

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimen membandingkan pengaruh perlakuan yaitu kelompok yang menerima sampel dan kelompok kontrol. Proses pembuatan ekstrak daun kayu putih menggunakan metode ekstraksi maserasi, dimana pelarut yang digunakan yaitu etanol 70%. Difusi cakram digunakan pada uji aktivitas antibakteri untuk mengetahui diameter zona hambat serta konsentrasi hambat minimum dari ekstrak daun kayu putih terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

B. Lokasi dan Waktu Kegiatan

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan Mei-Juli 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi yang dijadikan fokus penelitian yakni daun kayu putih yang diperoleh dari Desa Jatimunggul, Blok Weringin, Kec. Terisi, Kab. Indramayu, Jawa Barat.
2. Sampel penelitian ini yaitu daun kayu putih utuh, tidak rusak, diambil dari urutan ke 5-15, dan berwarna hijau tua. Daun kayu putih yang telah dibersihkan menggunakan air yang mengalir, kemudian di oven menggunakan suhu 40°C hingga kering, dihaluskan simplisia yang sudah di oven menggunakan grinder, dan diekstraksi dengan pelarut etanol 70%. Sampel bakteri yang digunakan yaitu *Streptococcus mutans*.

D. Variabel

1. Variabel Bebas

Konsentrasi ekstrak daun kayu putih 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

2. Variabel Tergantung

Diameter zona hambat serta konsentrasi hambat minimum bakteri *Streptococcus mutans*.

3. Variabel Terkendali

Suhu pengeringan, durasi maserasi, waktu dan suhu inkubasi media uji, serta sterilisasi alat dan bahan.

E. Definisi Oprasional

1. Ekstrak merupakan bentuk zat yang didapat dari proses ekstraksi senyawa aktif menggunakan pelarut berupa sediaan kental atau cair. Ekstrak daun kayu putih yang digunakan yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.
2. Konsentrasi hambat minimum adalah tingkat konsentrasi terendah sampel yang diujikan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Sampel bakteri didapatkan dari *Molecular Medicine and Therapy Research Laboratory* (MMT Lab) UMY.
3. Zona hambat merupakan ukuran diameter zona bening yang terlihat disekitar kertas cakram. Daerah bening merujuk pada area yang tidak ditumbuhi oleh bakteri, kemudian diukur diameter horizontal, vertikal, dan diagonal dengan satuan mm.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Autoklaf (*Gea LS-B50L*), ayakan 40 mesh, batang-L, *beaker glass* (250 mL dan 1000 mL), bejana KLT, *biological safety cabinet* (BSC) (*Daihan Labtech*), *bluetip*, cawan petri, cawan porselin, erlenmeyer 250 mL (*Iwaki*), gelas ukur (10 mL dan 50 mL), grinder (*Fomac*), *hotplate* (*IKA HS-7*), inkubator (*Memmert IN30*), jangka sorong dengan satuan mm, jarum ose, kertas payung, kertas saring, kompor listrik, labu takar 5 mL, lemari pendingin, *magnetic stirrer*, mikropipet 100-1000 μ L, *moisture balance* (*Ohaus*) neraca analitik (*Ohaus*), oven (*Memmert UN160*), pembakar bunsen, pinset, pipet tetes, spatula kayu, tabung reaksi, toples kaca, termometer, turbidity meter (*BD Phoenix*) dan wajan.

2. Bahan

Akuades, *aluminium foil*, amonia (p.a), asam asetat anhidrat (p.a), BaCl_2 1% (p.a), daun kayu putih, dimetil sulfoksida (DMSO) 10%, etanol 70%, etil asetat (p.a), FeCl_3 1% (p.a), H_2SO_4 1% (p.a), HCL 2 N (p.a), kain kasa, kertas cakram (*Oxoid*), klorheksidin 0,2%, kultur bakteri *Streptococcus mutans*, *Media Mueller Hinton Agar* (p.a), metanol (p.a), NaCl 0,9%, n-heksan (p.a), *Nutrient Agar* (p.a), pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, plat silika GF_{254} (p.a), serbuk Magnesium (p.a), dan standar kuersetin 0,1% (p.a).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman Kayu Putih (*Melaleuca leucadendra* L.)

Dilakukan determinasi tanaman kayu putih di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta, guna mengurangi potensi terjadinya kekeliruan selama pengambilan sampel tanaman dan memastikan keakuratan identitas tanaman yang akan diteliti.

2. Penyiapan Sampel

a. Pengambilan sampel

Tanaman kayu putih diambil bagian daunnya, dengan kriteria daun utuh, tidak rusak, diambil dari urutan ke 5-15, dan berwarna hijau tua berasal dari Desa Jatimunggul, Blok Weringin, Kec. Terisi, Kab. Indramayu, Jawa Barat.

b. Pengolahan sampel

Sampel daun kayu putih diambil sebanyak 1000 gram, dibersihkan menggunakan air yang mengalir kemudian tiriskan, di oven menggunakan suhu 40°C hingga kering serta mudah hancur apabila diremas. Dihaluskan menggunakan grinder, lalu diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh (Binugraheni *et al.*, 2022).

c. Pembuatan ekstrak daun kayu putih

Serbuk daun kayu putih ditimbang 400 gram, dilakukan ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan 1:10 dan direndam 3×24 jam. Toples kaca digunakan sebagai wadah untuk maserasi, kemudian tutup rapat terlindung dari cahaya matahari serta disimpan pada ruangan tertutup, pengadukan dilakukan setiap 6 jam selama 5 menit. Disaring filtrat pada hari ke empat menggunakan kain mori (filtrat 1), setelah itu residu ekstrak daun kayu putih diremaserasi menggunakan etanol 70% sebanyak 1 L selama 1×24 jam setiap 6 jam diaduk, setelah itu filtrat disaring dengan kain mori (filtrat 2). Kedua filtrat digabungkan, dan dipekatkan menggunakan kompor dan wajan suhu 55°C sampai didapatkan ekstrak kental (Binugraheni *et al.*, 2022). Ekstrak daun kayu putih yang dihasilkan dilakukan penimbangan serta dihitung rendemennya. Rendemen ekstrak daun kayu putih dapat dihitung menggunakan rumus pada persamaan (1).

$$\text{Rendemen} \left(\% \frac{b}{b} \right) = \frac{\text{Berat ekstrak(gram)}}{\text{Berat simplisia(gram)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

3. Uji Kadar Air

Ekstrak daun kayu putih ditimbang 1 gram, diukur kadar air dengan alat *Moisture Balance*. Pengukuran dilakukan selama 10 menit, diamati sampai kadar dalam satuan persen.

4. Kontrol Kualitas Ekstrak Daun Kayu Putih

a. Penetapan organoleptik

Penetapan secara fisik menggunakan indra untuk menggambarkan warna, bau, rasa, serta tekstur sampel ekstrak daun kayu putih.

b. Skrining fitokimia

1) Identifikasi alkaloid

Digunakan pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Wagner untuk mengidentifikasi alkaloid. Pengujian dengan pereaksi Mayer yaitu HCl 2N sebanyak 1 mL reagen Mayer ditambahkan ke dalam 1 gram ekstrak, hasil positif jika terbentuknya endapan putih. Pengujian pereaksi Dragendorff dengan cara 1 mL reagen Dragendorff ditambahkan ke dalam 1 gram

ekstrak hasil positif jika terbentuknya endapan jingga (Wardhani *et al.*, 2018). Pengujian pereaksi Wagner dengan cara reagen Wagner sebanyak 1 mL ditambahkan ke dalam 1 gram ekstrak hasil positif jika terbentuknya endapan coklat (Endarini, 2016).

2) Identifikasi flavonoid

200 mg ekstrak dalam tabung reaksi dilarutkan menggunakan etanol 70%, kemudian tambahkan 6 tetes HCL pekat lalu ditambahkan sedikit serbuk magnesium. Hasil uji positif ditunjukkan adanya flavonoid jika terbentuk warna jingga (Wardhani *et al.*, 2018).

3) Identifikasi saponin

200 mg ekstrak daun kayu putih ditambahkan air panas 10 mL di tabung reaksi. Digojog tabung reaksi dalam waktu 10 detik. Sampel mengandung saponin jika terbentuknya busa stabil pada saat ditambah HCl 2N dengan tinggi 1 hingga 10 cm (Wardhani *et al.*, 2018).

4) Identifikasi tanin

500 mg ekstrak dalam tabung reaksi ditambahkan air panas 1 mL, digojog hingga homogen, kemudian ditambahkan besi (III) klorida 10% sebanyak 5 tetes. Mengandung tanin terhidrolisis jika terbentuknya warna biru dan jika terbentuk warna hijau kehitaman mengandung tanin terkondensasi (Shubhreet *et al.*, 2019).

5) Identifikasi terpenoid

200 mg ekstrak direaksikan melalui dinding tabung ditambahkan etanol 0,5 mL, asam asetat anhidrat 0,5 mL, serta H_2SO_4 2 mL. Terbentuk warna hijau menandakan positif mengandung terpenoid (Wardhani *et al.*, 2018).

c. Identifikasi pemisahan senyawa dengan metode KLT

1) Persiapan identifikasi dengan KLT

Fase diam yang digunakan yaitu plat silika GF₂₅₄ ukuran 10 cm x 3 cm digaris pada atas dan bawah dengan tinggi 1 cm untuk menentukan batas elusi. Dilakukan optimasi fase gerak dengan tujuan mengetahui fase gerak yang menghasilkan pemisahan optimal. Didapatkan hasil optimasi

fase gerak menggunakan etil asetat : n-heksan (7:3) dalam 10 mL. Dilakukan penjenjutan bejana dengan memotong kertas saring kemudian diletakkan pada gelas bejana yang sudah berisi fase gerak lalu tutup bejana. Gelas bejana dianggap jenuh apabila cairan pengelusi sampai pada bagian atas kertas saring.

2) Pembuatan standar kuersetin 0,1% dan sampel 1%

Kuersetin 2 mg dilarutkan menggunakan metanol p.a 2 mL dalam gelas beker. Larutan sampel ekstrak daun kayu putih 100 mg diencerkan dengan 10 mL akuadest untuk mendapatkan konsentrasi 1% (Rohama *et al.*, 2023).

3) Penotolan ekstrak daun kayu putih dan standar pembanding

Plat silika GF₂₅₄ di oven dengan suhu 50°C dalam waktu 30 menit untuk mengaktivasi plat silika GF₂₅₄. Ekstrak daun kayu putih konsentrasi 1% dan standar kuersetin 0,1%, penotolan dilakukan secara tegak lurus. Plat ditempatkan pada gelas bejana yang sudah jenuh, tutup dengan rapat dan ditunggu hingga fase gerak sampai garis atas (Binugraheni *et al.*, 2022).

4) Identifikasi senyawa flavonoid dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm

Dikeluarkan plat KLT dari gelas bejana lalu dikering anginkan, diamati pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Dibandingkan bercak sampel ekstrak daun kayu putih 1% dan standar kuersetin 0,1% (Binugraheni *et al.*, 2022). Perhitungan nilai R_f dilakukan menggunakan rumus pada persamaan (2).

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut (cm)}} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

5. Persiapan Uji Antibakteri

a. Sterilisasi alat dan bahan

Diterapkan sterilisasi guna mencegah kemungkinan kontaminasi. Tanpa adanya sterilisasi, ada risiko alat dan materi yang digunakan terkontaminasi, yang dapat mengganggu proses pengamatan. Sterilisasi memiliki dua jenis, yaitu panas kering dan basah.

Alat-alat gelas yang perlu disiapkan untuk disterilisasi meliputi tabung reaksi, *beaker glass*, cawan petri, dan batang-L dicuci terlebih dahulu alat-alat gelas yang akan digunakan menggunakan air yang mengalir, kemudian keringkan dengan tisu serta disemprot alkohol 70%. Lubang pada tabung reaksi ditutup menggunakan kapas/kain kasa supaya mencegah kemungkinan terjadinya kontaminasi pada alat setelah dikeluarkan dari oven, kemudian setiap alat dilapisi dengan kertas payung. Disterilisasi menggunakan panas kering dalam oven bersuhu 171°C dengan waktu 1 jam. (Rahmawati, 2019).

Media peremajaan bakteri, *blue tip*, media uji, dan akuades bahan-bahan yang perlu disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Dilakukan sterilisasi media dengan tujuan memastikan bahwa media yang akan digunakan bersih dari mikroorganisme lainnya (Rahmawati, 2019).

b. Pembuatan media

Bakteri diremajakan menggunakan media *Nutrient Agar* (NA) dengan menimbang sejumlah 0,6 gram media NA ditambahkan dalam 30 mL akuades pada erlenmeyer, kemudian aduk menggunakan *hot plate* serta *magnetic stirrer* sampai homogen. Lubang pada erlenmeyer ditutup menggunakan kapas serta bungkus dengan *aluminium foil*. Sterilkan menggunakan autoklaf dengan waktu 15 menit bersuhu 121°C serta tekanan 2 atm.

Uji aktivitas antibakteri dengan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) didasarkan pada kualitasnya sangat baik dalam uji sensitivitas antimikroba. Sebanyak 7,22 gram MHA dilarutkan dalam 190 mL akuades pada labu Erlenmeyer. Larutan tersebut kemudian diaduk hingga tercampur merata dengan bantuan *hot plate* serta *magnetic stirrer*. Lubang pada Erlenmeyer tutup dengan kapas lalu bungkus menggunakan *aluminium foil*, kemudian sterilkan dengan autoklaf dengan waktu 15 menit bersuhu 121°C serta tekanan 2 atm.

c. Peremajaan bakteri

Bakteri pada penelitian ini yaitu *Streptococcus mutans* didapatkan dari MMT Lab RSGM UMY. Dilakukan peremajaan bakteri dengan diinokulasikan dalam media NA miring guna memudahkan penanaman bakteri dan pengamatan. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

d. Pembuatan suspensi bakteri

Diambil 3 ose biakan bakteri *Streptococcus mutans*, kemudian disuspensikan menggunakan NaCl 0,9% 10 mL dilakukan pengecekan suspensi menggunakan turbidity meter hingga mencapai sama dengan standar *Mc Farland* 0,5 (Rahayu *et al.*, 2021).

e. Pembuatan konsentrasi ekstrak daun kayu putih dan kontrol positif

Dibuat variasi konsentrasi ekstrak daun kayu putih menggunakan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. 20 gram ekstrak daun kayu putih dilarutkan menggunakan 20 mL DMSO 10%. Kemudian larutan stok tersebut diencerkan untuk menghasilkan variasi konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80%. Pembuatan kontrol positif dengan mencampurkan 1 mL klorheksidin 0,2% ke dalam 5 mL akuades (Khairiah *et al.*, 2020).

6. Uji Aktivitas Antibakteri

Digunakan difusi cakram untuk pengujian aktivitas antibakteri, sebanyak 100 µL bakteri diinokulasikan ke permukaan MHA, kemudian diratakan menggunakan batang-L. Kertas cakram yang akan digunakan rendam selama 5 menit pada kontrol positif (klorheksidin 0,2%), kontrol negatif (DMSO 10%), serta sampel ekstrak daun kayu putih dengan konsentrasi yang sudah dibuat. Kertas cakram yang sudah direndam diletakan secara aseptis pada MHA menggunakan pinset. Dilakukan inkubasi dengan suhu 37°C dalam kurun waktu 24 jam. Diamati zona hambat serta diukur diameter menggunakan jangka sorong secara horizontal, vertikal, serta diagonal.

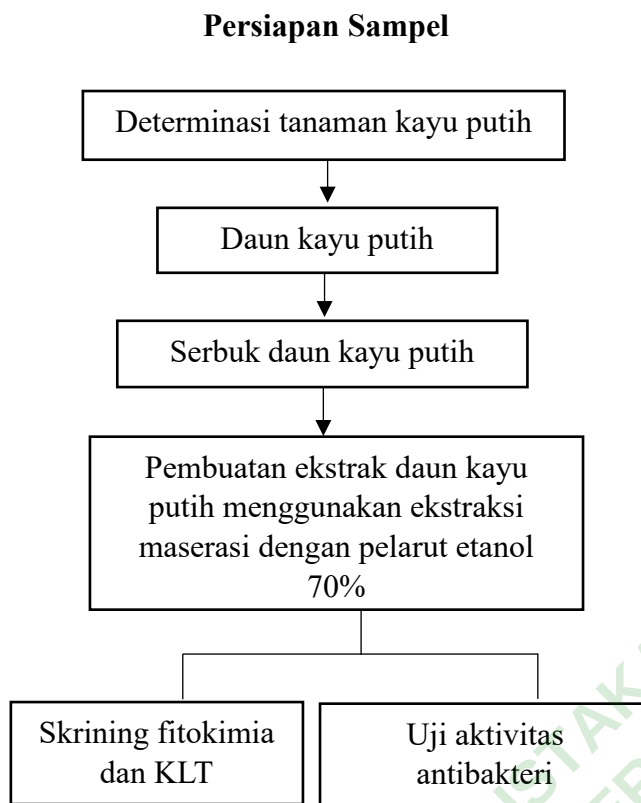
H. Pengolahan dan Analisis Data

Data diproses secara deskriptif dan dianalisis secara statistik menggunakan program SPSS untuk menentukan perbedaan signifikan atau tidak zona hambat

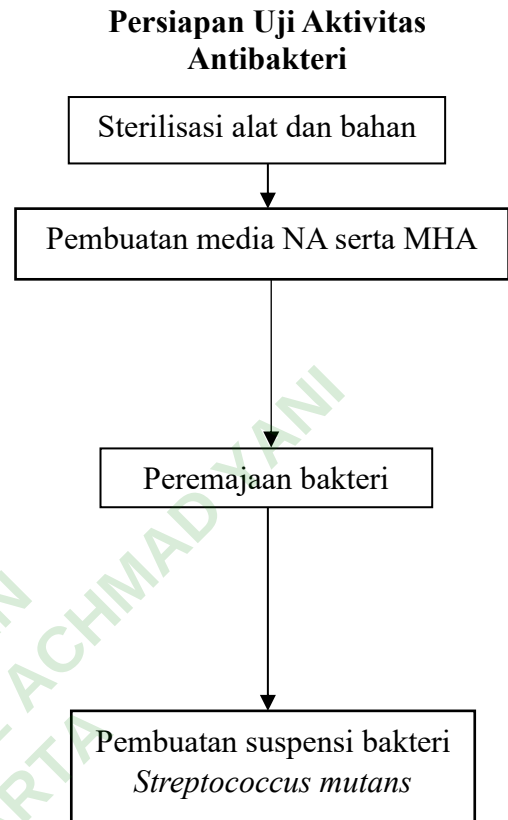
yang terbentuk. Digunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk menentukan normalitas data jika data < 50 , jika tersignifikasi $> 0,05$ maka data yang dihasilkan terdistribusi normal. Uji *Levene's* dilakukan untuk uji homogenitas, data dianggap homogen jika signifikansi $> 0,05$ (Malay, 2022).

Setelah memastikan bahwa data memenuhi persyaratan normalitas serta homogenitas, proses selanjutnya yaitu uji *One-Way ANOVA (Analysis of Varance)* juga dikenal sebagai metode satu arah dengan tingkat kepercayaan 95%, uji ini digunakan untuk mengevaluasi konsentrasi pada zona hambat, yang dapat mencapai nilai signifikan jika $< 0,05$ maka dilanjutkan uji *Post Hoc* untuk membandingkan variasi konsentrasi ekstrak yang digunakan (Malay, 2022).

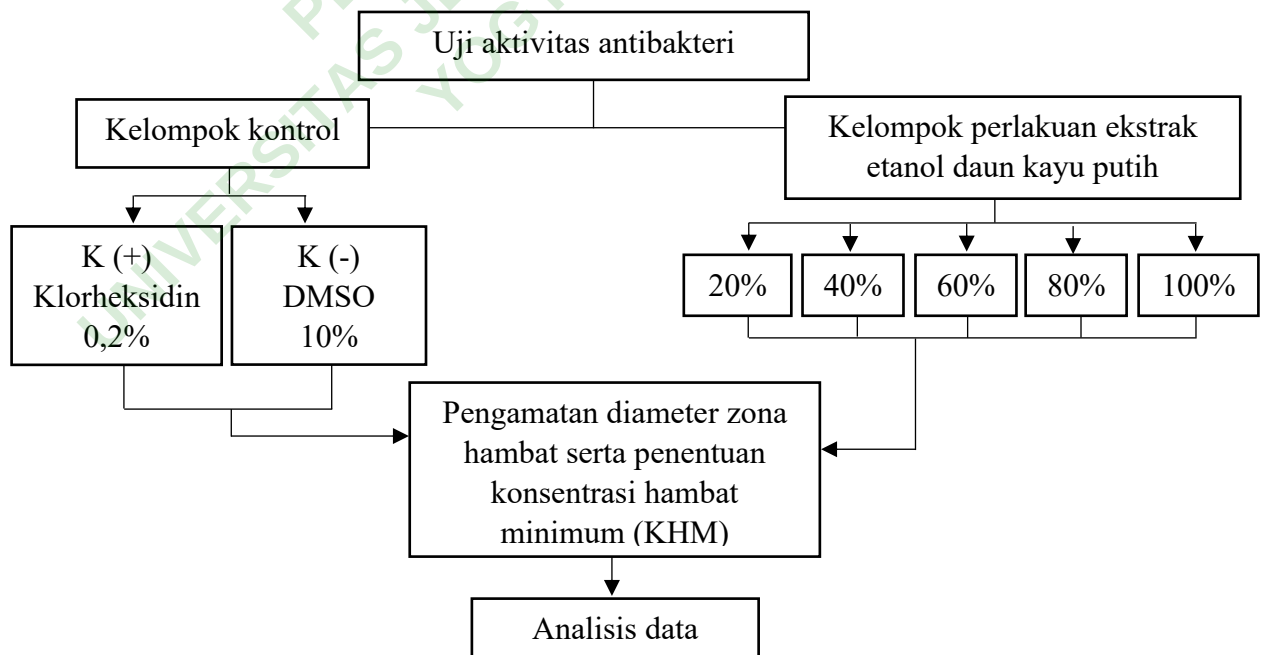
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANU
YOGYAKARTA



Gambar 7. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 8. Persiapan Uji



Gambar 9. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kayu Putih