
 - b. Peralatan yang digunakan dalam uji organoleptik dan skrining fitokimia yaitu droplet, *hot plate*, pipet ukur 5 mL (Iwaki), pipet ukur 10 mL (Iwaki), propipet, pipet tetes, tabung reaksi (Iwaki), rak tabung, gelas beaker.
 - c. Peralatan yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah autoklaf (gea LS-B 50L), batang L, batang pengaduk, *Biosafety Cabinet* (BSC) (Daihan Labtech), cawan petri (Anumbra), *cork borer*, gelas beaker (Iwaki), *hot plate*, inkubator (Memmert IN30), jarum ose, jangka sorong (Carson), lemari pendingin, labu erlenmeyer 500 mL (Iwaki), *magnetic stirrer*, mikropipet 20-

200 μ L (DLAB), mikropipet 100-1000 μ L (Ohaus), oven (Mettler UN160), pembakar bunsen, pipet ukur 5 mL (Iwaki), pipet ukur 10 mL (Iwaki), propipet, sonikator (GT sonic), tabung reaksi (Iwaki), turbidimeter (Phoenixspec Nephelometer).

2. Bahan

- a. Bahan yang diperlukan untuk melakukan determinasi tanaman yaitu tanaman lempuyang gajah.
- b. Bahan yang dipakai dalam proses ekstraksi meliputi etanol 70%, kain mori, dan serbuk simplisia.
- c. Bahan yang diperlukan dalam pelaksanaan skrining fitokimia yaitu aquades, *Dimetil Sulfoksida* (DMSO), etanol bunga lempuyang, FeCl_3 , H_2SO_4 , HCl pekat, NH_3 , pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, etanol 70%, serbuk magnesium.
- d. Bahan yang dipakai dalam uji aktivitas antibakteri meliputi *aluminium foil*, aquades, bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, blue tip, DMSO, ekstrak etanol bunga lempuyang, kertas payung, kapsul klindamisin 150 mg, *Muller Hinton Agar* (MHA) (Himedia), *Nutrient Agar* (NA) (Merck), NaCl 0,9%, *plastik wrap*, yellow tip.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan sampel

a. Determinasi tanaman

Tanaman lempuyang gajah dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan dengan tujuan untuk mengetahui sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga lempuyang gajah dengan nama latin *Zingiber zerumbet* (L.) Sm.

b. Pembuatan simplisia

Bunga lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet*) yang segar dan tidak rusak, dicuci bersih dan diiris tipis-tipis kemudian dioven pada suhu 50°C selama 48 jam. Bunga dikatakan telah kering jika kadar air didalamnya < 10 % (Winangsih *et al.*, 2013). Bunga kering digiling hingga halus dengan grinder, kemudian dipisahkan melalui ayakan berukuran 60 mesh. Setelah itu, serbuk yang dihasilkan diletakkan pada wadah tertutup dan terlindungi dari paparan cahaya (Fatmawati & Rohmah, 2022).

c. Pembuatan ekstrak

Tahapan ekstraksi diawali dengan menimbang 150 gram serbuk simplisia bunga lempuyang gajah lalu merendamnya dalam 1500 mL etanol 70% menggunakan perbandingan 1:10 selama 3×24 jam pada suhu ruang. Selama tahap ekstraksi berlangsung dilakukan pengadukan setiap 24 jam selama 15 menit. Hasil maserasi disaring menggunakan kain mori dan kertas saring, residu yang diperoleh kemudian diremaserasi selama 1 hari dengan perbandingan pelarut 1:1. Hasil remaserasi yang didapatkan disaring menggunakan kain mori dan kertas saring, lalu larutan hasil maserasi dan remaserasi dikentalkan menggunakan kompor listrik pada suhu dibawah 50°C hingga terbentuk ekstrak kental (Fatmawati & Rohmah, 2022). Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dihitung nilai rendemennya melalui rumus pada **Persamaan (1)**.

$$Rendemen = \frac{\text{Berat hasil ekstraksi}}{\text{Berat sebelum ekstraksi}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

2. Uji Organoleptik

Uji organoleptik bertujuan untuk mengidentifikasi ekstrak etanol bunga lempuyang gajah berdasarkan pancaindra, meliputi bau, warna, rasa, dan tekstur (Octavia *et al.*, 2023).

3. Uji Kadar Air Ekstrak

Kadar air ekstrak ditentukan menggunakan alat *moisture balance*. Pengujian diawali dengan menimbang 500 mg ekstrak etanol bunga lempuyang gajah dan diletakkan pada lempeng logam, kemudian diratakan. Nyalakan alat *moisture*

balance pada suhu 105 °C dan tunggu hingga alat berbunyi. Jika alat sudah berbunyi menandakan bahwa proses analisis telah selesai dan hasil pengukuran dapat dilihat pada layar alat. Persentase kadar air yang baik untuk ekstrak yaitu kurang dari 10%. Pengukuran kadar air dilakukan sebanyak 3 kali (Aini *et al.*, 2023).

4. Pembuatan Variasi Konsentrasi Larutan Uji

Larutan uji ekstrak etanol bunga lempuyang gajah dibuat pada berbagai konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80% (b/v). Konsentrasi awal yang dibuat yaitu konsentrasi 80%. Pembuatan konsentrasi ekstrak 80% dilakukan dengan menimbang 10 g ekstrak, kemudian melarutkannya dalam 12,5 mL DMSO 10%. Ekstrak yang telah diencerkan menggunakan DMSO 10% disonikasi selama 35 menit. Pengenceran untuk seri konsentrasi larutan uji 20%, 40% dan 60% dihitung menggunakan **Persamaan (2)**.

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2 \dots\dots\dots(2)$$

5. Skrining Fitokimia

Pengujian skrining fitokimia dilakukan terhadap masing-masing variasi konsentrasi ekstrak etanol bunga lempuyang gajah yaitu (20%, 40%, 60%, dan 80%).

a. Uji Alkaloid

Pengujian alkaloid dilakukan dengan mencampurkan 10 tetes ekstrak dengan 3 tetes kloroform dan 5 tetes amonia (NH₃), kemudian campuran tersebut dipanaskan di atas *hot plate*. Tambahkan 1 tetes H₂SO₄ pada campuran tersebut, kemudian campuran tersebut dibagi 3 tabung dengan volume yang sama, pada tabung pertama ditambahkan 5 tetes pereaksi Mayer, tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Wagner dan tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi Mayer, endapan jingga pada pereaksi Dragendorff, serta endapan coklat kemerahan pada pereaksi Wagner yang menunjukkan positif adanya alkaloid (Fatmawati & Rohmah, 2022).

b. Uji Flavonoid

Langkah awal pada uji flavonoid yaitu dengan meneteskan ekstrak etanol bunga lempuyang gajah sebanyak 12 tetes pada tabung reaksi, kemudian ditambahkan 7 tetes aquades panas selanjutnya dididihkan selama 5 menit didalam tabung reaksi. Larutan tersebut kemudian di teteskan pada droplet sebanyak 7 tetes dan dilakukan penambahan 3 tetes HCl pekat serta ditambahkan bubuk Mg sebanyak 1 ujung spatula. Jika menunjukkan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga menandakan ekstrak tersebut positif mengandung senyawa flavonoid (Larasati & Putri, 2023).

c. Uji Triterpenoid/Steroid

Langkah awal pada uji ini yaitu dengan menyiapkan pereaksi *Lieberman-burchard* dengan cara mencampur 20 mL asam asetat anhidrat dengan 1 mL asam sulfat pekat. Campuran lalu disimpan dalam wadah yang gelap (Aristyawan *et al.*, 2024).

Pada uji triterpenoid dan steroid dilakukan dengan meneteskan sebanyak 10 tetes ekstrak, kemudian ditambahkan 3 tetes kloroform pada droplet. Selanjutnya, ditambahkan 2 tetes pereaksi *Lieberman-burchard* (Firmansyah & La, 2022). Reaksi positif akan ditandai dengan munculnya cincin berwarna jingga atau ungu untuk triterpenoid, serta warna hijau kebiruan untuk steroid (Hasibuan *et al.*, 2020).

d. Uji Tanin

Langkah pertama dalam uji tanin yaitu dengan menambahkan 10 tetes ekstrak etanol bunga lempuyang gajah yang sudah diencerkan pada droplet lalu ditambahkan dengan 5 tetes aquades dan disaring menggunakan kertas saring. Sebanyak 5 tetes filtrat dicampur dengan 2 tetes FeCl_3 1%, jika munculnya warna biru atau hijau kehitaman menandakan adanya senyawa tanin (Hasibuan *et al.*, 2020).

e. Uji Saponin

Tahap awal uji saponin adalah melarutkan 0,5 g ekstrak etanol bunga lempuyang dalam 10 mL aquades panas. Setelah dingin, larutan dikocok selama 10 detik. Jika terbentuknya busa 1–10 cm yang bertahan > 10 detik dan tidak menghilang setelah ditetesi 1 tetes HCl 2 N menandakan adanya senyawa saponin dalam ekstrak tersebut (Hasibuan *et al.*, 2020).

6. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Pembuatan DMSO 10%

Konsentrasi DMSO 10% dibuat dengan cara mengencerkan DMSO 100% sebanyak 5 mL kemudian ditambahkan dengan aquades hingga volumenya 50 mL (Rikomah, 2016).

b. Sterilisasi Alat

Seluruh peralatan dicuci dan dikeringkan sebelum digunakan. Tabung turbidi dan *blue tip* dibungkus *aluminium foil*, lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Tabung reaksi ditutup kapas berlapis kasa sebelum disterilisasi dengan oven. Sementara itu, alat gelas seperti cawan petri dibungkus kertas payung dan disterilkan menggunakan oven pada suhu 171°C selama 1 jam (Ramadhani *et al.*, 2024).

c. Pembuatan Media

1) Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Media NA dibuat dengan cara menimbang NA sebanyak 0,4 g dalam 20 mL aquades kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* diatas *hot plate* hingga homogen. Jika media sudah larut, tahap selanjutnya yaitu sterilisasi media menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C bertekanan 1 atm. Media yang sudah steril kemudian dibagi kedalam 2 tabung reaksi, lalu dimiringkan dengan kemiringan 30° hingga media memadat (Ramadheni *et al.*, 2018).

2) Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

MHA sebanyak 5,1 g dilarutkan dalam 150 mL aquades, lalu dihomogenkan dengan bantuan *magnetic stirrer* diatas hot plate. Jika sudah

homogen, media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang sudah steril dituangkan kedalam cawan petri dan didiamkan sampai memadat (Nurhayati *et al.*, 2020).

d. Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri uji yang akan digunakan sebelumnya dilakukan peremajaan terlebih dahulu. Proses peremajaan dilakukan menggunakan metode gores dengan cara menginokulasikan satu ose biakan murni *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 ke media agar miring secara aseptik. Biakan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sebelum disimpan di lemari pendingin sebagai stok bakteri (Haryani *et al.*, 2024).

e. Persiapan Suspensi Bakteri Uji

Suspensi bakteri dibuat dengan mengambil satu ose koloni hasil peremajaan, kemudian dicampurkan ke dalam tabung reaksi berisi 5 mL NaCl 0,9% steril. Tingkat kekeruhan diukur menggunakan turbidimeter hingga mencapai standar 0,5 Mc Farland (Nurhayati *et al.*, 2020).

f. Pembuatan Kontrol Positif

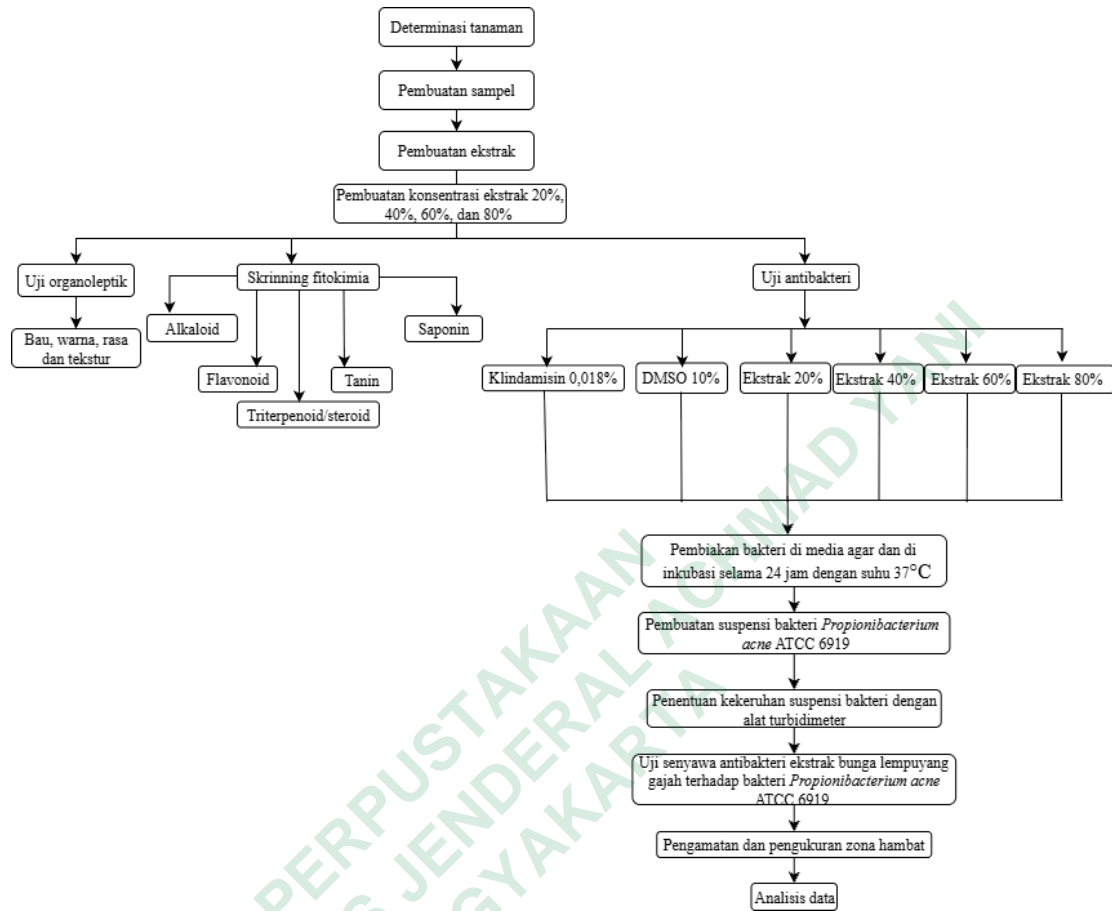
Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini yaitu Klindamisin 0,018%. Larutan Klindamisin 0,018% dibuat dengan menimbang 3 mg isi kapsul Klindamisin kemudian dilarutkan dalam 10 mL DMSO 10% (Athailah & Lestari, 2020).

g. Pengujian Antibakteri Menggunakan Metode Sumuran

Uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini dibagi menjadi dua kelompok, yaitu perlakuan dan kontrol. Kelompok perlakuan terdiri dari ekstrak etanol bunga lempuyang gajah dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%. Kelompok kontrol meliputi kontrol negatif (DMSO 10%) dan kontrol positif (Klindamisin 0,018%). Jika semua sudah disiapkan, media MHA yang sudah dibuat diinokulasi dengan 0,1 mL suspensi *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, kemudian diratakan dengan *cotton swab*. Selanjutnya disiapkan lubang sumuran berukuran 6 mm yang dibuat menggunakan *cork borer*, lalu

masing-masing perlakuan dimasukkan sebanyak 40 μ L. Jika sudah selesai diberi perlakuan cawan petri dibungkus *plastic wrap* dan dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam, serta setiap uji dilakukan 3 \times replikasi (Nurhayati *et al.*, 2020). Alur jalannya penelitian dapat dilihat pada **Gambar 4**.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA



Gambar 4. Alur Penelitian

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Zona hambat diukur dengan menentukan diameter secara vertikal, diagonal, dan horizontal menggunakan jangka sorong, lalu dibandingkan dengan referensi kategori zona hambat (Hester *et al.*, 2014). Hasil pengukuran selanjutnya dihitung menggunakan rumus pada **Persamaan (3)**.

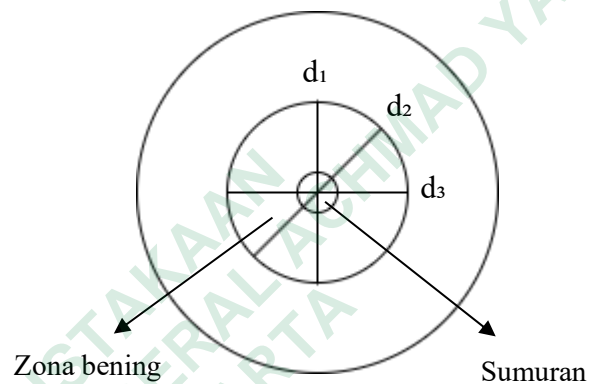
$$D = \frac{d_1+d_2+d_3}{3} \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan :

d_1 = vertikal

d_2 = diagonal

d_3 = horizontal



Gambar 5. Pengukuran Zona Hambat Bakteri

Tahap awal analisis diameter zona hambat dilakukan melalui uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan homogenitas (*Levene*). Data dianggap normal dan homogen bila $Sig > 0,05$. Jika syarat terpenuhi, digunakan uji *One-Way* ANOVA untuk membandingkan konsentrasi ekstrak. Jika nilai $Sig > 0,05$ menunjukkan tidak ada perbedaan, sedangkan $Sig < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan bermakna dan dilanjutkan dengan *post-hoc Tukey*. Apabila asumsi tidak terpenuhi, analisis dilakukan dengan uji *Kruskal-Wallis*.