

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Metodologi penelitian adalah suatu cara untuk memperoleh kebenaran ilmu pengetahuan atau pemecahan suatu masalah, dan pada dasarnya menggunakan metode ilmiah (Notoadmodjo,2002).

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan jenis metode penelitian eksperimen. Metode penelitian eksperimen merupakan penelitian yang dilakukan dengan melakukan manipulasi yang bertujuan untuk mengetahui akibat terhadap perilaku suatu objek penelitian yang diamati (Latipun, 2002). Pada penelitian ini peneliti melakukan penelitian pada ekstrak daun sirih hijau yang diekstraksi dengan menggunakan metode ekstraksi dingin, ekstrak kemudian dimanipulasi menjadi beberapa konsentrasi uji yang akan diukur luas daya hambatnya pada bakteri uji *Staphylococcus aureus*.

Desain penelitian pada hakikatnya merupakan suatu strategi untuk mencapai tujuan penelitian yang telah ditetapkan (Nursalam, 2013). Desain penelitian yang digunakan adalah true eksperimental desain dengan pendekatan posttest with control group peneliti membandingkan hasil dari setiap perlakuan pada variabel independent yaitu konsentrasi ekstrak daun sirih hijau yang dimanipulasi untuk mengetahui keefektifan dari perlakuan yang diberikan. Yaitu untuk mengetahui konsentrasi paling efektif dalam pengujian daya hambat aktivitas antibakteri daun sirih hijau.

3.2 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2019 - Januari 2020 dengan tempat penelitian:

- 1) Laboratorium Mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Malang untuk pengujian daya hambat aktivitas antibakteri
- 2) Laboratorium Kimia Poltekkes Kemenkes Malang untuk pengujian kualitatif senyawa metabolit sekunder (Flavonoid, Saponin, Polifenol, dan Minyak atsiri)

- 3) Laboratorium Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maliki Ibrahim Malang untuk lanjutan proses ekstraksi yaitu pemekatan ekstrak menggunakan instrument *Evaporator rotary vacuum*
- 4) Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk peremajaan kultur bakteri uji *Staphylococcus aureus*.

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan simplia dan untuk ekstraksi maserasi antara lain: pisau, Loyang atau wadah peniris, oven, mesh No 50, grinder, gelas kimia, gelas arloji, gelas ukur, Erlenmeyer, spatula, batang pengaduk, kain saring dan *evaporator rotary vacuum*, neraca analitik.

Alat-alat yang digunakan dalam uji bakteri antara lain: mikropipet, kawat ose, lampu spiritus, LAF (*Laminar Air Flow*), incubator, cawan petri, pinset, paper disk, jangka sorong, autoclave, tabung reaksi, pemanas, mortar dan alu, rak tabung reaksi.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

Daun sirih (*Piper betle L.*), Bakteri *Staphylococcus aureus*, Pelarut etanol 96% (teknis), Media BHI-B (*Brain Heart Infussion-Borth*), Media NA (*Nutrient Agar*), DMSO, Mc Farland 1.0, Aquadest Steril, Alumunium foil, Nacl fisiologis, Antibiotic ampicillin, Pereaksi mayer, dragendroff, wagner, Besi (III) Klorida, serbuk Magneisum, Kloroform, ammonia, asam sulfat 2N, HCL 2N.

3.4 Sampel Penelitian

3.4.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah bagian populasi diteliti dan sebagian jumlah karakteristik yang dimiliki oleh populasi (Hidayat, 2007). Sampel dalam penelitian ini adalah bagian daun dari tumbuhan sirih hijau dengan lebar daun 8-10 cm yang diperoleh dari daerah kota Batu Jawa Timur.

Teknik sampling dalam penelitian ini menggunakan teknik *purposive sampling* yaitu teknik penetapan sampel dengan cara memilih sampel diantara populasi sesuai dengan yang dikehendaki peneliti (tujuan/masalah dalam penelitian), sehingga sampel tersebut dapat mewakili karakteristik populasi yang telah dikenal sebelumnya (Nursalam, 2013).

3.5 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.5.1 Variabel penelitian

Variabel merupakan ukuran atau ciri yang dimiliki oleh anggota-anggota suatu kelompok yang berbeda dengan yang dimiliki oleh kelompok lain (Notoadmodjo, 2002).

1. Variabel bebas (*Independent variable*)

Variabel bebas yaitu variabel yang dimanipulasi oleh peneliti untuk menciptakan suatu dampak pada variabel terikat (*Dependent variable*) (Setiadi, 2013)

Dalam penelitian ini yang menjadi variabel bebas adalah konsentrasi ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L.*).

2. Variabel Terikat (Dependent Variable)

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas (Setiadi, 2013)

Dalam penelitian ini yang menjadi variabel terikat adalah luas diameter daerah hambat (DDH) dari Bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.5.2 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional penelitian menurut Sugiyono (2015) adalah suatu atribut atau sifat atau nilai dari objek atau kegiatan yang memiliki variasi tertentu yang telah ditetapkan oleh peneliti atau dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya. Dari penelitian yang dilakukan dapat dirumuskan definisi operasionalnya sebagai berikut:

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
Konsentrasi ekstrak daun sirih hijau (<i>Piper betle L.</i>).	cairan pekat hasil dari isolasi suatu tanaman.	-	-	Rasio
Luas daerah diameter hambat (DDH) dari Bakteri <i>Staphylococcus Aureus</i>	Daerah bening disekitar cakram yang terbentuk dari aktivitas suatu zat yang menggambarkan tingkat sensitivitas	Jangka sorong	Tingkatan luas diameter daerah hambat (DDH) yang akan terbentuk mempunyai respon hambat yang digolongkan sebagai berikut: < 3 mm lemah; 3-6 mm sedang; > 6 mm kuat	Interval

3.6 Metode Penelitian (Prosedur Penelitian)

3.6.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang disterilkan antara lain: cawan petri, tabung reaksi, pipet ukur, tip mikro pipet, gelas arloji, spatula, gelas beaker, pinset. Sterilisasi alat dengan cara sterilisasi panas menggunakan alat oven pada suhu 180⁰ C selama 1 jam.

3.6.2 Pembuatan sampel Daun Sirih (*Peper betle L*)

Alat dan bahan:

a. Alat:

pisau, tlenan, baskom peniris, grinder, mesh atau ayakan, dan plastic klip.

b. Bahan:

Daun sirih hijau

Sampel Daun sirih hijau (*Piper betle L*) di petik dengan kriteria yang dipilih yaitu daun yang berwarna hijau tua, dengan lebar kisaran 8-10 cm. Selanjutnya daun sirih di cuci sampai bersih dilanjutkan dengan proses perajangan dan pengeringan dengan oven suhu 37⁰ C sampai warna daun berubah menjadi kecoklatan dan akan menimbulkan suara bergemerisik saat di remas. Simplisia daun sirih hijau di haluskan dengan grinder dan diayak dengan Mesh No.50 untuk menseragamkan ukuran serbuk daun sirih hijau.

3.6.3 Ekstraksi Sampel

Alat dan bahan:

a. Alat

gelas arloji, sendok tanduk, gelas ukur, toples kaca, batang pengaduk

b. Bahan:

Serbuk simplisia daun sirih hijau, etanol 96%

Serbuk simplisia daun sirih hijau kering ditimbang 200 gram dilarutkan dengan pelarut etanol 96% (teknis) 2000 ml dengan perbandingan 1:10, maserasi dilakukan selama 3 hari dan dilakukan pengadukan setiap harinya, maserat hasil penyaringan saat proses maserasi di pekatkan dengan *Rotary Evaporator vacum*. Ditimbang ekstrak yang diperoleh.

3.6.4 Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder

1) Uji Senyawa Flavonoid

Alat dan bahan

a. Alat:

Tabung reaksi, gelas arloji, spatula, batang pengaduk, neraca analitik,

b. Bahan:

Ekstrak daun sirih hijau, serbuk mg, HCL pekat, akuadest dan kertas saring

Uji flavonoid dilakukan menggunakan metode Wilstatter. Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L*) ditimbang sebanyak 1 gram dilarutkan dalam pelarut DMSO 20% 10 ml. larutan ekstrak diambil sebanyak 1 mL ditambahkan 0,05 g serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Harborne, 1987).

2) Uji Senyawa Alkaloid

Alat dan bahan

c. Alat:

Tabung reaksi, gelas arloji, spatula, batang pengaduk, neraca analitik,

d. Bahan:

Ekstrak daun sirih hijau, kloroform, ammonia, asam sulfat 2N, pereaksi mayer, pereaksi dragendorfff, pereaksi wagner, kertas saring

Pengujian dilakukan dengan menimbang sebanyak 4 gram ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L*) dilarutkan secukupnya dengan kloroform di haluskan sampai terbentuk larutan yang homogeny. Menambahkan 10 ml ammonia dan menambahkan 10 ml kloroform kemudian larutan disaring, filtrate hasil penyaringan di tambahkan dengan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes. Selanjutnya mengocok filtrate dengan teratur, membiarkan beberapa saat sampai larutan membentuk 3 lapisan fasa. Kemudian membagi dan memisahkan fasa ke dalam tiga tabung reaksi. Tahap selanjutnya dilakukan pengujian menggunakan pereaksi mayer, pereaksi dragendorfff, pereaksi wagner. Terbentuknya endapat ketika diberikan masing masing menunjukkan hasil positif adanya senyawa alkaloid. Pada pereaksi mayer akan terbentuk endapan berwarna putih, Pada pereaksi dragendroff akan terbentuk endapan berwarna

merah jingga, Pada pereaksi wagner akan terbentuk endapan berwarna merah kecoklatan (Harborne, 1987).

3) Uji Senyawa Saponin

Alat dan bahan

a. Alat:

Tabung reaksi, gelas arloji, spatula, batang pengaduk, neraca analitik, penggaris

b. Bahan:

Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L*), aquadest, HCL 2N

Pengujian saponin dilakukan dengan menimbang ekstrak daun sirih sebanyak 2 gram kemudian kemudian dilarutkan dalam 10 ml akuadest dalam tabung reaksi. Kemudian dikocok dengan kuat hingga timbul buih dalam larutan dibiarkan selama 10 detik. Saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih setinggi 1-10 cm yang stabil selama kurang dari 10 menit. Pada penambahan 1 tetes HCL 2N buih tidak hilang (Depkes RI, 1995).

4) Uji Senyawa Polifenol

Alat dan bahan

a. Alat:

Tabung reaksi, gelas arloji, spatula, batang pengaduk, neraca analitik,

b. Bahan:

Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L*), aquadest, larutan besi III klorida 10 %

Pengujian senyawa polifenol dilakukan dengan melarutkan 1 gram ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L*) dengan 1 ml akuadest didalam tabung reaksi sampai terbentuk larutan yang homogen, kemudian larutan ekstrak di reaksi dengan larutan besi III klorida. Jika terbentuk warna biru tua atau hitam maka positif mengandung senyawa polifenol (Robinson, 1991).

5) Uji Miyak Atsiri

a. Alat:

Cawan porselin, penangas air

b. Bahan:

Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L*), etanol

Pengujian minyak atsiri dilakukan dengan melarutkan ekstrakdaun sirih hijau (*Piper betle L*) dengan pelarut etanol kemudia larutan di uapkan diatas cawan porselin hingga diperoleh residu. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya aroma aromatic (khas) dari residu (Gunawan dan Mulyani, 2004).

3.6.5 Pembuatan Medium

1) Pembuatan media Na

Alat dan bahan:

a. Alat:

Tabung reaksi, gelas arloji, spatula, cawan petri, pipet ukur, gelas beaker, pemanas, kapas, kertas paying coklat, benang putih

b. Bahan:

Media NA (Nutrient Agar), aquadest

Pembuatan menia NA (Nutrient Agar) dilakukan dengan menimbang serbuk Na sebanyak 2,3 gram dan dilarutkan dengan aquades 100 ml, Memanaskan sampai mendidih dan diaduk sampai larutan menjadi homogeny, memasukkan larutan Na ke dalam tabung reaksi sebanyak 20 ml masing-masing tabung, selanjutnya Media Na disterilisasi dengan autoclave tekanan 1,5 psi selama 15 menit. Kemudia menuangkan media Na kedalam cawan petri. Membiarkan media NA tersebut Selama 24 jam pada suhu kamar sampai memadat di letakkan di dalam LAF agar menghindari terjadi kontaminasi.

2) Pembuatan Media BHI-B (Brain Heart Infucion-Broth)

Alat dan bahan:

a. Alat:

Tabung reaksi, gelas arloji, spatula, cawan petri, pipet ukur, gelas beaker, pemanas, kapas, kertas payung coklat, benang putih

b. Bahan:

Media BHI-B (Brain Heart Infucion-Broth, aquadest

Pembuatan media BHI-B (Brain Heart Infucion-Broth) dilakukan dengan menimbang serbuk BHI-B sebanyak 1,83 gram dan dilarutkan dengan aquades 50 ml, Memanaskan sampai mendidih dan diaduk sampai larutan menjadi homogen, memasukkan larutan BHI-B ke dalam tabung reaksi sebanyak 20 ml masing-masing tabung, setelah itu Media BHI-B disterilisasi dengan autoclave tekanan 1,5 psi selama 15 menit.

3.6.6 Uji Daya Hambat Aktivitas Bakteri

Alat dan Bahan:

a. Alat:

Mikropipet, tabung reaksi, cawan petri, pinset, MC. Farland 1.0 (10^8 CFU/ml), incubator, LAF

b. Bahan:

Nacl fisiologis, DMSO, media NA, media BHI-B, antibiotic amoxicillin, ekstrak daun sirih hijau, kertas saring

Tahapan-tahapan pengujian daya aktivitas antibakteri antara lain sebagai berikut:

1) Pembuatan suspensi bakteri Staphylococcus Aureus

Hasil peremajaan bakteri S. Aureus pada media BHI-B dipipet sebanyak 400 μ l dimasukkan ke dalam larutan NaCL Fisiologis 0,85% kemudian disamakan kekeruhannya dengan Mc Farland I (10^8 CFU/ml)

2) Pembuatan cakram antibiotik

a) Ekstrak daun sirih hijau dibuat larutan uji berbagai variasi konsentrasi yang dibuat dengan rasio konsentrasi 0,1mg/10ml; 0,3mg/10ml; 0,5mg/10ml; 0,7mg/10ml; dan 1mg/10ml dengan

pelarut DMSO 20%, kertas saring yang berfungsi sebagai cakram direndam dalam larutan ekstrak daun sirih hijau tersebut selama 10 menit.

b) Pembuatan larutan DMSO (*Dimetil Sulfoksida*)

Larutan DMSO dibuat dengan melakukan pengenceran dari konsentrasi 100% kedalam konsentrasi 20% dalam pelarut aquadest dalam labu takar 50 ml.

3) Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan kertas cakram yang terbuat dari kertas saring. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dalam NaCl fisiologis di usapkan ke dalam media NA dalam cawan petri dan diratakan. Penanaman kertas cakram yang telah berisi larutan uji diaplikasikan pada media yang telah berisi bakteri. Digunakan Kontrol positif berupa cakram antibiotic amoxicillin dengan konsentrasi 10 ppm sebagai pembandingan.

Preinkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 20 menit kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam. tujuan dilakukan pre inkubasi yaitu agar ekstrak daun sirih dapat terdifusi terlebih dahulu pada kertas cakram sebelum diinkubasi. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali pengulangan.

3.7 Pengolahan, penyajian dan Analisis

Luas Zona Hambat

Hasil uji berupa luas daerah bening yang di diukur dengan jangka sorong dan dihitung luas diameter daerah hambat (DDH) menggunakan rumus metode sumuran. Dari data yang diperoleh disajikan dalam bentuk diagram batang. Secara kuantitatif data hasil penelitian dianalisis dengan uji statistic *One Way Anova* menggunakan SPSS.