

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain pada penelitian ini yaitu jenis eksperimental untuk membandingkan aktivitas kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

B. Lokasi dan Waktu

Determinasi tanaman dilakukan di Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan. Proses ekstraksi, uji organoleptik, uji fitokimia, dan uji aktivitas antibakteri dilakukan di Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta Fakultas Kesehatan Laboratorium Mikrobiologi dan Bahan Alam. Penelitian dilakukan bulan Juni- Juli tahun 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini yaitu tanaman daun pandan wangi diambil di Jopa Green Jalan Pasir Luhur, Desa Sukoharjo, Kec. Ngaglik, Kab. Sleman, DIY.

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini daun pandan wangi berwarna hijau tua dengan kondisi segar dan utuh sebanyak 3 kilogram dan sampel bakteri yang digunakan yaitu biakan murni *S. epidermidis* ATCC 12228 yang diperoleh dari Labkes dan Kalibrasi Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas: Variasi konsentrasi ekstrak etanol pandan wangi
2. Variabel Terikat: Diameter zona hambat dan KHM pada bakteri *S. epidermidis* ATCC 12228.

3. Variabel Terkendali: Suhu pengeringan simplisia daun pandan wangi, waktu inkubasi media uji, bagian daun atau sampel yang digunakan, pelarut ekstraksi serta diameter cakram.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun pandan wangi merupakan ekstrak kental didapatkan dari hasil penguapan pelarut ekstraksi dengan metode maserasi.
2. Diameter zona hambat merupakan area zona bening disekitar cakram dan dilakukan pengukuran dengan jangka sorong secara vertikal, horizontal serta diagonal.
3. KHM merupakan konsentrasi terkecil yang bisa menghambat pertumbuhan bakteri *S. epidermidis* ATCC 12228.

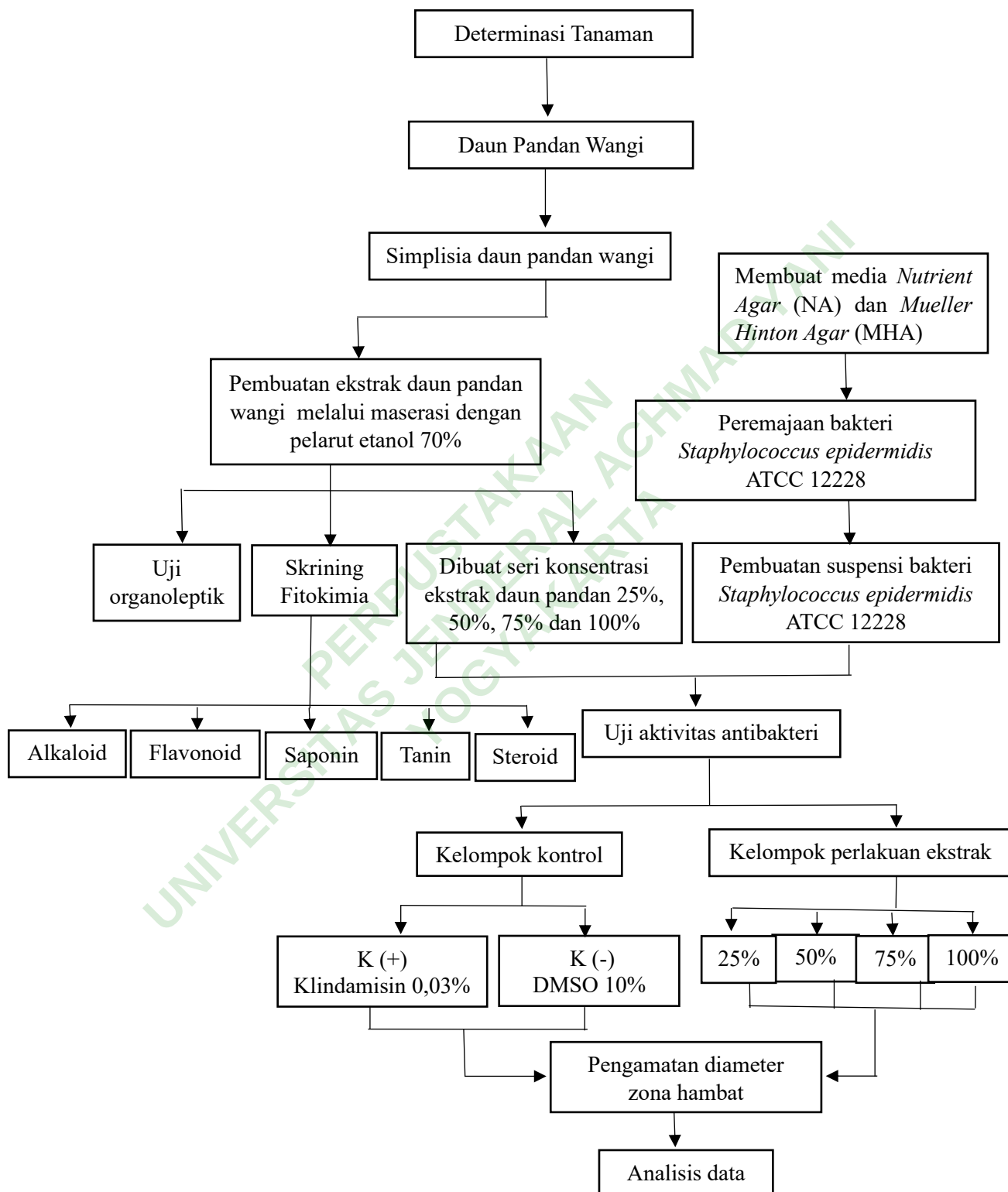
F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Peralatan pembuatan simplisia dan ekstrak : ayakan ukuran 40 mesh, bejana, gelas ukur 1000 mL, grinder, gunting, kain mori, oven (Mettler UN160), pisau, spatula kayu, toples kaca, timbangan neraca analitik (Ohaus), kompor Listrik (Maspion), termometer.
 - b. Peralatan uji organoleptik dan uji fitokimia : beaker gelas 100 mL (IWAKI), gelas ukur 10 mL (IWAKI), *hotplate* (IKA HS-7), kertas saring, pipet tetes, tabung reaksi (IWAKI), timbangan neraca analitik (Ohaus).
 - c. Peralatan uji aktivitas antibakteri : autoklaf (Gea LS-B 50L), gelas beaker 250 mL (IWAKI), *cotton swab* steril, *Biological Safety Cabinet* (BSC) (Daihan Labtech), cawan petri, gelas ukur 50 mL (IWAKI), *hotplate* (IKA HS-7), inkubator (Mettler IN30), jangka sorong, jarum ose, labu erlenmeyer 250 mL (IWAKI), labu takar 5 mL (IWAKI), lemari pendingin, *magnetic stirrer*, mikropipet 20-200 μ L (Ohaus), oven (Mettler UN160), pembakar bunsen, tabung reaksi (IWAKI), *yellowtip*, pinset.

2. Bahan

- a. Bahan determinasi: tanaman daun pandan wangi.
- b. Bahan pembuatan simplisia dan ekstraksi: serbuk pandan wangi yang telah ayakan 40 mesh dan etanol 70%.
- c. Bahan pengujian skrining fitokimia: amoniak, asam sulfat 1%, asam sulfat pekat, asam asetat anhidrat, aquades, ekstrak etanol daun pandan wangi, etanol 70%, etil asetat, FeCl_3 10%, HCl 2N, pereaksi *Dragendroff*, *Wagner*, *Mayer*, serbuk Magnesium, kloroform.
- d. Bahan pengujian aktivitas antibakteri : asam sulfat 1%, alumunium foil, bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, barium klorida 1%, DMSO 10%, ekstrak etanol daun pandan wangi, H_2SO_4 kassa, kapas, Klindamisin, media MHA (Oxoid), media NA (Oxoid), NaCl 0,9%, *paper disk blank*.

G. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 4. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan. Tujuannya yaitu meminimalisir terjadinya kesalahan pada saat pengambilan sampel dan memastikan keaslian dari tanaman yang akan dijadikan sampel adalah *Pandanus amaryllifolius* Roxb.

2. Preparasi Sampel

a. Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Pandan Wangi

Daun pandan wangi yang telah petik, selanjutnya dilakukan pemilihan daun pandan wangi berwarna hijau tua, segar dan utuh. Timbang sebanyak 3 kilogram daun pandan wangi, kemudian bersihkan dengan air mengalir. Daun pandan wangi selanjutnya dirajang lalu keringkan di oven dengan suhu 50°C selama 48 jam sampai kering. Simplisia kering lalu digrinder sampai menjadi serbuk, selanjutnya diayak dengan ayakan 40 mesh. Serbuk hasil ayakan mesh 40 selanjutnya disimpan pada wadah toples kaca tertutup (Komala *et al.*, 2017).

b. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi

Serbuk simplisia diekstraksi dengan metode maserasi perbandingan 1:10. Timbang sebanyak 400 gram serbuk daun pandan wangi, selanjutnya masukkan ke dalam toples kaca dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 4 L. Toples kaca ditutup dan dimaserasi selama 3 hari. Simpan di suhu ruang dan terlindung paparan cahaya matahari, serta setiap 8 jam diaduk selama 5 menit, setelah 3 hari selanjutnya disaring dengan kain mori, kemudian disaring kembali dengan kertas saring hingga didapatkan filtrat hasil maserasi, selanjutnya dilakukan proses remaserasi menggunakan etanol 70% sebanyak 1 liter selama 48 jam, serta selama 5 menit setiap 8 jam dilakukan pengadukan. Hasil remaserasi lalu disaring menggunakan kain mori dan disaring kembali dengan kertas saring untuk didapatkan hasil filtrat yang kedua. Filtrat pertama dan filtrat kedua kemudian dicampur, serta diuapkan di atas kompor listrik suhu 50°C hingga didapatkan ekstrak

kental. Hitung nilai rendemen ekstrak dengan rumus pada **Persamaan 1** (Assauqi *et al.*, 2023).

$$\text{rendemen (\% b/b)} = \frac{\text{berat ekstrak (gram)}}{\text{berat simplisia (gram)}} \times 100\% \dots\dots(1)$$

3. Uji Organoleptik

Uji organoleptik yaitu dengan cara mengamati bentuk, bau, rasa, dan warna dari ekstrak (Gangga *et al.*, 2017).

4. Skrining Fitokimia

a. Identifikasi Alkaloid

Timbang 0,5 gram ekstrak, kemudian masukan kedalam tabung reaksi. Tambahkan 1 mL amoniak serta 1 mL kloroform. Campuran kemudian divortex sampai homogen. Filtrat yang terbentuk kemudian ditambahkan dengan H₂SO₄ 2N sebanyak 10 mL kemudian dikocok. Lapisan asam sulfat kemudian dipisahkan menjadi 3 tabung reaksi. Tabung reaksi pertama tambahkan sebanyak 5 tetes pereaksi *Mayer*. Amati perubahan warna, jika terdapat endapan warna putih yaitu positif alkaloid. Tabung reaksi kedua ditambahkan sebanyak 5 tetes reagen *Dragendoff*. Amati perubahan warna, jika terdapat endapan berwarna jingga maka positif alkaloid dan selanjutnya pada tabung reaksi ketiga ditambahkan sebanyak 5 tetes reagen *Wagner*. Amati perubahan warna jika terdapat endapan berwarna coklat maka positif alkaloid (Wahyuni *et al.*, 2018).

b. Identifikasi Flavonoid

Diambil 0,5 gram ekstrak, lalu masukkan didalam tabung reaksi. Tambahkan 2 mg magnesium dan 1 mL HCl pekat kedalam tabung reaksi yang berisi ekstrak etanol daun padan wangi, lalu tabung reaksi dikocok. Amati perubahan, jika terbentuk larutan berwarna kuning atau kuning pucat maka menunjuknya positif flavonoid (Rahmasiahi *et al.*, 2023).

c. Identifikasi Saponin

Timbang 0,5 gram ekstrak, lalu masukkan kedalam tabung reaksi dan Ditambahkan 10 mL aquadest panas serta 1 tetes HCl 2N, kocok

campuran. Jika terbentuk busa yang stabil maka positif saponin (Rahmasiahi *et al.*, 2023).

d. Identifikasi Tanin

0,5 gram ekstrak etanol daun pandan wangi dimasukkan kedalam plat tetes, selanjutnya ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 10%. Jika terdapat perubahan warna hitam kehijauan maka positif tanin (Rahmasiahi *et al.*, 2023).

e. Identifikasi Steroid dan Terpenoid

Ditimbang 0,5 gram ekstrak etanol daun pandan wangi, kemudian diuapkan didalam cawan peselin yang dipanaskan dalam penangas air untuk membentuk residu. Hasil residu yang didapatkan, kemudian larutkan dalam 0,5 mL CHCl_3 , 0,5 mL $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$, dan 2 mL H_2SO_4 . Jika terbentuk warna merah maka positif terpenoid, tetapi jika berwarna hijau maka positif steroid (Handayani & Ulfi, 2021).

5. Persiapan Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Alat seperti tabung reaksi setelah dicuci bersih, selanjutnya disemprot dengan alkohol 70%. Alat yang mempunyai lubang ditutup dengan kapas berbalut kasa agar terhindar dari kontaminasi. Bungkus alat dengan kertas payung kemudian dimasukkan kedalam oven. Sterilkan alat dengan oven dengan suhu 171°C selama 1 jam. Sterilkan jarum ose diatas api bunsen hingga memijar (Misna & Diana, 2016). Alat seperti cawan petri, *yellowtip*, dan bahan-bahan yang digunakan yang tidak tahan pemanasan dibungkus menggunakan kertas payung kemudian disterilisaasi diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit (Tunny *et al.*, 2021).

b. Pembuatan Media

1) Media NA Untuk Peremajaan Bakteri

Timbang sebanyak 1 gram Nutrient Agar oxoid, selanjutnya masukkan kedalam erlenmeyer lalu dilarutkan dalam 50 mL aquadest, aduk hingga homogen. Tuang media kedalam 8 tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL. Tutup ujung menggunakan kapas berbalut

kassa, selanjutnya sterilkan pada autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Diamkan hingga memadat pada posisi miring, selanjutnya media disimpan didalam lemari pendingin (Chasani *et al.*, 2015).

c. Media MHA Untuk Uji Aktivitas Antibakteri

Timbang 4,76 gram MHA kemudian dimasukkan ke erlenmeyer lalu dilarutkan menggunakan aquadest sebanyak 140 mL. Panaskan dengan cara diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Sterilkan di autoklaf selama 15 menit suhu 121°C dan tekanan 1 atm, setelah steril dituang kedalam 6 cawan petri masing-masing sebanyak 20 mL. Diamkan sampai memadat lalu disimpan pada lemari pendingin (Utomo *et al.*, 2018).

d. Pembuatan Larutan Standar *Mc farland* 0,5

1) Pembuatan Larutan BaCl₂ 1%

Ditimbang 1 gram BaCl₂ dengan teliti, selanjutnya dilarutkan menggunakan aquadest didalam labu ukur 100 mL hingga tanda batas, kocok hingga homogen. Larutan BaCl₂ 1% disimpan di dalam lemari pendingin (Rosmania & Yanti, 2020).

2) Pembuatan Larutan H₂SO₄ 1%

Siapkan labu ukur 100 mL yang sudah berisi 50 ml aquadest, kemudian pipet menggunakan pipet volume dengan hati-hati sebanyak 0,520 mL asam sulfat pekat dan dituangkan melalui dinding labu takar 100 mL. Ditambahkan kembali sisa aquadest hingga tanda batas. Simpan larutan H₂SO₄ 1% pada suhu kamar (Rosmania & Yanti, 2020).

3) Pembuatan Larutan *Mc Farland* 0,5

Campurkan larutan BaCl₂ 1% 0,05 mL larutan H₂SO₄ 1% 9,95 mL kedalam tabung reaksi. Kemudian campuran divortex hingga tercampur sempurna (Rosmania & Yanti, 2020). Setelah itu diukur absorbansi campuran dengan alat spektrofotometer *UV-Vis* panjang gelombang 625 nm. Syarat nilai absorbansi yang terukur yaitu 0,08 hingga 0,1. Simpan

larutan tersebut pada lemari pendingin (Dalyn, 2014 dalam Yanti *et al.*, 2021).

e. Peremajaan Bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Peremajaan bakteri yaitu menginokulasikan bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Ambil 1-2 ose kultur murni *Staphylococcus epidermidis*, kemudian goreskan pada permukaan media agar miring. Peremajaan bakteri dilakukan didalam BSC agar terhindar dari kontaminasi. Inkubasi diinkubator pada suhu 37°C 24 jam (Alydrus *et al.*, 2023).

f. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Hasil peremajaan bakteri *S. epidermidis*, selanjutnya dilakukan pembuatan suspensi bakteri. Masukkan larutan natrium klorida 0,9% 10 mL dalam tabung reaksi. Ambil bakteri hasil peremajaan selama 24 jam dengan jarum ose yang telah disterilkan sebanyak 1-3 ose, dan masukkan kedalam tabung reaksi, kocok hingga homogen. Bandingkan suspensi bakteri dengan larutan *Mc Farland* 0,5. Standar kekeruhan *Mc Farland* 0,5 setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Jika larutan terlalu keruh maka diencerkan menggunakan aquadest dan jika larutan terlalu encer maka pembuatan dibuat ulang (Rahayu *et al.*, 2021).

g. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

Ekstrak etanol daun pandan wangi dibuat seri konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. Dibuat larutan stok ekstrak konsentrasi 100%, dengan ditimbang 10 gram ekstrak dan dilarutkan dengan 10 mL DMSO 10%. Rincian perhitungan untuk membuat konsentrasi larutan uji dapat dilihat pada **Lampiran 14** (Adha & Ibrahim, 2021).

h. Pembuatan Kontrol Positif Klindamisin 0,03%

Kontrol positif klindamisin 0,03%, dibuat dengan cara menimbang isi kapsul klindamisin sebanyak 3,8 mg, selanjutnya masukan dalam labu takar 10 mL dan dilarutkan menggunakan 10 mL DMSO 10% (Fitriani & Nashihah, 2021).

i. Pembuatan Kontrol Negatif DMSO 10%

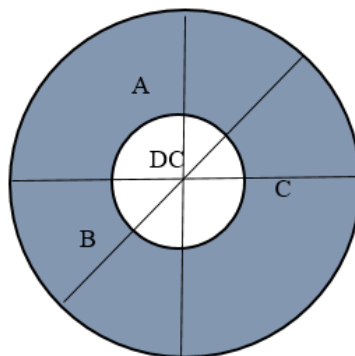
Dibuat dengan cara mengambil sebanyak 10 mL DMSO 100%, lalu masukkan kedalam labu ukur 100 mL. dan ditambahkan aquadest steril hingga tanda batas, kocok campuran sampai homogen (Yusuf *et al.*, 2020).

j. Uji Aktivitas Antibakteri

Dilakukan uji aktivitas antibakteri pada media MHA. Suspensi bakteri diambil sebanyak 100 μ L. Ratakan dengan *cotton swab* steril diatas permukaan agar. *Blank disc* dengan diameter 6 mm direndam selama 10 menit sesuai konsentrasi ekstrak yang akan diujikan, kontrol negatif (dimetil sulfoksida 10%) dan kontrol positif (klindamisin 0,03%). *Paper disk blank* yang sudah direndam selanjutnya dikering anginkan dan diletakkan diatas media yang telah diratakan dengan suspensi bakteri menggunakan pinset. Media diinkubasi selama 8 jam pada suhu 37°C. Dilakukan sebanyak 3 kali replikasi pada tiap perlakuan. Zona bening yang terbentuk disekitar cakram diukur dengan jangka sorong secara vertikal, diagonal dan horizontal (Diniawati & Setyo, 2023).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Pengamatan diameter zona hambat dilakukan pengukuran zona bening (*clear zone*) disekitar cakram secara vertikal, horizontal, dan diagonal dengan jangka sorong pada ketelitian 0.05 mm. Pengukuran dinyatakan dalam satuan milimeter (Mozartha *et al.*, 2019). Rumus perhitungan diameter zona hambat dapat dilihat pada **Persamaan 2**.



Gambar 5. Diagram Pengukuran Zona Hambat Bakteri (Jumardin & Masnawati, 2015).

Keterangan :

= Zona Hambat

A = Diameter Vertikal

B = Diameter Horizontal

C = Diameter Diagonal

DC = Diameter Cakram

Pengukuran diameter zona hambat (mm) dilakukan dengan rumus:

$$\text{Rata-rata diameter zona hambat} = \frac{\text{Pengukuran } A+B+C}{3} \dots\dots\dots (2)$$

Hasil pengukuran diameter zona hambat selanjutnya ditentukan kategori kekuatan daya hambat berdasarkan klasifikasi pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Kategori Diameter Zona Hambat (Susanto *et al.*, 2012)

Diameter	Kekuatan Daya Hambat
≤ 5 mm	Lemah
6-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
≥ 21 mm	Sangat Kuat

Data diameter zona hambat yang didapatkan dianalisis dengan program SPSS dengan tujuan membandingkan antar kelompok perlakuan. Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk menentukan data normalitas. Data yang dianalisis dianggap terdistribusi normal jika nilai lebih besar 0,05. Uji *Levene* digunakan untuk analisis

homogenitas varian data pada setiap kelompok. Data dianggap homogen jika nilai signifikansinya lebih besar 0,05 (Daud *et al.*, 2023).

Setelah persyaratan normalitas dan keseragaman terpenuhi, dilakukan uji ANOVA. Jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 maka menunjukkan bahwa terdapat perbedaan tiap kelompok perlakuan. Uji LSD (*Least Significant Different*) untuk analisis lanjutan, untuk menunjukkan perbedaan yang signifikan. Apabila pengujian normalitas data memberikan hasil yang tidak normal dan data homogen maka uji yang digunakan yaitu uji *Kruskall-Wallis* (Daud *et al.*, 2023).

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA