

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menerapkan rancangan setiap sampel menganalisis aktivitas *Streptococcus pyogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa* bakteri ekstrak daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk.)). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96% .

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu ekstrak daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk.)) dari hasil meserasi dengan perbedaan pelarut yang digunakan yaitu etanol . Tanaman terubuk ini diambil di Kecamatan Tegalwaru Loji Kabupaten Karawang, Provinsi Jawa Barat.

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ekstrak etanol 96% dari daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk.)), antibiotik kloramfenikol dengan konsentrasi 30 ppm sebagai kontrol positif, aquadest steril sebagai kontrol negatif, serta larutan NaCl fisiologis 0,9% untuk mengencerkan suspensi bakteri. Media yang digunakan adalah Mueller Hinton Agar (MHA) sebagai medium untuk pertumbuhan bakteri uji. Bakteri yang digunakan adalah kultur murni dari *Streptococcus pyogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

3.3.2 Alat

Alat yang akan digunakan pada penelitian ini di antaranya yaitu beakers glass (Pyrex), gelas ukur (Iwaki), batang pengaduk, kaca arloji (Pyrex), pipet tetes, mortar dan stamper, sudip, kertas perkamen, cawan porselen, labu ukur (Iwaki), tabung reaksi

(Iwaki), neraca analitik, aluminium foil, kertas saring, penangas air, corong glass, obyek glass, water bath, rotary evaporator, pipet mikro (micropipette), inkubator, laminar air flow (LAF) dan spreader.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

3.4.1 Tempat Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Instrumental Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang

3.4.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dimulai dari Februari 2025 – Juli 2025

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk.)) dengan variasi konsentrasi 6,25 ppm, 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini yaitu skrinning fitokimia dan uji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 96% daun terubuk yang diukur melalui zona hambat menggunakan metode difusi, serta nilai Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal Concentration (MBC) dengan metode dilusi terhadap dua jenis bakteri yaitu *Streptococcus pyogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

3.5.3 Definisi Operasional Variabel

Berikut hasil table definisi operasional variable yang terdapat dalam penelitian

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1.	Ekstrak etanol 96% daun terub u	Ekstrak yang diperoleh dari simplisia daun Saccharum spontaneum var. edulis menggunakan pelarut etanol 96% dengan metodemaseras	Timbangan analitik, rotary evaporator, pipet ukur	-	Massa ekstrak (g) dan keterangan bentuk (kental/padat)
2.	Konsentrasi ekstrak	Tingkat konsentrasi ekstrak yang diuji yaitu 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ppm	Pipet mikropipet, labu ukur, neraca untuk menimbang padatan jika diperlukan	Rasio (ppm)	Nilai konsentrasi dalam ppm (6,25–100 ppm)
Variabel Terikat					
3.	Zona hambat (metode difusi)	Diameter area bebas tumbuh bakteri di sekitar cakram/cekungan yang mengandung ekstrak setelah inkubasi pada MHA	Mistar/jorong atau jangka sorong; cawan petri; penggaris m	Rasio (mm)	Besar diameter zona hambat (mm); jika tidak ada: tercatat “_” atau “tidak terdeteksi”

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi

Identifikasi tumbuhan dilakukan dengan membandingkan tumbuhan dengan tumbuhan lain yang identitasnya sudah diketahui. Tujuan dari penentuan ini adalah untuk memperoleh identitas yang jelas dari tumbuhan yang sedang dipelajari dan untuk menghindari kesalahan dalam mengumpulkan bahan utama serta sampel yang digunakan dalam penelitian (Diniatik, 2015). Determinasi tumbuhan terubuk dilaksanakan di laboratorium Universitas Padjadjaran Sumedang- Indonesia untuk diidentifikasi kebenaran identitas tanamannya.

3.6.2 Penyiapan Sampel

Proses membuat simplisia dari tumbuhan terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk.)) yang dipanen sebelum pukul 10 pagi melibatkan beberapa tahap, yaitu pengumpulan bahan, sortasi basah, pembersihan, dan pemotongan untuk mendapatkan bahan yang berkualitas. Kemudian bahan tersebut dijemur di bawah sinar matahari sambil ditutupi dengan kain hitam. Setelah kering, daun dipisahkan dari benda-benda asing, lalu dihaluskan dan disimpan di tempat yang kering (Munadi et al, 2023).

3.6.3 Eksaksis

Ekstraksi daun terubuk dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut, dengan rasio bahan terhadap pelarut sebesar 1:7. Prosedur ini terdiri dari tiga tahap berturut-turut, masing-masing melibatkan perendaman selama 24 jam pada suhu kamar dengan pengadukan sesekali, sehingga total waktu ekstraksi mencapai 72 jam. Setelah setiap tahap perendaman, larutan disaring menggunakan kertas saring. Proses ekstraksi dilanjutkan hingga larutan menjadi bening,

yang menandakan bahwa senyawa aktif telah diekstraksi secara maksimal. Semua ekstrak yang diperoleh kemudian digabungkan dan dikonsentrasikan menggunakan rotary vacuum evaporator hingga menghasilkan ekstrak kental, dan rendemen akhir dihitung (Aulia *et al*, 2023). Rendemen ekstrak di hitung menggunakan rumus berikut :

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

3.7 Penapisan Fitokimia

3.7.1 Uji Alkaloid

Untuk menguji adanya senyawa alkaloid, ekstrak sampel dibasahi dengan amonia encer (NH_3) dan dihaluskan. Setelah itu, ditambahkan 1 mL kloroform (CHCl_3) sambil terus digerus. Filtrat yang dihasilkan kemudian disaring dan dicampurkan dengan 5 mL larutan HCl 2N. Lapisan asam yang terbentuk di bedakan dan dibagi ke dalam 2 tabung reaksi. Pada tabung 1, ditambahkan tiga tetes pereaksi Dragendorff. Apabila terbentuk endapan berwarna jingga, hal ini mengindikasikan keberadaan alkaloid. Sementara itu, pada tabung kedua ditambahkan tiga tetes pereaksi Mayer. Endapan berwarna putih yang terbentuk pada tabung ini juga secara spesifik menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid (Aulia *et al.*, 2023).

3.7.2 Uji Flavanoid

Untuk mendeteksi senyawa flavonoid, ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan 5 mL etanol dan dipanaskan selama 5 menit. Setelah itu, 10 tetes asam klorida (HCl) pekat dan 0,2 gram serbuk magnesium (Mg) ditambahkan. Munculnya warna merah kehitaman pada larutan mengindikasikan adanya flavonoid dalam sampel

3.7.3 Uji Saponin

Untuk mendeteksi senyawa saponin, ekstrak sampel dilarutkan dalam 10 mL akuades, lalu dikocok selama 1 menit. Setelah itu, larutan didiamkan selama 10 menit untuk mengamati terbentuknya buih atau busa. Jika buih atau busa yang terbentuk stabil selama 10 menit dan tidak hilang setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N, maka hal tersebut menunjukkan adanya saponin (Najib *et al*, 2018).

3.7.4 Uji Tanin

Untuk mendeteksi senyawa tanin, ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan 5 tetes larutan gelatin 1%. Jika terbentuk endapan berwarna putih, hal itu menunjukkan adanya tannin (Najib *et al*, 2018).

3.7.5 Uji Fenolik

Untuk menguji keberadaan senyawa fenolik, ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan 10 tetes larutan FeCl_3 1%. Munculnya warna hitam atau hijau pada larutan tersebut menjadi indikasi positif bahwa sampel mengandung fenolik. (Aulia *et al.*, 2023).

3.7.6 Uji Kuinon

Untuk menguji keberadaan senyawa kuinon, 20 mL ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, ditambahkan larutan KOH 5%. Jika larutan berubah warna menjadi kuning atau merah, hal itu mengindikasikan bahwa sampel tersebut mengandung kuinon (Aulia *et al.*, 2023).

3.7.7 Uji Monoterpenoid dan Sesquiterpenoid

Untuk mendeteksi senyawa monoterpenoid atau sesquiterpenoid, ekstrak sampel dilarutkan dengan eter, Larutan ini kemudian digerus, disaring, dan diuapkan hingga kering. Setelah itu, ditambahkan

tetes vanillin 10% dalam H_2SO_4 pekat. Jika terbentuk warna ungu, itu menunjukkan adanya monoterpenoid atau sesquiterpenoid (Ega Nirmala *et al.*, 2022).

3.7.8 Uji Terpenoid dan Steroid

Untuk mendeteksi senyawa terpenoid dan steroid, ekstrak sampel ditambahkan dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Jika larutan berubah menjadi biru tua, ini mengindikasikan adanya senyawa terpenoid. Sedangkan, jika terbentuk warna hijau, hal ini menunjukkan adanya senyawa steroid. (Najib *et al.*, 2018).

3.7.9 Standarisasi Spesifik Identitas Ekstrak

a. Identitas Ekstrak

Ekstraksi parameter identitas dilakukan untuk memastikan identitas objektif dari nama tumbuhan. Deskripsi nomenklatur mencakup nama ekstrak, nama latin tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan, serta nama Indonesia dari tumbuhan tersebut (Najib *et al.*, 2018).

b. Organoleptis

Uji organoleptis adalah tahap pertama yang dilakukan dengan sederhana dan se objektif mungkin. Pengujian ini dilakukan untuk mengamati bentuk, warna, bau, dan rasa (Najib *et al.*, 2018).

3.8 Steril alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian sebelumnya telah disterilkan dengan cara dibungkus menggunakan kertas lalu dimasukkan ke dalam autoclave selama 20 menit pada suhu 121 derajat Celsius dengan tekanan 15 atm.

3.9 Pembuatan Media Miring

Pembuatan media agar miring dilakukan dengan cara melarutkan 50 gram NA dalam 500 ml aquades di dalam erlenmeyer, lalu ditutup menggunakan aluminium foil. Campuran tersebut dihomogenkan dengan menggunakan stirrer di atas penangas air hingga mendidih. Setelah itu, media di sterilkan ke dalam autoclave dengan suhu 121 derajat Celsius selama 15 menit dan tekanan 1 atm. Setelah selesai, media didinginkan.

3.10 Inkubasi Bakteri

Pembuatan media agar miring dilakukan dengan cara melarutkan 50 gram NA dalam 500 ml aquades di dalam erlenmeyer, lalu ditutup menggunakan aluminium foil. Campuran tersebut dihomogenkan dengan menggunakan stirrer di atas penangas air hingga mendidih. Setelah itu, media di sterilkan ke dalam autoclave dengan suhu 121 derajat Celsius selama 15 menit dan tekanan 1 atm. Setelah selesai, media didinginkan.

3.11 Pengukuran Zona Hambat Estrak Terubuk

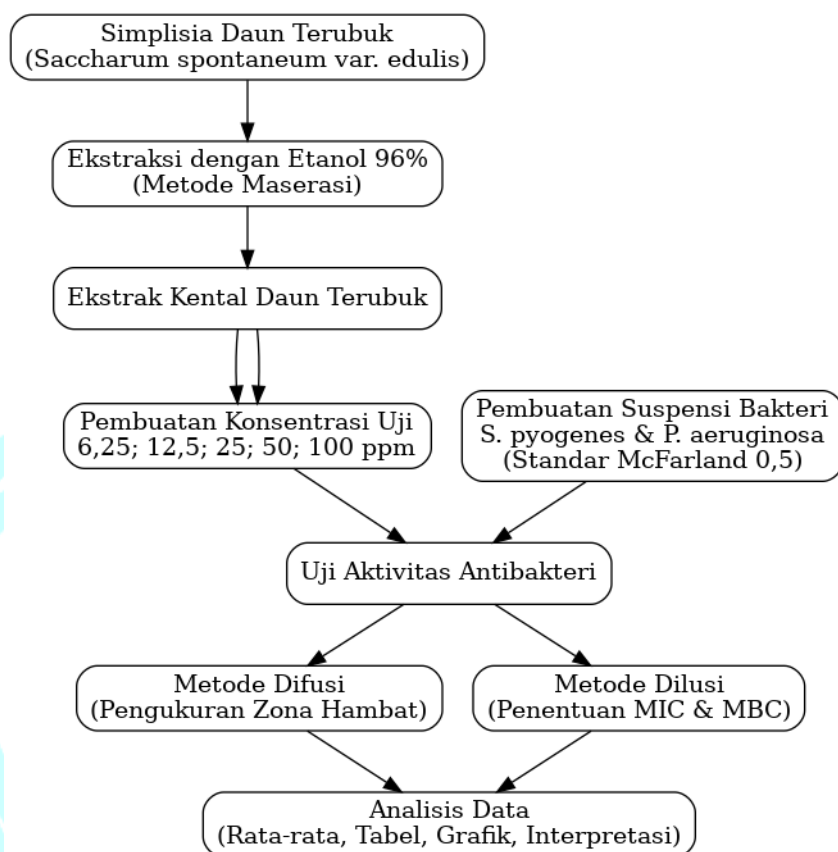
Pengukuran zona hambat dilakukan untuk mengetahui seberapa efektif ekstrak etanol 96% daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji yaitu *Streptococcus pyogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Pengujian dilakukan dengan metode difusi cakram (disk diffusion) dan dilakukan tiga kali pengulangan. Setelah bakteri diinkubasi, ukuran zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm). Hasil pengukuran kemudian dicatat sebagai rata-rata dari beberapa pengukuran dan dianalisis secara deskriptif. media

3.11 Analisis Data

Pengolahan data diameter zona hambat dari ekstrak etanol 96% daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk.)) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa* dianalisis secara deskriptif dengan menghitung rata-rata dari tiga kali pengulangan. Hasil dinyatakan dalam bentuk tabel maupun grafik. Untuk menentukan nilai Minimum Inhibitory Concentration (MIC), digunakan konsentrasi ekstrak terendah yang tidak menyebabkan keruh pada media Nutrient Broth. Sementara itu, Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ditentukan dari konsentrasi ekstrak terendah yang tidak memperlihatkan pertumbuhan koloni pada media Mueller Hinton Agar. Kekuatan daya hambat diinterpretasikan berdasarkan kriteria Davis dan Stout (1971), yaitu zona hambat dengan diameter lebih dari 20 mm dianggap kuat. Hasil juga dibandingkan dengan kontrol positif (kloramfenikol 30 ppm) dan kontrol negatif (akuades steril).

3.12 Diagram Alir Penelitian

KARAWANG



Gambar 3. 1 Diagram Penelitian

KARAWANG