

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pengujian aktivitas antibakteri infusa daun sirih hijau muda dan tua terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Pengujian dilakukan dengan metode dilusi cair dan padat guna menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) serta Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini berlangsung pada bulan April - Juni 2025, dengan pembagian lokasi sebagai berikut:

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.
2. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi Yogyakarta.
3. Proses ekstraksi dan uji skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.
4. Uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi pada penelitian ini yaitu daun sirih hijau yang diambil dari Dusun Ngireng-ireng, Desa Sidomulyo, Kelurahan Bambanglipuro, Bantul, Yogyakarta (-7.955856°S, 110.297512°E).
2. Sampel pada penelitian ini yaitu menggunakan daun sirih hijau muda dan tua segar dengan kondisi daun baik (tidak rusak). Daun sirih yang digunakan dipilih berdasarkan warna daun. Daun muda ditandai dengan warna hijau muda,

sedangkan daun tua berwarna hijau tua. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 digunakan sebagai sampel bakteri pada penelitian ini, bakteri tersebut diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas
Variasi konsentrasi infusa daun sirih hijau muda dan tua.
2. Variabel terikat
Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).
3. Variabel terkontrol
Sampel yang digunakan, jenis bakteri uji, media pertumbuhan bakteri, suhu inkubasi bakteri, dan waktu inkubasi bakteri.

E. Definisi Operasional

1. Infusa daun sirih hijau muda dan tua yaitu sediaan cair diperoleh dengan mengekstraksi daun sirih hijau muda dan tua masing-masing menggunakan pelarut air pada suhu 90°C selama 15 menit.
2. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) merupakan konsentrasi terendah infusa daun sirih hijau muda dan tua yang mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ditandai dengan pengamatan kekeruhan pada media uji.
3. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) merupakan konsentrasi terendah infusa daun sirih hijau muda dan tua yang mampu membunuh bakteri, dilihat dari tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media setelah diberikan perlakuan dengan cara menggoreskan sampel ke media agar pada cawan petri.

F. Alat dan Bahan

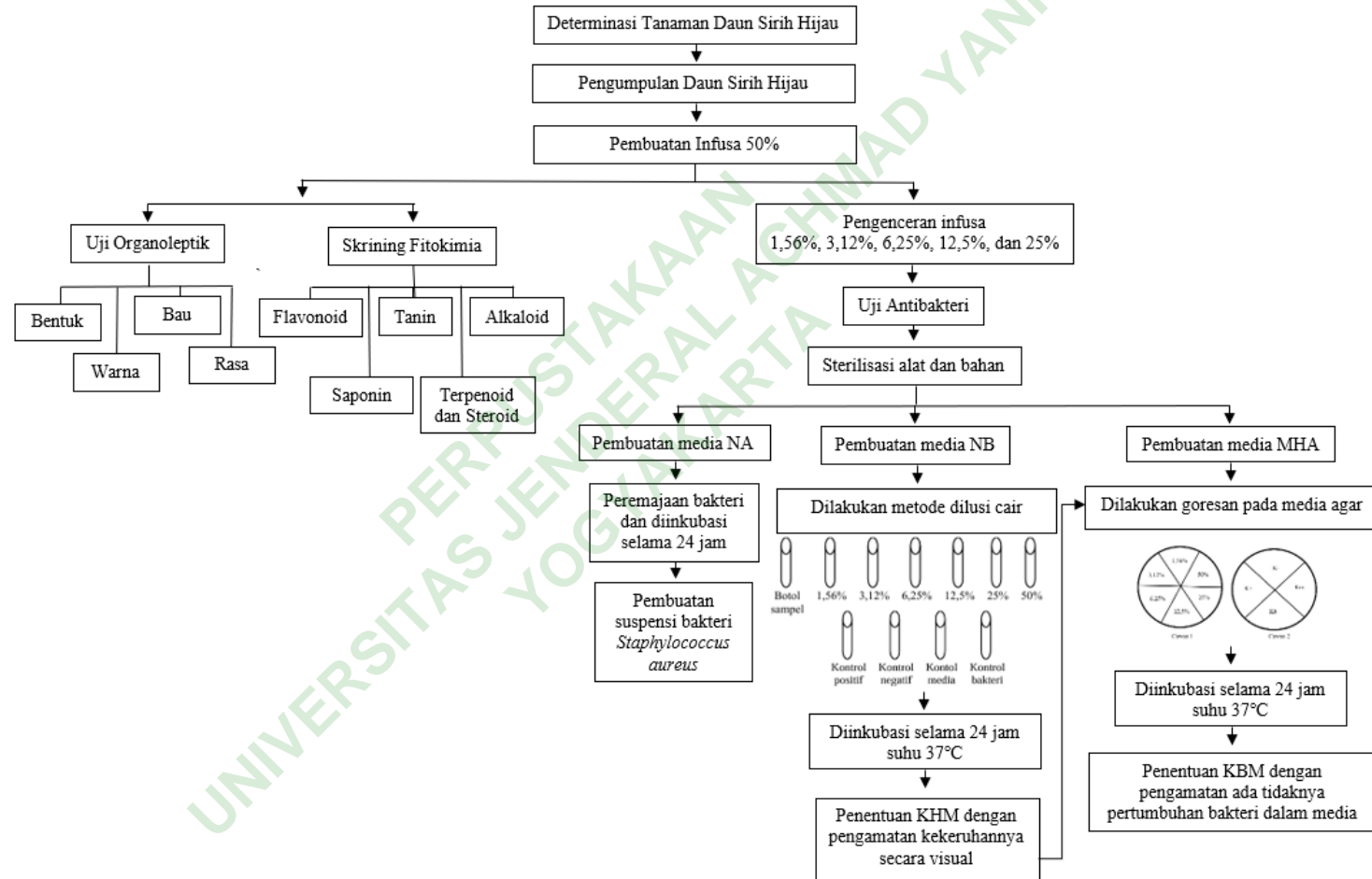
1. Alat

- a. Ekstraksi: batang pengaduk, gelas ukur 100 mL (Iwaki), kompor listrik (MASPION S-302), labu takar 5 mL (Iwaki), panci infusa, stopwatch, thermometer, timbangan analitik (Ohaus).
- b. Uji skrining fitokimia: gelas beaker 20 mL (Iwaki), gelas ukur 10 mL (Iwaki), kompor listrik (MASPION S-302), mikropipet 100-1000 μ l (Ohaus), panci, 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, daun sirih hijau muda dan tua segar, kertas saring.
- b. Uji skrining fitokimia: akuades, ammonium hidroksida (NH_4OH), asam asetat anhidrid (CH_3CO)₂O, asam klorida pekat (HCl), asam sulfat pekat (H_2SO_4), besi (III) klorida (FeCl_3), *bluetip*, kloroform, pereaksi dragendorff, pereaksi mayer, pereaksi wagner, serbuk magnesium.
- c. Uji aktivitas antibakteri: alkohol 70%, aluminium foil, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *bluetip*, kapas, kasa, kertas payung, media *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Himedia), media *Nutrient Agar* (NA) (Mercks), media *Nutrient Broth* (NB) (Mercks), NaCl 0,9%, plastik wrap, spiritus, tali kenur, tissue.

G. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 4. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi

Proses identifikasi tanaman bertujuan untuk mencegah kekeliruan dalam pengumpulan bahan baku serta memastikan bahwa jenis tanaman yang dipakai adalah daun sirih hijau (*Piper betle* Linn). Identifikasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

2. Pembuatan infusa

Daun sirih hijau muda dan tua segar dengan kondisi daun tidak rusak diambil dari Dusun Ngireng-ireng, Desa Sidomulyo, Bambanglipuro, Bantul, Yogyakarta. Daun muda ditandai dengan warna hijau muda, sementara daun tua ditandai dengan warna hijau gelap. Setelah dikumpulkan, daun dibersihkan secara menyeluruh dengan air mengalir untuk menghilangkan segala kotoran dan senyawa kotoran yang melekat di permukaan daun serta memisahkan bagian daun yang tidak diperlukan, ditiriskan dan dirajang kecil untuk mempermudah ekstraksi (Nori *et al.*, 2021).

Ditimbang daun muda dan tua masing-masing sebanyak 50 gram, dimasukkan dalam panci infusa kemudian ditambah 100 mL akuades, lalu campuran dipanaskan dengan pemanas air selama 15 menit, terhitung sejak suhu akuades dalam panci mencapai 90°C, sambil sesekali diaduk (Hamzah *et al.*, 2021). Setelah proses perebusan selesai, infusa kemudian didinginkan hingga suhu kamar, lalu disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan ampasnya sehingga diperoleh infusa konsentrasi 50% (b/v). Pengenceran infusa dilakukan dengan menggunakan rumus $M_1.V_1 = M_2.V_2$ untuk memperoleh konsentrasi 1,56%, 3,12%, 6,25%, 12,5%, dan 25% dalam 5 mL. Infusa tidak disimpan lebih dari 24 jam (Ardiyansyah *et al.*, 2016).

3. Uji organoleptik

Uji organoleptik dilakukan pada infusa konsentrasi 50% dengan melakukan pengamatan terhadap bentuk, warna, bau dan rasa (Manarisip *et al.*, 2020).

4. Skrining fitokimia

a. Uji flavonoid

Infusa daun sirih hijau muda dan tua sebanyak 1 mL larutan dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi, ditambahkan 0,2 gram serbuk magnesium dan 3 tetes asam klorida pekat ke dalam setiap tabung. Campuran tersebut kemudian dipanaskan, positif mengandung flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah, kuning, atau jingga (Adjeng *et al.*, 2020).

b. Uji saponin

Infusa daun sirih hijau muda dan tua sebanyak 1 mL larutan dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas. Setelah dingin, campuran tersebut dikocok selama 10 detik. Positif saponin ditandai terbentuknya busa yang stabil selama minimal 10 menit (Qomaliyah *et al.*, 2023).

c. Uji tanin

Infusa daun sirih hijau muda dan tua dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan 1 mL larutan FeCl_3 1%. Jika larutan berubah warna menjadi hijau kehitaman, sampel dinyatakan positif tanin (Adjeng *et al.*, 2020).

d. Uji triterpenoid dan steroid

Infusa daun sirih hijau muda dan tua sebanyak 1 mL larutan dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi, ditambahkan 10 tetes asam asetat anhidrat serta 2 tetes asam sulfat pekat. Adanya steroid dalam sampel ditunjukkan dengan larutan berubah warna menjadi hijau atau biru, sedangkan keberadaan triterpenoid ditunjukkan dengan warna merah atau ungu (Nurcholis *et al.*, 2022).

e. Uji alkaloid

Sebanyak 1 mL infusa daun sirih hijau muda dicampurkan dengan 5 mL kloroform dan 2 tetes ammonium hidroksida (NH_4OH), kemudian dikocok hingga merata. Campuran ini kemudian dibagi ke dalam tiga tabung reaksi untuk dilakukan uji alkaloid menggunakan tiga jenis pereaksi.

Tabung pertama dengan penambahan 3 tetes pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih kekuningan jika sampel positif mengandung alkaloid. Pada tabung kedua, penambahan 3 tetes pereaksi Dragendorf ditandai dengan endapan berwarna jingga. Penambahan 3 tetes pereaksi Wagner akan menghasilkan endapan coklat. Hal serupa juga dilakukan untuk menguji kandungan alkaloid pada infusa daun sirih hijau tua (Nofita *et al.*, 2021).

5. Pengujian aktivitas antibakteri

a. Sterilisasi alat dan bahan

Cawan petri dan gelas beaker dicuci bersih kemudian dikeringkan dan dibungkus menggunakan kertas payung. Disterilkan alat dengan metode panas kering menggunakan oven pada suhu 170°C selama 1 jam. Sementara itu, jarum ose disterilisasi dengan memijarkannya hingga merah membara menggunakan nyala api bunsen sesaat sebelum digunakan. Media dan *blue tip* sterilisasi dilakukan menggunakan metode sterilisasi basah dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm (Rusli *et al.*, 2023).

b. Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)

Ditimbang 0,7 gram serbuk NA lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambahkan 35 mL akuades. Campuran tersebut dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga mendidih dan homogen. Media yang telah homogen ditandai dengan warna media yang menjadi kuning bening. Selanjutnya, media dibagi ke 5 tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL dan ditutup dengan kapas yang dibalut kasa. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Setelah sterilisasi, media diletakkan pada posisi miring dengan sudut 15° hingga memadat (Hamzah *et al.*, 2021).

c. Pembuatan media *Nutrient Broth* (NB)

Dilakukan penimbangan serbuk NB sebanyak 0,92 gram, kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer dan tambahkan akuades 115 mL. Panaskan campuran tersebut di atas *hotplate* dan dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih dan campuran homogen yang ditandai

dengan media menunjukkan warna kuning bening. Pindahkan media NB kedalam 30 tabung reaksi dengan volume media pada masing-masing tabung sebanyak 3,5 mL, lalu sumbatkan tabung dengan kapas berbalut kasa. Sterilisasi media dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm (Narulita, 2017).

d. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Serbuk MHA sebanyak 3,4 gram ditimbang, lalu dimasukkan dalam erlenmeyer dan tambahkan akuades 100 mL. Panaskan campuran tersebut di atas *hotplate* dan dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih dan campuran homogen yang ditandai dengan media menunjukkan warna kuning bening. Sterilisasi media dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Media MHA steril selanjutnya dituang ke 6 cawan petri dengan volume pada masing-masing cawan sebanyak 15 mL. Biarkan media hingga memadat (Ayen & Rahmawati, 2017).

e. Peremajaan bakteri

Diambil satu ose kultur murni *Staphylococcus aureus*, lalu digoreskan pada media agar miring *Nutrient Agar* (NA). Diinkubasi kultur tersebut selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah peremajaan, bakteri disimpan di lemari pendingin sebagai stok bakteri (Hamzah *et al.*, 2021).

f. Pembuatan suspensi bakteri

Diambil tiga ose bakteri yang sudah diremajakan, lalu suspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCl 0,9% steril. Campuran tersebut kemudian divortex hingga homogen. Selanjutnya, kekeruhan suspensi bakteri diukur menggunakan turbidimeter yang telah diverifikasi dengan larutan standar. Hasil kekeruhan suspensi bakteri yang sesuai dengan standar McFarland 0,5 ditunjukkan melalui angka yang muncul pada alat turbidimeter (Hamzah *et al.*, 2021).

g. Pembuatan larutan uji kontrol positif

Kloramfenikol dengan konsentrasi 0,0083% (b/v) digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini. Larutan kloramfenikol dibuat

dengan menimbang isi kapsul sebanyak 0,1 gram dan dilarutkan dalam 10 mL akuades steril sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 0,0083% (Ervina *et al.*, 2021). Hasil perhitungan konsentrasi kontrol positif dapat dilihat pada **Lampiran 8**.

h. Uji aktivitas antibakteri dengan metode makrodilusi

Metode dilusi cair dengan menggunakan tabung reaksi digunakan untuk uji KHM. Sebanyak 10 tabung reaksi yang telah disterilkan disiapkan, kemudian masing-masing dimasukkan 3,5 mL media NB dan ditambahkan 0,5 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kekeruhan sesuai standar McFarland 0,5.

- 1) Tabung 1-6 dimasukkan infusa daun sirih hijau muda dengan konsentrasi 1,56%, 3,12%, 6,25%, 12,5%, 25% dan 50% masing-masing sebanyak 1 mL. Hal serupa juga dilakukan untuk daun sirih hijau tua dengan disiapkan enam tabung reaksi steril, kemudian dilakukan pembuatan larutan konsentrasi awal untuk uji infusa daun sirih hijau tua.
- 2) Tabung 7 merupakan kontrol positif yang diberi label K+, tabung berisi antibiotik kloramfenikol 1%.
- 3) Tabung 8 merupakan kontrol negatif yang diberi label K-, tabung berisi akuades.
- 4) Tabung 9 merupakan kontrol media yang diberi label Km, tabung berisi media *Nutrien Broth* (NB).
- 5) Tabung 10 merupakan kontrol bakteri yang diberi label Kb, tabung berisi suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 6) Setiap tabung uji kemudian diberi label nomor 1 hingga 10 dan seluruh prosedur tersebut dilakukan sebanyak 3 kali replikasi untuk memastikan keakuratan hasil.

Diinkubasi tabung uji pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil inkubasi kemudian diamati kekeruhannya secara visual. Kekeruhan tabung dibandingkan dengan tabung Kb yang berisi suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* sesuai standar kekeruhan McFarland 0,5. Apabila

tingkat kekeruhan pada tabung setara atau melebihi kekeruhan pada tabung Kb, maka bakteri masih tumbuh. Jika larutan tetap jernih, maka bakteri telah terhambat pada konsentrasi tersebut, menunjukkan bahwa KHM telah tercapai. Konsentrasi terkecil pada tabung perlakuan yang menghambat pertumbuhan bakteri digunakan untuk menentukan nilai KHM (Munira & Nasir, 2023).

Tahap selanjutnya dilakukan pengamatan pertumbuhan bakteri pada media cawan untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menggunakan metode dilusi padat. Cawan petri dibagi menjadi 6 bagian, diambil sampel dari tabung reaksi hasil pengujian KHM menggunakan jarum ose steril, kemudian digoreskan dengan teknik gores sinambung di media MHA. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. KBM ditentukan dengan mengamati pertumbuhan bakteri pada media agar setelah inkubasi. Konsentrasi terendah yang berhasil membunuh pertumbuhan bakteri digunakan untuk nilai KBM (Munira & Nasir, 2023).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif untuk mengolah dan menganalisis datanya untuk mengkaji hasil uji antibakteri. Pengamatan dilakukan berdasarkan KHM dan KBM. Pengolahan data diawali dengan menentukan KHM melalui pengamatan kejernihan atau kekeruhan media cair dalam tabung reaksi. KHM ditentukan pada konsentrasi terendah di mana media tetap jernih, hal tersebut menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri.

Untuk menentukan KBM, apabila tidak ditemukan pertumbuhan koloni bakteri pada media agar pada suatu konsentrasi, maka konsentrasi tersebut ditetapkan sebagai KBM. Namun, jika pertumbuhan masih terjadi, pengamatan dilanjutkan pada konsentrasi yang lebih tinggi hingga diperoleh konsentrasi di mana tidak ada pertumbuhan sama sekali. Seluruh data hasil pengamatan dianalisis dan disajikan bentuk tabel, untuk menunjukkan hubungan antara konsentrasi infusa daun sirih hijau dengan efektivitas antibakteri berdasarkan hasil uji KHM dan KBM.