

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari sampai April 2025 bertempat di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Program studi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu oven (*Yenako*), *autoklaf*, inkubator (*Mammert IN 55*), *laminar air flow* (LAF), sonikator (*Ultrasonik Cleaner 220 V*), *moisture analyzer* 220VAC3A.50Hz, spektrofotometer UV-Vis, *waterbath*, nerca analitik, kompor listrik (*Maspion*), blender (*Philips*), seperangkat alat soxhletasi, bejana maserasi, seperangkat alat gelas, mikropipet (*Dragonlab*), bunsen, rak tabung reaksi, cawan penguap, labu spirtus, termometer, krus porselin, cawan petri, sendok tanduk, pipet tetes, batang L, pinset dan jarum ose.

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini yaitu rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpuracens* Blume) yang diperoleh dari Wisata Kesehatan Jamu (WKJ) Kalibakung Kecamatan Balapulang Kabupaten Tegal, etanol 70%, etanol 96%, DMSO 5%, bakteri *Propionibacterium acnes*, *Nutrien Agar*, antibiotik klindamisin 1%, akuades, HCl pekat, HCl 2N, pereaksi dragendroff, pereaksi Liebermann-Burchard, FeCl₃ 1%, NaCl 0,9%, BaCl 1%, H₂SO₄ 1%, serbuk Mg, spirtus, kertas cakram, kertas saring, kapas, dan benang jagung.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dan dilakukan untuk mengetahui metode ekstraksi yang paling efektif terhadap aktivitas antibakteri ekstrak temu blenyeh berdasarkan faktor-faktor berikut:

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu metode ekstraksi etanol rimpang temu blenyeh yaitu maserasi, soxhletasi, dan sonikasi.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu aktivitas antibakteri ekstrak rimpang temu blenyeh terhadap *Propionibacterium acnes*.

3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu bagian tanaman yang digunakan, volume dan jenis pelarut, waktu ekstraksi dan suhu ekstraksi, jenis bakteri, suhu inkubasi bakteri, metode pengujian aktivitas antibakteri.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan di laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi. Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) yang digunakan.

3.4.2 Preparasi Sampel

Temu blenyeh yang telah diperoleh dilakukan sortasi basah, lalu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran pada rimpang. Selanjutnya potong temu blenyeh menjadi ukuran yang lebih kecil dengan pisau. Letakkan temu blenyeh yang sudah berukuran kecil di atas nampan

dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 5 jam. Kemudian dilakukan sortasi kering pada sampel dan haluskan menggunakan blender untuk selanjutnya dilakukan proses ekstraksi (Haryani et al., 2021).

3.4.3 Persiapan Ekstrak

a. Ekstraksi Maserasi

Sebanyak 150 g simplisia rimpang temu blenyeh dimaserasi dalam 1500 mL etanol 96% (1:10) menggunakan bejana kaca pada suhu ruang. Ekstraksi dilakukan selama 3 hari dengan pengadukan setiap 6 jam sekali. Kemudian, rendaman simplisia rimpang temu blenyeh disaring dengan menggunakan corong dan kertas saring hingga ampas terpisah. Hasil maserasi kemudian diuapkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 60°C hingga terbentuk ekstrak kental dari rimpang temu blenyeh (Suharsanti et al., 2020; Prasetyo & Vifta, 2022).

b. Ekstraksi Soxhletasi

Sebanyak 150 g rimpang temu blenyeh ditimbang, dibungkus dengan kertas saring, dan diikat pada kedua ujung dengan benang, lalu dimasukkan ke dalam tabung soxhlet. Hubungkan bagian bawah tabung soxhlet dengan labu alas bulat. Kemudian masukkan pelarut etanol 96% sebanyak 1500 mL (1:10) melalui tabung soxhlet. Bagian atas tabung soxhlet dihubungkan dengan pendingin balik yang telah dipasang di atas pemanas. Proses soxhletasi dilakukan hingga pelarut menjadi jernih atau sekitar 20 siklus. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 60°C hingga terbentuk ekstrak

kental dari rimpang temu blenyeh (Dela & Utami, 2022; Pargiyanti, 2019).

c. Ekstraksi Sonikasi

Sebanyak 150 g simplisia rimpang temu blenyeh, direndam dalam 1500 mL etanol 96% (1:10), kemudian dilakukan sonikasi selama 60 menit pada suhu 30°C. Frekuensi gelombang yang digunakan yaitu 35 kHz. Setelah proses sonikasi, filtrat dan residu dipisahkan dengan cara penyaringan. Ekstrak yang didapatkan kemudian diuapkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental etanol rimpang temu blenyeh (Kartika et al., 2024).

Hasil rendemen ekstrak rimpang temu blenyeh dapat dihitung dengan rumus (Wijaya et al., 2018):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{Bobot simplisia sebelum ekstraksi}} \times 100\%$$

3.4.4 Standardisasi Ekstrak

a. Organoleptis

Pengujian organoleptis ekstrak rimpang temu blenyeh dilakukan dengan penggunaan pancaindera mendiskripsikan bentuk, warna, bau, rasa (Handayani et al., 2023).

b. Susut Pengerinan

Ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1 g dan dimasukkan ke dalam botol timbang tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang, ekstrak diratakan dalam botol timbang, dengan menggoyangkan botol. Kemudian dimasukkan ke dalam oven, buka tutupnya, keringkan pada

suhu 105°C hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, biarkan botol timbang dalam keadaan tertutup mendingin dalam desikator hingga suhu kamar (Depkes RI, 2000).

Berikut rumus susut pengeringan:

$$\text{Bobot Pengeringan} = \frac{\text{Bobot 1} - \text{Bobot 2}}{\text{Bobot 1}} \times 100\%$$

Keterangan:

Bobot 1 = bobot ekstrak sebelum dilakukan pemanasan

Bobot 2 = bobot ekstrak sesudah dilakukan pemanasan

c. Kadar Air

Kadar air dilakukan dengan menimbang 0,5 g ekstrak dengan seksama, dimasukkan kedalam alat moisture analyzer yang telah disetarakan kemudian dibaca hasil yang tertera pada layar (Ramadhani et al., 2020).

3.4.5 Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Ekstrak rimpang temu blenyeh sebanyak 0,5 g ditambah 1 mL HCl 2N kemudian ditambahkan 2-3 tetes pereaksi dragendroff. Hasil positif menunjukkan warna endapan jingga merah hingga kecoklatan (Ramadhan et al., 2024).

b. Uji Flavonoid

Ekstrak rimpang temu blenyeh sebanyak 0,5 g ditambahkan 10 tetes HCl pekat dan 0,2 g serbuk Mg. Jika terjadi perubahan warna menjadi kuning, jingga atau merah berarti sampel mengandung flavonoid (Andasari et al., 2020).

c. Uji Tanin

Ekstrak rimpang temu blenyeh sebanyak 1 g dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%. Jika menghasilkan warna biru tua atau hijau kehitaman berarti sampel mengandung tanin (Firmansyah et al., 2022).

d. Uji Saponin

Ekstrak temu blenyeh sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas dan dikocok selama $\pm$ 10 detik. Hasil positif mengandung saponin jika terdapat busa dengan tinggi sekitar 1-10 cm dan tidak kurang dari 10 menit serta pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Emilia et al., 2023).

e. Uji Terpenoid

Ekstrak rimpang temu blenyeh sebanyak 0,5 g ditambahkan 3 tetes pereaksi Liebermann-Burchard, dibiarkan 15 menit. Jika timbul warna jingga kecoklatan menunjukkan adanya terpenoid (Tunny et al., 2021).

f. Uji Minyak Atsiri

Ekstrak rimpang temu blenyeh sebanyak 0,5 g diencerkan dengan 1 mL pelarut kemudian diuapkan di atas cawan porselen hingga diperoleh residu. Hasil positif mengandung minyak atsiri jika timbul bau khas yang dihasilkan oleh residu tersebut (Rukmini et al., 2020).

3.4.6 Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini, dicuci dan dikeringkan terlebih dahulu, kemudian disterilisasi. Tiga metode sterilisasi yang dilakukan yaitu dengan *autoclave*, membakar dengan api

dan etanol 70%. Alat yang disterilisasi dalam *autoclave* antara lain alat berbahan kaca (erlemeyer, gelas beker, tabung reaksi, cawan petri), tip, pinset, plastik, spatula serta medium. Alat dibungkus dengan kertas sebelum disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat yang tidak tahan terhadap panas tinggi seperti mikropipet disterilisasi dengan etanol 70%. Bahan logam (seperti jarum ose dan pinset) disterilisasi dengan cara dibakar dengan pijar api sampai warnanya merah (Ratu et al., 2022; Wulandari et al., 2021).

b. Pembuatan Media

1. Media Dasar

Pembuatan medium dasar dengan *Nutrient Agar* (NA) dilakukan dengan cara menimbang 5,46 g bubuk medium NA dan masukkan ke dalam gelas beker. Kemudian tambahkan akuades hingga volumenya mencapai 180 mL (28 g/1000 mL). Panaskan campuran hingga mendidih, lalu masukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup rapat dengan kapas. Sterilisasi media selama 15 menit menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan kemudian didinginkan sampai kurang lebih 45-50°C (Ramadheni et al., 2017; Hidayatulloh et al., 2022).

2. Media Peremajaan Bakteri

Prosedur pembuatan medium peremajaan bakteri dengan *Nutrient Agar* (NA) miring yaitu mencampurkan 0,42 g medium NA dengan 15 mL akuades (28 g/1000 mL) dalam erlenmeyer. Kemudian larutan dihomogenkan dengan stirrer diatas penangas air

hingga air mendidih. Diperoleh larutan kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi, tutup dengan kapas. Medium kemudian disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, keluarkan medium dari *autoclave*, diletak dalam suhu ruang sampai medium memadat dengan posisi tabung reaksi dimiringkan kurang lebih 30°C kemiringannya. Media dapat digunakan untuk inokulasi bakteri (Sangkoy et al., 2023; Hidayatulloh et al., 2022).

c. Inokulasi

Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril kemudian ditanam pada media *Nutrient Agar* (NA) miring dengan cara menggores. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C (Gerung et al., 2021).

d. Pembuatan Standar *Mc Farland* 0,5

Pengujian kekeruhan pada suspensi koloni uji yang distandarisasi dengan standar *Mc Farland* 0,5. Pembuatan standar *Mc Farland* 0,5 dengan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL dicampur dengan 9,95 mL H₂SO₄ 1% (Rifda & Lisdiana, 2022).

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* yaitu dengan cara diambil koloni bakteri *Propionibacterium acnes* yang sudah diinkubasi 24 jam dengan kawat ose steril, lalu disuspensikan dengan 5 mL NaCl 0,9% dalam tabung reaksi dan kocok hingga homogen. Tingkat kekeruhan suspensi dibandingkan dengan standar *Mc Farland* 0,5 secara

visual dan dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm, pada rentang absorbansi 0,08-0,13 yang setara dengan $1-2 \times 10^8$ CFU/mL (Ibrahim et al., 2021; Aristyawan et al., 2017).

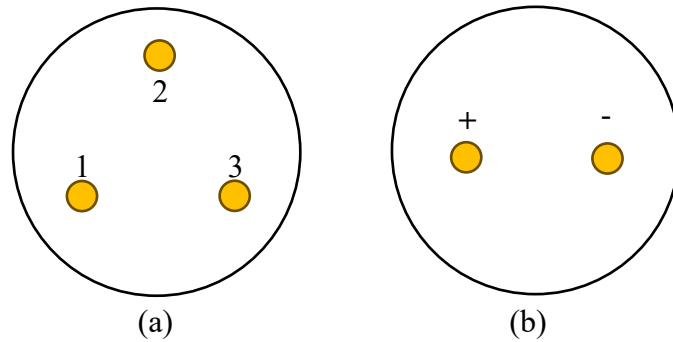
f. Pembuatan Larutan Uji

Dibuat larutan uji dengan konsentrasi 30, 50 dan 70% b/v dengan cara ditimbang ekstrak rimpang temu blenyeh masing-masing sebanyak 0,3; 0,5; dan 0,7 g kemudian dilarutkan dalam 1 mL DMSO 5% (Fikayuniar et al., 2019).

g. Uji Aktivitas Antibakteri

Media NA sebanyak 15 mL dituangkan dalam cawan petri dan diamkan hingga mengeras. Tambahkan 0,1 mL suspensi bakteri di atas permukaan media, lalu ratakan dengan batang L. Kemudian celupkan kertas cakram selama 30 menit ke dalam DMSO 5% sebagai kontrol negatif, untuk kontrol positif kertas cakram dicelupkan ke dalam antibiotik klindamisin 1% dan kontrol perlakuan kertas cakram dicelupkan ke dalam ekstrak rimpang temu blenyeh metode maserasi, soxhletasi dan sonikasi, dengan konsentrasi 30, 50, dan 70% kemudian diletakkan di atas media agar. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1×24 jam. Setelah itu, ukur zona penghambatan yang terbentuk di sekitar cakram. Aktivitas antibakteri ekstrak rimpang temu blenyeh dengan perbandingan metode maserasi, soxhletasi dan soniksi ditentukan dengan berdasarkan adanya

zona bening di area kertas cakram (Laili & Pramiastuti, 2023; Hafiz et al., 2022).



Gambar 3.1 Tata Letak Kertas Cakram
(a) Cawan perlakuan, (b) Cawan kontrol

Keterangan:

1 : Perlakuan 1

2 : Perlakuan 2

3 : Perlakuan 3

+ : Kontrol positif

- : Kontrol negatif

Zona hambat tersebut diukur dengan rumus (Kipimbob et al., 2019):

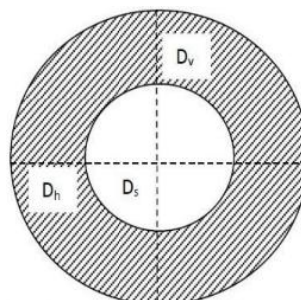
$$\frac{(D_v - D_c) + (D_h - D_c)}{2}$$

Keterangan:

D_v = Diameter vertikal

D_h = Diameter horizontal

D_c = Diameter cakram (6 mm)



Gambar 3.2 Diameter Zona Hambat (Kipimbob et al., 2019)

Jika zona hambatan tidak berbentuk bulat penuh maka diameter didapatkan dengan rumus (Nabilla & Advinda, 2022):

$$\frac{(d_1+d_2+\dots+d_n)}{n}$$

Keterangan:

d = Diameter zona hambatan

d₁ = Diameter zona hambatan 1

d₂ = Diameter zona hambatan 2

n = Jumlah pengukuran

Kategori diameter zona hambatan yaitu (Rahayuningsih et al., 2023):

Tabel 3.1 Kategori Diameter Zona Hambatan	
Diameter	Kekuatan Daya Hambatan
< 5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
> 20 mm	Sangat kuat

3.5 Analisis Data

Teknik Analisa data penelitian ini untuk identifikasi senyawa kimia dihasilkan oleh ekstrak rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) menggunakan analisis deskriptif (menunjukkan tabel ataupun gambar). Analisis pada uji antibakteri *Propionibacterium acnes* dari ekstrak temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) metode maserasi, soxhletasi dan sonikasi yaitu menggunakan software SPSS. Analisis data terdiri dari uji normalitas (uji *Shapiro-Wilk*) dan uji homogenitas (*Levene*). Apabila kondisi data normal dan varians homogen, maka dilanjutkan uji Anova satu faktor (*One-Way Anova*). Apabila data tidak normal atau tidak homogen maka uji statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* (Sardjiman et al., 2024).