

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan jenis metode eksperimen. Pada penelitian ini, peneliti melakukan penelitian pada ekstrak daun binahong dan ekstrak daun sirih yang diekstraksi dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi. Kedua ekstrak tersebut diperlakukan dengan beberapa konsentrasi uji yang akan diukur luas daya hambatnya pada bakteri uji *Propionibacterium acnes*. Sehingga diketahui efektivitas antibakteri pada kedua ekstrak tersebut pada pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – Mei 2024 dengan tempat penelitian:

- 1) Laboratorium Farmakologi dan Fitokimia Poltekkes Kemenkes Malang untuk proses ekstraksi
- 2) Laboratorium Mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Malang untuk pengujian daya hambat aktivitas antibakteri

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan simplisia dan ekstraksi maserasi, yaitu pisau, telenan, loyang, oven, grinder, mesh No. 50, beaker glass, gelas ukur, toples maserasi, batang pengaduk, gelas arloji, spatula, batang pengaduk, neraca analitik, cawan penguap, *rotary evaporator*, *water bath*.

Alat-alat yang digunakan untuk uji daya hambat aktivitas bakteri yaitu cawan petri, kapas, bunsen, ose bulat, cotton swab, tabung reaksi dan rak tabung reaksi, gelas arloji, pipet ukur, *hot plate*, mikropipet, tip mikropipet, mortar dan alu, kertas cakram, pinset, *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator, autoklaf, *vortex*, dan kulkas.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu, daun sirih (*Piper betle* L.), daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis), aquadest, etanol 96%, bakteri *Propionibacterium acnes*, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), McFarland 0.5, aluminium foil, antibiotik klinamisin, NaCl larutan fisiologis (0,9% NaCl), DMSO (Dimetil Sulfoksida).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dan konsentrasi ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).

3.4.2 Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu luas diameter daerah hambat (DDH) dari bakteri *Propionibacterium acnes*.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel III.1 Definisi Operasional Variabel

No	Nama Variabel	Definisi	Metode dan Alat pengukuran	Hasil ukur	Skala
1.	Konsentrasi ekstrak daun sirih hijau (<i>Piper betle</i> L.) dan ekstrak daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis)	Sediaan cair dibuat dengan menyari simplisia daun sirih (<i>Piper betle</i> L.) dan daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis) menurut cara yang dikocok, diluar pengaruh pengaruh Cahaya matahari langsung (Departemen Kesehatan, 2017). Dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%	Metode maserasi	Randemen ekstrak dengan syarat minimal randemen ekstrak daun binahong 11,9% dan minimal randemen ekstrak daun sirih hijau 5%	Rasio

2.	Luas daerah diameter hambatan (DDH) dari Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	Daerah bening disekitar cakram yang terbentuk dari aktivitas suatu zat yang menggambarkan tingkat sensitivitas	Metode difusi cakram kirby bauer dan alat ukur menggunakan jangka sorong dan penggaris	Tingkat luas daerah hambatan (DDH) yang akan terbentuk mempunyai respon hambatan yang digolongkan sebagai berikut : <5 mm lemah; 5-10 mm sedang; >10-20 mm kuat; >20 kuat	Interval
----	---	--	--	---	----------

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang disterilkan yaitu : tabung reaksi, cawan petri, tip mikropipet, pipet ukur, beaker glass, pinset, cakram, dan erlenmeyer. Alat tersebut disterilkan menggunakan oven selama 1 jam dengan suhu 170°C.

3.6.2 Pembuatan Simplisia Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) dan Daun Binahong (*Anredera cordifolia (Ten.) Steenis*)

Daun sirih hijau dan daun binahong dicuci hingga bersih kemudian daun sirih tersebut dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 60°C hingga kering dan berubah warna menjadi kecoklatan hingga coklat. Simplisia daun sirih hijau dihaluskan dengan menggunakan grinder dan diayak menggunakan mesh No. 50 untuk menyeragamkan ukuran serbuk daun sirih hijau.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Sampel Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.)

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Serbuk simplisia daun sirih hijau menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan (1 : 10). Maserasi dilakukan selama 3 hari, setelah diperoleh maserat hasil penyaringan kemudian ekstrak dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan ekstrak diuapkan menggunakan *water bath* (Departemen Kesehatan, 2017).

3.6.4 Pembuatan Ekstrak Sampel Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Serbuk simplisia daun binahong menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan (1 : 10). Maserasi dilakukan selama 3 hari, setelah diperoleh maserat hasil penyaringan kemudian ekstrak dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan ekstrak diuapkan menggunakan *water bath* (Departemen Kesehatan, 2017).

3.6.5 Pembuatan Media MHA (Mueller Hinton Agar)

Pembuatan media MHA (Mueller Hinton Agar) dilakukan dengan menimbang serbuk MHA sebanyak 4,56 gram dan dilarutkan dengan aquadest 120 mL. Media dipanaskan hingga mendidih dan diaduk hingga homogen. Kemudian media MHA disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C. Media MHA dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL dan dilakukan di dalam LAF (Laminar Air Flow). Media MHA ditunggu hingga memadat.

3.6.6 Uji Daya Hambat Aktivitas Bakteri

1) Pembuatan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes*

Hasil biakan bakteri *Propionibacterium acnes* ditambahkan NaCl 0,9% dan suspensi dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl 0,9%. Kekeruhan biakan bakteri ekuivalen disamakan dengan standar McFarland 0,5.

2) Pembuatan DMSO 10% (Dimetil Sulfoksida)

Larutan DMSO dibuat dengan mengencerkan dari konsentrasi 100% ke dalam konsentrasi 10% dalam pelarut aquadest dalam labu takar 100 mL. Kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C.

3) Pembuatan konsentrasi ekstrak dan pembuatan cakram antibiotik

Ekstrak etanol daun sirih dan daun binahong dibuat dengan rasio konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% menggunakan pelarut DMSO 10%.

Konsentrasi 20% : 1 g ekstrak + 5 mL DMSO 10 %

Konsentrasi 40% : 2 g ekstrak + 5 mL DMSO 10 %

Konsentrasi 60% : 3 g ekstrak + 5 mL DMSO 10 %

Konsentrasi 80% : 4 g ekstrak + 5 mL DMSO 10 %

Konsentrasi 100% : 5 g ekstrak + 5 mL DMSO 10%

Larutan di *vortex* dan dibiarkan selama 30 menit, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri yang telah diberi kertas disk steril dan direndam selama 15 menit hingga kertas disk menjadi jenuh (Cappucino & Sherman, 2001).

4) Uji aktivitas antibakteri

Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar (Kirby-Bauer) menggunakan kertas cakram. Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* dalam NaCl 0,9% diinokulasikan menggunakan *cotton swab* pada media MHA dalam cawan petri, kemudian didiamkan selama 3 menit – 5 menit agar kondisi mengering. Kertas cakram yang telah direndam pada ekstrak dengan konsentrasi tertentu dan kontrol positif klindamisin dilakukan penanaman pada media MHA yang telah diinokulasi dengan bakteri. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam ([BSN] Badan Standarisasi Indonesia, 2016; WHO, 2012).

3.7 Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data

Hasil uji berupa luas daerah bening yang diukur dengan jangka sorong dan dihitung luas diameter daerah hambat (DDH) dan disajikan dalam bentuk tabel. Secara kuantitatif data hasil penelitian dianalisis dengan uji statistik *One Way Anova* menggunakan SPSS.

- Rumus perhitungan diameter daya hambat

$$= \frac{(D_v - D_s) + (D_H - D_s)}{2}$$

D_v = Diameter daerah hambat vertikal

D_s = Diameter cakram

D_H = Diameter daerah hambat horizontal

- Penyajian tabel

Konsentrasi	Diameter Daya Hambat (mm)			Rata-rata (mm)
	1	2	3	
20%				
40%				
60%				
80%				
100%				