

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan eksperimental dengan uji daya hambat fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol bunga cengkeh dengan konsentrasi yang bervariasi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan menggunakan metode difusi agar (difusi cakram).

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai dengan Juni 2021 dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi dan Laboratorium Bahan Alam Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol bunga cengkeh dan fraksi n-heksan, etil asetat, dan air. Bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus epidermidis* sedangkan antibiotik yang digunakan kloramfenikol sebagai kontrol positif.

D. Variabel

Variabel yang digunakan pada penelitian ini yaitu:

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry), konsentrasi fraksi n-heksan, etil asetat, dan air
2. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah Zona Hambat Bakteri.
3. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah bagian tanaman cengkeh, suhu inkubasi, lama inkubasi, kondisi media MHA (Muller Hinton Agar).

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry) merupakan ekstrak yang diperoleh dari hasil maserasi simplisia bunga cengkeh menggunakan pelarut etanol 70%.
2. Bau kaki adalah salah satu masalah bau badan yang sangat umum yang biasanya disebabkan oleh keringat yang berlebihan.
3. Fraksinasi merupakan suatu pemisahan senyawa yang sesuai dengan kepolarannya.
4. Zona hambat merupakan diameter zona bening disekitar *papper disk* yang telah diinokulasi menggunakan ekstrak cengkeh dan fraksinasi ekstrak kental etanol cengkeh.

F. Alat dan Metode Pengumpulan Data

1. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah alat-alat gelas, autoklaf, batang pengaduk, bunsen, batang L, *biosafety cabinet*, chamber, inkubator, jangka sorong, mikropipet, neraca analitik, ose, oven, penangas air, *petridisk*, pinset, pipet kapiler, rak tabung reaksi, spatula besi, *UV viewing cabinet*.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah akuades, antibiotik kloramfenikol 30 µg (dalam bentuk cakram), alkohol 96%, aluminium klorida (AlCl₃), asam asetat glasial, bakteri *Staphylococcus epidermidis*, cakram kosong, ekstrak etanol bunga cengkeh, etanol 70%, etil asetat, FeCl₃, HCl, kloroform, media NA (*Nutrient Agar*), media MHA (*Muller Hinton Agar*), metanol, n-heksan, reagen dragendorf, reagen mayer, reagen wagner, plat *silica gel* 60, serbuk magnesium.

3. Metode pengumpulan data

a. Determinasi Tanaman Cengkeh

Determinasi tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry) dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan sampel yang digunakan yaitu bagian batang, daun, dan bunga cengkeh. Determinasi tanaman cengkeh

dilakukan untuk memastikan bahwa bunga cengkeh yang digunakan sudah sesuai dengan identitas dari tanaman bunga cengkeh.

b. Penyiapan Sampel

1) Penyerbukan simplisia bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry)

Simplisia bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry) dikeringkan dibawah sinar matahari langsung kemudian ditutup dengan menggunakan kain hitam. Setelah bunga cengkeh kering kemudian dilakukan penyerbukan simplisia bunga cengkeh menggunakan mesin penggiling lalu diayak menggunakan ayakan berukuran 60 mesh. Serbuk hasil ayakan kemudian disimpan di tempat yang kering dan terhindar dari sinar matahari langsung.

2) Pembuatan ekstrak etanol bunga cengkeh

Metode yang digunakan untuk proses pembuatan ekstrak etanol bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry) adalah metode maserasi. Serbuk bunga cengkeh ditimbang sebanyak 250 gram, ditambahkan 2,5 liter etanol 70% dengan perbandingan 1 : 10. Serbuk bunga cengkeh dimaserasi selama 3 hari. Setelah 3 hari, disaring menggunakan kain, filtrat ditampung pada wadah lain (Filtrat 1). Sisa ampas diremaserasi selama 2 hari setelah itu disaring dengan menggunakan kain, filtrat yang diperoleh dicampurkan dengan filtrat 1 (yang sudah disaring pertama). Kemudian dilakukan penyaringan menggunakan vacum Buchner yang dilapisi kertas saring. Filtrat yang didapatkan kemudian diuapkan menggunakan kompor listrik hingga diperoleh ekstrak kental bunga cengkeh.

3) Tahap fraksinasi

Sebanyak 10 gram ekstrak etanol bunga cengkeh dilarutkan dalam 100 mL air panas dengan suhu 60⁰C. Dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 50 mL n-heksan, corong pisah ditutup lalu dikocok perlahan selama 1 menit sambil sesekali dibuka tutupnya, dibiarkan hingga terjadi pemisahan. Kedua lapisan dipisahkan ke dalam

wadah yang berbeda. Lapisan air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah, ditambahkan lagi n-heksan dengan jumlah yang sama dan dilakukan seperti langkah yang di atas hingga tiga kali. Fraksi n-heksan ditampung dalam satu wadah. Bagian air dimasukkan ke dalam corong pisah dilakukan fraksinasi menggunakan etil asetat dengan cara yang sama seperti fraksinasi dengan n-heksan. Fraksi etil asetat dan fraksi air ditampung dalam wadah yang berbeda ketiga fraksi selanjutnya dipekatkan dan dihitung rendemen fraksi.

c. Kontrol kualitas ekstrak etanol bunga cengkeh dan fraksi n-heksan, etil asetat dan air

1) Pengamatan organoleptik

Sampel yang didapatkan dilakukan pengamatan yang terdiri dari bau, rasa, warna, dan tekstur.

2) Rendemen (%)

Cara perhitungan :

$$\text{Rendemen (\%)} : \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat sampel segar}} \times 100 \%$$

3) Analisis fitokimia

Uji fitokimia dilakukan dengan menggunakan ekstrak kental etanol bunga cengkeh dan fraksi n-heksan, etil asetat, dan air.

Prosedur pelaksanaan uji fitokimia antara lain:

a) Uji Alkaloid

Ditimbang 1 mg sampel dimasukan ke dalam beaker glass, ditambahkan 1 mL HCl 2% dan 5 mL air, panaskan di atas penangas air selama 2 menit, kemudian didinginkan dan saring menggunakan kertas saring. Filtrat yang didapatkan dibagi menjadi 3 bagian yaitu A, B, dan C. Bagian A ditambahkan dengan reagen *wagner*, bila terdapat endapan berwarna coklat maka positif alkaloid, bagian B ditambahkan dengan reagen *Mayer*, bila terjadi endapan putih atau kuning maka positif

alkaloid, bagian C ditambahkan dengan reagen *Dragendrof*, bila terdapat endapan kemerahan maka positif alkaloid.

b) Uji flavonoid

Ditimbang 1 mg sampel masukkan ke dalam tabung reaksi, larutkan dengan 2 mL etanol 70%, tambahkan dengan 0,5 g serbuk magnesium dan HCl 37% 0,5 mL. Diamati perubahan warna yang terjadi. Jika terdapat warna orange, merah, atau kuning maka hasil positif flavonoid.

c) Uji Saponin

Timbang 1 mg sampel masukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan dengan 10 mL air panas, dinginkan dan dikocok kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit dan penambahan 3 tetes HCl 1%, busa tidak hilang. Maka hasil positif saponin.

d) Uji Tanin

Timbang 1 mg sampel masukkan ke dalam tabung reaksi, dikocok dengan air panas hingga homogen. Setelah itu ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl_3 1%, diamati perubahan yang terjadi. Jika menghasilkan warna biru-kehitaman berarti mengandung tanin pirogalol, sedangkan jika pada saat penambahan FeCl_3 berubah warna menjadi hijau atau biru-hijau maka mengandung tanin katekol.

4) Identifikasi senyawa aktif menggunakan KLT

Fase diam yang akan digunakan plat KLT silika gel 60 dengan ukuran plat KLT 10 cm x 5 cm diberi garis batas atas dan bawah 1 cm. Fase gerak yang akan digunakan yaitu kloroform : metanol : asam asetat glasial (9 : 1 ; 0,5). Standar pembanding yang akan digunakan adalah kuersetin.

a) Penjenuhan chamber

Dilakukan penjenuhan bejana kromatografi dengan menggunakan kertas saring. Fase gerak yang akan digunakan

yaitu kloroform : metanol : asam asetat glasial (9 : 1 ; 0,5). Fase gerak dimasukkan kedalam bejana. Kertas saring dengan tinggi 18 cm harus tercelup ke dalam larutan fase gerak hingga dasar bejana. Kemudian bejana ditutup kedap dan didiamkan hingga kertas saring basah seluruhnya.

b) Penotolan sampel pada plat KLT

Plat KLT diberi garis batas atas dan bawah 1 cm ditotolkan ekstrak etanol bunga cengkeh menggunakan pipet kapiler pada plat KLT silica gel 60. Penotolan dilakukan secara tegak lurus kemudian dimasukkan ke dalam bejana yang telah dijenuhkan ditutup kedap dan dibiarkan elusi mencapai batas plat KLT.

c) Identifikasi plat KLT menggunakan UV 254 nm, UV 365 nm dan sinar tampak.

Diamati dibawah sinar UV λ 254 nm, λ 365 nm dan sinar tampak. Lempeng disemprot dengan Aluminium Klorida (AlCl_3) 5%. Dari hasil bercak yang dideteksi kemudian dilakukan perhitungan nilai *retardation factor* (R_f). Nilai R_f yang baik berkisar antara 0,2 hingga 0,8.

Rumus perhitungan nilai R_f :

$$R_f : \frac{\text{Jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

d. Penentuan uji daya hambat bakteri *Staphylococcus epidermidis*

1) Penyiapan larutan uji

Hasil fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dibuat konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dengan pengenceran menggunakan akuades. Stok awal pada tiap fraksi ekstrak kental etanol bunga cengkeh adalah 100% dengan ditimbang 5 gram tiap fraksi ditambahkan akuades sampai 5 ml.

Pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

Keterangan: V_1 = Volume yang diinginkan (mL)

V_2 = Volume awal (mL)

M_1 = Konsentrasi awal (%)

M_2 = Konsentrasi yang diinginkan (%)

2) Sterilisasi alat dan bahan

Alat yang digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu agar tidak terkontaminasi dengan mikroorganisme lainnya. Alat yang terbuat dari bahan kaca dibungkus menggunakan kertas payung, dipanaskan di dalam oven dengan suhu 171°C dengan waktu 1 jam. Pinset dan kawat ose disterilkan dengan cara dipanaskan di atas bunsen. Sterilisasi bahan yang digunakan seperti *Muller Hiton Agar* (MHA) dan akuades dimasukan kedalam tabung erlenmeyer disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3) Pembuatan standar kekeruhan Mac-Farland 0,5

Disiapkan larutan Barium Klorida (BaCl_2) 1% sebanyak 0,05 mL. Dicampurkan dengan larutan asam sulfat (H_2SO_4) 1% sebanyak 9,95 ml. Kocok larutan hingga homogen dan terlihat keruh. Kekeruhan ini digunakan sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji.

4) Peremajaan bakteri

Kultur murni bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang didapatkan dari laboratorium Mikrobiologi pangan dan gizi, Universitas Gadjah Mada. Kultur murni bakteri *Staphylococcus epidermidis* diambil satu ose kemudian diinokulasi dengan cara digoreskan pada media NA miring secara aseptik. Lalu diinkubasi media NA miring yang sudah dibiakan bakteri pada suhu 37°C selama 1×24 jam.

5) Pembuatan suspensi bakteri

Diambil biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* menggunakan kawat ose steril, kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang

berisi 9 ml NaCl 0,9% hingga didapatkan kekeruhan sesuai dengan standar kekeruhan Mac Farland.

6) Pembuatan media agar

Sebanyak 13,94 gram media MHA dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam 410 ml aquades, dipanaskan di atas *Hotplate* dengan ditambahkan *magnetic stirrer* diaduk sampai bahan larut. Erlenmeyer yang berisi media disterilkan menggunakan *autoklaf* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit, ditunggu hingga dingin, lalu dituang media MHA ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL.

7) Inokulasi bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Proses inokulasi bakteri *Staphylococcus epidermidis* dilakukan dengan mendinginkan selama beberapa saat media MHA untuk menghilangkan uap air pada cawan petri. Setelah itu, dimasukkan masing-masing bakteri 100 µL ke dalam cawan petri, kemudian diratakan menggunakan batang L.

8) Uji daya hambat bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Uji daya hambat bakteri dari fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak kental etanol bunga cengkeh menggunakan metode difusi cakram *Kirby-Bauer*. Disiapkan media yang telah diinokulasi dengan bakteri. Rendam selama 10-15 menit kertas cakram kosong ke dalam sampel dengan masing-masing konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Kelompok kontrol yang digunakan yaitu kontrol positif menggunakan antibiotik kloramfenikol 30 µg, kontrol negatif menggunakan akuades, dan ekstrak bunga cengkeh. Masukkan kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel menggunakan pinset steril ke dalam cawan petri yang telah berisi media MHA dan bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Inkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam dengan di bungkus menggunakan kertas payung dan dengan posisi tutup cawan petri terbalik, agar menghindari terjadinya penguapan air yang terdapat di dalam cawan sehingga tidak

jatuh mengenai agar dan tidak membuat media menjadi cair. Diamati dan ukur diameter zona hambat di sekitar kertas cakram dengan pengukuran tiga sisi yaitu sisi vertikal, horizontal, dan diagonal.

G. Metode Pengelolaan dan Analisis Data

1. Metode Pengelolaan

Dari hasil penelitian uji daya hambat fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol bunga cengkeh dengan menggunakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan konsentrasi setiap fraksi n-heksan, etil asetat, dan air 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% menggunakan kelompok kontrol yaitu kontrol negatif dengan menggunakan akuades, kontrol positif dengan menggunakan antibiotik kloramfenikol, dan ekstrak bunga cengkeh. Dilakukan pengamatan dan diukur diameter zona bening di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong skala mm dengan pengukuran tiga sisi yaitu sisi vertikal, horizontal, dan diagonal.

2. Analisa Data

Data hasil zona hambat dari fraksi n-heksan, etil asetat, air, ekstrak 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif yang didapatkan diklasifikasi dengan respon zona hambat bakteri menurut (Sakul et al., 2020). Kemudian data yang didapatkan dari hasil penelitian diolah dengan program statistik komputer yakni menggunakan uji *one way ANOVA (Analysis of variann)* dengan program SPSS. Untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Jika untuk menguji data homogen atau tidak menggunakan uji *Lavene test*. Kemudian untuk menentukan konsentrasi mana yang memiliki perbedaan bermakna maka dilakukan analisis *Post Hoc* menggunakan uji *Least Significance Different (LSD)*.

H. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilaksanakan selama 6 (bulan) dengan rincian sebagai berikut ini:

No	Pelaksanaan Penelitian	Bulan																											
		Februari				Maret				April				Mei				Juni				Juli							
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
1.	Persiapan penelitian	■	■	■	■																								
2.	Pengumpulan sampel uji			■	■																								
3.	Ekstraksi bunga cengkeh					■	■																						
4.	Fraksinasi																												
5.	Skrining fitokimia																												
6.	Uji KLT																	■	■	■	■								
7.	Uji daya hambat bakteri																	■	■	■	■								
8.	Pengelolaan data hasil penelitian																					■	■	■	■	■	■	■	■
9.	Penyusunan laporan hasil penelitian																									■	■	■	■