

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang dilakukan dengan mengamati zona hambat bakteri yang terbentuk di sekitar sumuran.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

a. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Bahan Alam (FBA), Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi (TSF), dan Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Widya Mandira.

b. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman daun sirih hijau yang ada di Kecamatan Lasiolat, Kabupaten Belu.

2. Sampel dan teknik sampling

a) Sampel

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirih hijau.

b) Teknik sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Purposive sampling*. *Purposive sampling* merupakan teknik penentuan sampel

dengan pertimbangan tertentu (Sugiyono 2016). Kriteria pengambilan sampel dalam penelitian ini adalah: daun sirih segar dan kondisi daun sirih yang tidak terlalu tua maupun tidak terlalu muda.

D. Variabel Penelitian

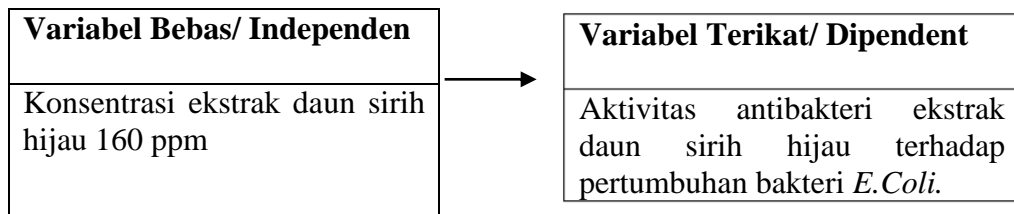
1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi 160 ppm ekstrak daun sirih hijau yang diambil di Desa Baudaok, Kecamatan Lasiolat, Kabupaten Belu.

2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah Aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih hijau terhadap pertumbuhan bakteri *E.Coli*.

E. Kerangka Konsep



Keterangan:

:Variabel yang diteliti

Gambar 3. Variabel Penelitian

F. Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Skala
Daun sirih hijau (<i>Piper betle</i> L)	Daun sirih hijau yang tumbuh di desa Baudaok, kecamatan Lasiolat memiliki kriteria daun yang lebar dan berwarna kuning kehijauan hingga berwarna hijau tua.	Nominal
Ekstrak daun sirih hijau (<i>Piper betle</i> L.)	Ekstrak daun sirih hijau (<i>Piper betle</i> L.) yang diperoleh dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 95% dan dibuat (ppm).	Rasio
<i>E.Coli</i>	Salah satu bakteri koliform yang termasuk dalam famili Enterobacteriaceae sebagai bakteri uji yang digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Widya Mandira	Nominal
Difusi Sumuran	Metode yang digunakan untuk penanaman bakteri agar dapat melihat zona hambat.	Rasio
Aktivitas antibakteri	Kemampuan ekstrak daun sirih hijau dalam menghambat pertumbuhan bakteri <i>E.coli</i> yang ditunjukkan dengan adanya zona bening.	Ordinal

G. Alat dan Bahan

1. Alat

Timbangan analitik (*sihmadzu*), vakum rotari evaporator, waterbath (*memmerth*), autoclave, hotplate, micropipet (*dragon med*), inkubator (*javan*), beaker gelas (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), labu ukur (*pyrex*), cawan petri, pipet tetes (*pyrex*), pipet volume (*pyrex*), tabung reaksi (*pyrex*), jangka sorong (*tricle brand*), jarum ose.

2. Bahan

Ekstrak daun sirih hijau, bakteri *E.coli*, media Nutrient Agar (NA), media Nutriet Broth (NB), etanol 95%, aquades, kloroform, amoniak, HCL 2N, H₂SO₄, NaCl, FeCl₃, Methanol, pereaksi mayer, pereaksi wagner, pereaksi bouchardat, ethanol dan tablet cotrinmoxazole.

H. Prosedur Penelitian

1. Persiapan alat

Alat-alat yang digunakan seperti: cawan petri, tabung reaksi, beaker gelas, pipet tetes, pipet volume, jarum ose, dan erlenmeyer terlebih dahulu disterilkan sebelum melakukan percobaan .

2. Pembuatan simplisia

Proses pembuatan simplisia daun sirih hijau (Kursia dkk., 2016) adalah sebagai berikut:

Daun sirih hijau yang sudah dipanen (1Kg), kemudian dilakukan sortasi basah atau kegiatan memisahkan daun sirih dengan bagian tanaman yang tidak digunakan ataupun kerikil dan rumput - rumput. Daun sirih yang sudah dipisahkan kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel dan tiriskan. Daun sirih kemudian dirajang, dan dijemur dibawah matahari yang ditutupi dengan kain hitam. Dihasilkan daun sirih hijau kering, kemudian dihaluskan sehingga menghasilkan serbuk simplisia daun sirih hijau yang digunakan sebagai sampel penelitian.

3. Pembuatan ekstrak daun sirih hijau(*Piper betle* L.)

Ekstrak dibuat dari serbuk simplisia kering dengan cara maserasi menggunakan pelarut yang sesuai. Serbuk daun sirih ditimbang sebanyak 200 gram kemudian dimasukan kedalam bejana maserasi. Kemudian serbuk daun sirih dimaserasi menggunakan pelarut etanol 95% sebanyak 2 liter selama 5x24 jam (5 hari). Kemudian disaring untuk mendapatkan

filtrat, setelah itu dilakukan remaserasi menggunakan pelarut etanol 95% sebanyak 1 liter selama 2x24 jam (2 hari) dan disaring untuk diambil filtratnya. Filtrat tersebut selanjutnya dipekatkan menggunakan alat rotary evaporator dengan suhu 50⁰C, kemudian filtrat tersebut diuapkan menggunakan cawan porselin diatas waterbath untuk memperoleh ekstrak kental.

4. Perhitungan rendemen

Menurut (Depertemen Kesehatan RI,2000), rendemen merupakan perbandingan jumlah (kuantitas) ekstrak yang dihasilkan dari ekstraksi tanaman dengan jumlah simplisia. Rendamen dinyatakan dengan satuan persen (%). Semakin tinggi nilai rendamen yang dihasilkan menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Dari perhitungan rendemen ini, dapat diketahui nilai kesetaraan tiap gram ekstrak kental simplisia. Nilai rendemen dihitung dengan cara :

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot simplisia kering}} \times 100\%$$

5. Bebas etanol

Ekstrak daun sirih hijau dilakukan uji bebas etanol dengan cara masukan 1 mL ekstrak yang sudah dilarutkan dengan aquades ke dalam tabung reaksi ditambahkan 2 tetes asam asetat dan 2 tetes H₂SO₄ pekat lalu dipanaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol jika tidak ada bau ester yang khas dari etanol atau terbentuk bau seperti bau permen karet(Tivani dkk., 2021).

6. Uji Penapisan Fitokimia

a) Identifikasi Alkaloid

Ekstrak dicampur dengan 5 ml. kloroform dan 5 mL amoniak kemudian dipanaskan, dikocok dan disaring. Tambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 5 tetes pada masing-masing filtrat, kemudian kocok dan didiamkan. Bagian atas dari masing-masing filtrat diambil dan diuji dengan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorf. Terbentuknya endapan putih, coklat dan jingga menunjukkan adanya alkaloid (Harborne,1987 dalam Bessie, 2019).

b) Identifikasi Flavonoid

Ekstrak dicampur dengan 3 ml etanol 70% lalu dikocok, dipanaskan dan dikocok lagi kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan serbuk Mg 0,1 g dan 2 tetes HCl pekat. Terbentuknya warna merah pada lapisan etanol menunjukkan adanya flavonoid (Harborne,1987 dalam Bessie, 2019).

c) Identifikasi Tanin

Timbang 200 mg ekstrak larutkan dalam 5 mL metanol, tambahkan 3 mL larutan FeCl_3 1%. Adanya kandungan tanin ditandai dengan timbulnya warna hijau gelap atau hijau kebiruan (Harborne,1987 dalam Bessie, 2019).

d) Identifikasi Saponin

Timbang 500 mg sampel, masukkan dalam tabung reaksi. Tambahkan 10 mL air mendidih, kocok hingga berbusa. Ekstrak

mengandung saponin jika busa tidak hilang setelah dibiarkan > 10 menit dan, busa tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCl 2 N (Harborne,1987 dalam Bessie, 2019).

7. Pembuatan kultur bakteri *E.coli*

Satu koloni biakan murni bakteri *E. coli* diambil dengan menggunakan jarum ose yang sudah disteril dari kultur muninya, dan selanjutnya diinokulasi dalam tabung reaksi yang berisi media Nutrienr Broth (NB), kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 1x24 jam dan kemudian diamati pertumbuhan koloni bakteri tersebut (Utomo et al., 2018).

8. Pembuatan larutan kontrol positif

Pembuatan larutan kontrol positif menggunakan cotrimoxazole dengan menimbang 0,1 gram serbuk cotrimoxazole dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 5% mL kemudian ditambahkan aquades sampai 50 mL.pembuatannya menggunakan labu ukur 50mL Sedangkan kontrol negatif menggunakan DMSO 10% (Page & Batmomolin, 2022).

9. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih hijau

Dalam melakukan uji aktivitas antibakteri ini menggunakan metode difusi sumuran.

- a) Dibuat larutan sampel ekstrak daun sirih hijau dengan konsentrasi 160 ppm.
- b) Dibuat 120 mL media NA untuk 6 cawan petri masing-masing 20 mL, (3 cawan petri untuk tiga kali pengulangan sampel, 3 cawan petri

untuk tiga kali pengulangan kontrol) dan disterilisasi menggunakan alat autoclave.

- c) Dipipet 20 mL NA pada masing-masing cawan dan dibiarkan memadat.
- d) Masukkan masing-masing cawan inokulum bakteri yang sudah diremajakan sebanyak 100 μ L menggunakan mikropipet kemudian disebarakan secara merata menggunakan alat spreader diatas media NA.
- e) Masing-masing cawan dibuat sumuran dengan menggunakan alat cork borer (untuk cawan sampel masing-masing dibuat satu sumuran, kemudian untuk cawan kontrol dibuat masing-masing 2 sumuran.
- f) Masing-masing cawan diberikan label penanda untuk sampel, kontrol positif dan kontrol negatif
- g) Pipet sampel menggunakan mikropipet kemudian dimasukkan kedalam sumuran, begitupun larutan cotrinmoxazole sebagai kontrol positif dan larutan DMSO 10% sebagai control negatif, ke masing-masing sumuran yang sudah diberi tandai dengan label.
- h) Setelah itu dinkubasi dalam incubator selama 1x24 jam dengan suhu 37⁰C.
- i) Setelah 24 jam, amati zona hambat atau daerah bening yang terbentuk disekitar sumuran dan mengukur menggunakan jangka sorong.

I. Analisis Data

Hasil dari pengujian aktivitas antibakteri, pembacaan daerah hambat dilakukan dengan mengukur diameter total zona bening yang mengelilingi sumuran dengan menggunakan jangka sorong. Uji aktivitas antibakteri yang baik ditandai dengan diameter daerah hambat yang terbentuk(Tivani dkk., 2021).

