

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan kerangka eksperimental sebagai metodologi penelitiannya. Sepanjang prosedur penelitian, bahan mentah disiapkan, diidentifikasi, dan diproses dengan cermat. Teknik UAE digunakan untuk ekstraksi daun jati (*Tectona grandis* L.f) menggunakan konsentrasi pelarut etanol yang bervariasi dan lama ekstraksi yang berbeda. Selanjutnya ekstrak yang terkumpul dianalisis dengan metode spektrofotometri UV-Vis untuk memastikan kandungan total flavonoid, sedangkan rendemen ditentukan dengan menghitung jumlah ekstrak akhir yang dihasilkan. Metode difusi cakram (*Kirby Bauer*) digunakan untuk melakukan uji lebih lanjut terhadap ekstrak yang menghasilkan kadar total flavonoid yang paling optimal, untuk melihat aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Universitas Jendral Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian dimulai pada bulan April 2024 dan berlanjut hingga Juni 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi penelitian terdiri dari semua bagian daun jati (*Tectona grandis* L.f) yang dikumpulkan pada titik koordinat -7.838607 dan 110.690161 yakni di Desa Ngawen, Kecamatan Wonosari, Kabupaten Gunung Kidul. Sampel yang diambil dari populasi dipilih melalui metode pengambilan sampling acak.
2. Sampel untuk penelitian ini terdiri dari lima kilogram daun jati yang dikumpulkan melalui metode pengambilan sampling acak. Daun jati yang dipilih berasal dari daun jati yang berwarna hijau muda dan bebas dari cacat atau kekurangan.
3. Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi di Yogyakarta menyediakan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini. Hal ini menjadi langkah penting dalam memastikan kelancaran progres penelitian.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: Variasi konsentrasi pelarut, lama ekstraksi daun jati (*Tectona grandis* L.f) dan konsentrasi ekstrak daun jati (*Tectona grandis* L.f).
2. Variabel terikat: Nilai rendemen, kadar total flavonoid, konsentrasi hambat minimum dan diameter zona hambat aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jati (*Tectona grandis* L.f).
3. Variabel terkendali: Pelarut ekstraksi, waktu panen dan suhu pengeringan daun jati (*Tectona grandis* L.f)

E. Definisi Operasional Variabel

1. Dalam konteks proses ekstraksi, istilah "konsentrasi pelarut" merujuk pada konsentrasi pelarut yang digunakan. Konsentrasi pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah 48%, 70%, dan 96%
2. Lama waktu yang dibutuhkan dalam prosedur ekstraksi disebut waktu ekstraksi. 10 menit, 20 menit, dan 30 menit adalah waktu yang digunakan
3. Metode UAE adalah metode ekstraksi yang menggunakan gelombang ultrasonik untuk meningkatkan efisiensi proses ekstraksi. Gelombang ultrasonik ini menghasilkan gelembung-gelembung kecil yang meledak dan menghasilkan energi mekanik. Energi ini merusak dinding sel sampel dan membebaskan senyawa target yang ingin diekstrak.
4. Suhu yang digunakan selama proses pengeringan disebut sebagai suhu pengeringan. Penelitian ini menggunakan suhu 50°C
5. Istilah "Kadar total flavonoid" merujuk pada konsentrasi senyawa flavonoid yang terkandung dalam sampel. Konsentrasi ini diakui sebagai ekuivalen kuersetin, yang ditentukan dengan menerapkan rumus TFC.
6. Jumlah rendemen dihitung merupakan jumlah rendemen yang dihasilkan dari ekstraksi yang dinyatakan dalam presentase b/b
7. Ketika berbicara tentang zat antibakteri, konsentrasi hambat minimum (KHM) merujuk pada konsentrasi terendah yang mampu menekan perkembangan bakteri.

8. Diameter zona hambat adalah lingkaran area yang jernih atau bening yang mengelilingi kertas cakram tempat sampel ditempatkan. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan penggaris di ketiga bagian dari zona-zona hambat yang tidak sama.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Autoklaf (B-one), ayakan no. 40, *beakerglass* (Iwaki), batang L, bunsen, BSC (Daihan Labtech), cawan petri, cawan porselin, corong, erlenmayer (Iwaki), gelas ukur, grinder, *hotplate*, inkubator, jarum ose, kaca arloji, labu takar (Iwaki), mikropipet, oven, penggaris, pinset, pipettetes dan ukur, sendok tanduk, spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer*), tabung reaksi, timbangan analitik (Ohaus), *ultrasonic bath* (Cole-parmer), waterbath (Mettler WNB 10FC), vortex, *vacuum buchner* (Roker).

2. Bahan

Akuades, aluminium klorida, asam asetat, asam klorida 2N, asam klorida pekat, asam sulfat, ampicilin, BaCl_2 1%, etanol 96% (pa dan teknis), etanol 70 % (pa dan teknis), kuarsetin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), Nutrien Agar (NA), Natrium Klorida 0,9% (fisiologis), pereaksi *Dragendroft*, pereaksi *Mayer*, pereaksi *Wagner*, serbuk daun jati

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan

a. Determinasi tumbuhan

Penelitian ini melibatkan identifikasi daun jati (*Tectona grandis* L.f.) yang dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, yang merupakan bagian dari Fakultas Biologi di Universitas Ahmad Dahlan.

Hal tersebut berguna untuk menjamin keakuratan sampel yang sedang dianalisis, identifikasi ini dilakukan untuk mengonfirmasi keasliannya.

b. Persiapan sampel

Setelah memilih daun jati yang sesuai spesifikasi, sampel kemudian diambil dan dibersihkan dengan air mengalir. Selanjutnya, sampel dikeringkan dalam oven dengan memasang suhu 50°C. Setelah proses pengeringan, sampel kemudian disortir kering. Tahap berikutnya, sampel di ubah ukurannya menjadi lebih kecil dengan bantuan *grinder*, untuk memastikan ukurannya sudah sesuai, sampel kemudian disaring menggunakan saringan dengan ukuran mesh empat puluh..

c. Desain penelitian

Pendekatan penelitian ini menggunakan RAK (Rancangan Acak Kelompok), ada dua komponen yang membentuk desain penelitian RAK: konsentrasi pelarut dan waktu ekstraksi. Pertimbangan pertama adalah konsentrasi pelarut, yang dapat berkisar dari 48% hingga 96%. Faktor kedua adalah lamanya waktu yang diperlukan untuk proses ekstraksi, yang dapat berkisar dari sepuluh menit hingga tiga puluh menit. Setiap desain penelitian dilakukan sebanyak tiga kali, yang menghasilkan total 27 eksperimen yang dilakukan. Sajian desain atau rancangan penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rancangan Penelitian

Konsentrasi etanol (%)	Lama ekstraksi (menit)		
48	10	20	30
70	10	20	30
96	10	20	30

2. Pelaksanaan

a. Pembuatan

Persiapan ekstrak dimulai dengan menimbang sepuluh gram serbuk daun jati, yang kemudian dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer, kemudian ditambahkan pelarut hingga diperoleh rasio 1:10 antara jumlah pelarut dan jumlah serbuk daun jati. Pelarut etanol yang

ditambahkan memiliki konsentrasi dari 48%, 70%, hingga 96% (masing-masing 100 mL). Maserasi yang dibantu oleh gelombang ultrasonik dengan frekuensi 40 kHz dengan suhu 50°C digunakan untuk mengekstraksi sampel. Proses ekstraksi berlangsung selama 10 menit, 20 menit, dan 30 menit berturut-turut. Ekstrak yang diperoleh kemudian disaring menggunakan kertas *Whatman*, dan kemudian menguapkan pelarut dalam *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen ditentukan dengan cara ditimbang ekstrak menggunakan wadah yang telah ditimbang terlebih dahulu, kemudian menimbanginya menggunakan timbangan analitik. Rumus yang terdapat dalam Persamaan 1 digunakan untuk perhitungan rendemen jumlah rendemen yang diperoleh.

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{bobot awal simplisia (gram)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

b. Skrining fitokimia

1) Flavonoid

Pengujian flavonoid menggunakan Uji *Bate-Smith* yaitu dengan cara ekstrak ditimbang 1 gram, ekstrak kemudian ditambahkan HCl pekat kemudian di panaskan dengan waktu 15 menit di atas *waterbath*. Positif mengandung flavonoid apabila muncul warna merah (Minarno, 2015)

2) Saponin

Pengujian saponin, dilakukan dengan cara menimbang 1 g ekstrak yang telah diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, akuades dimasukkan ke sampel hingga benar-benar terendam. Campuran dipanaskan selama 2-3 menit, kemudian dinginkan. Setelah mendingin, campuran dikocok dengan kuat. Menurut Minarno (2015), kemunculan buih yang stabil menandakan bahwa ekstrak positif mengandung saponin.

3) Alkaloid

Setelah 1gram ekstrak dipindahkan ke dalam cawan porselen, ekstrak dilarutkan dalam 5 mL etanol untuk tujuan melakukan uji alkaloid. Selanjutnya, 2 mL larutan diuapkan menggunakan kompor listrik. Residu yang dihasilkan kemudian dibagi ke dalam tiga tabung reaksi dan dilarutkan dalam 5 mL asam klorida. Residu terlarut kemudian dicampur secara terpisah dengan pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorff, dan pereaksi Mayer pada masing-masing tabung reaksi. Terbentuknya endapan coklat pada tabung reaksi pertama, endapan putih atau kuning pada tabung reaksi kedua, dan hasil positif alkaloid pada tabung reaksi ketiga. (Minarno, 2015)

c. Kadar total flavanoid

Berdasarkan temuan studi yang dilakukan oleh Tomayahu *et al* (2016), penentuan total flavonoid dilakukan dengan menggunakan standar kuersetin sebagai bahan referensi.

1) Pembuatan larutan induk kuersetin

Setelah penambahan 10 mg kuersetin ke dalam labu ukur yang bisa menampung 10 mL, labu tersebut kemudian diisi dengan etanol PA sampai dengan mencapai tanda batas. Hasil akhirnya adalah larutan induk yang memiliki konsentrasi 1000 ppm. Larutan induk tersebut diencerkan untuk menghasilkan jumlah konsentrasi yang berbeda. Hal ini dilakukan dengan menempatkan sejumlah larutan induk dalam labu berkapasitas 5 mL, secara khusus masing-masing 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 dan 0,6 mL larutan induk. Serangkaian konsentrasi 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm diperoleh dengan mengisi labu-labu ini dengan etanol PA hingga mencapai tanda batas.

2) Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Cara untuk mengoptimalkan panjang gelombang di mana kuersetin menunjukkan penyerapan maksimum, larutan yang mengandung 0,5 mL larutan standar kuersetin dengan konsentrasi

120 bagian per juta (ppm) dikombinasikan dengan 0,5 mL larutan aluminium klorida (AlCl_3) 10% dan 4 mL larutan asam asetat 5% (CH_3COOH). Campuran yang dihasilkan tercampur rata dan diinkubasi pada suhu kamar selama 45 menit. Selanjutnya spektrum serapan larutan dicatat menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-500 nm.

3) Penentuan *operating time* (OT) kuersetin

Larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm digabungkan dengan 0,5 mL aluminium klorida 10% dan 4 mL asam klorida 5% untuk membuat campuran. Campuran tersebut kemudian digabungkan dengan benar. Pada langkah berikutnya, absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya, dan interval waktu antara setiap pengukuran adalah satu menit. Terdapat rentang waktu dari 0 hingga 60 menit.

4) Pembuatan kurva kalibrasi kuersetin

Cara untuk membuat kurva kalibrasi kuersetin pertama, 0,5 mililiter larutan standar dari setiap tingkat konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, 0,5 mililiter AlCl_3 10% dan 4 mililiter CH_3COOH 5% ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dicampur rata. Setelah itu, campuran dibiarkan selama waktu operasional (OT). Untuk mengukur absorbansi larutan, spektrofotometer UV-Vis digunakan pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan. Setelah itu, nilai serapan digunakan untuk membuat kurva standar dengan menggunakan analisis regresi.

5) Penentuan kadar total flavonoid

Kadar flavonoid total ditentukan dengan menggunakan labu takar 10 mL diisi dengan 200 mg ekstrak dari masing-masing variasi konsentrasi pelarut dan waktu ekstraksi. Tahap berikutnya, etanol PA ditambahkan hingga tanda batas, dan sampel dikocok hingga larut sempurna. Proses ini melibatkan perolehan larutan induk

dengan konsentrasi 20.000 bagian per juta (ppm), dilanjutkan dengan menambahkan 0,5 mL larutan uji yang telah disiapkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, 0,5 mL AlCl_3 10% dan 4 mL CH_3COOH 5% dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan campuran tersebut tercampur rata sebelum didiamkan selama jangka waktu tertentu. Absorbansi campuran pada panjang gelombang yang telah ditentukan kemudian diukur, dengan setiap percobaan diulang tiga kali. Pengukuran yang dihasilkan kemudian dilakukan analisis regresi untuk menghitung konsentrasi larutan uji. Kandungan total flavonoid ekstrak dinyatakan dalam miligram ekuivalen kaempferol (mgEK) per gram ekstrak.

d. Pengujian aktivitas antibakteri

1) Sterilisasi alat dan media

Setiap peralatan yang akan dipegunakan dibersihkan dan dicuci, kemudian dibungkus dengan kertas payung. Tahap selanjutnya dilakukan tahap sterilisasi, peralatan yang tidak tahan pemasanan dilakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan untuk peralatan gelas disterilisasi menggunakan oven pada suhu 171°C selama satu jam.

2) Peremajaan kultur muni bakteri uji

Setelah ditimbang menjadi 0,69gram, media nutrisi agar (NA) dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Untuk melarutnya, ditambahkan 30 mL air suling. Media agar kemudian dipanaskan hingga larut sepenuhnya di atas plat panas. Setelah semua bahan larut, labu Erlenmeyer ditutup rapat dengan kapas, dan autoklaf digunakan untuk membersihkan media. Setelah proses sterilisasi selesai, sepuluh mililiter media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diposisikan pada sudut 45° . Setelah itu, media dibiarkan pada suhu kamar selama tiga puluh menit hingga mencapai tingkat kematangan yang penuh. Satu koloni bakteri kemudian dimasukkan ke dalam media agar yang telah disiapkan. Media ini kemudian

diinkubasi selama satu hari pada suhu 37° Celcius. (Undap et al., 2019)

3) Pembuatan standar *Mc Farland*

Campurkan 9.95 mL larutan asam sulfat dengan 0.5 mL larutan barium klorida, yang memiliki konsentrasi 1% di dalam labu Erlenmayer. Aduk campuran hingga merata dan terbentuk larutan keruh. Selanjutnya dilakukan pengukuran serapan larutan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 625 nanometer. Menurut penelitian Undap *et al* (2019), nilai serapan yang berada dalam renatang 0,08 hingga 0,1 dianggap sesuai dengan standar *McFarland*.

4) Penyiapan inokulum bakteri

Satu koloni bakteri tunggal diekstraksi dan ditempatkan dalam tabung reaksi, kemudian disuspensikan dengan 5 mL larutan saline normal. Tahap selajutnya, dievaluasi kekeruhan pada campuran tersebut dan dibandingkan dengan larutan standar McFarland yang telah dikembangkan sebelumnya. Menurut penelitian Undap *et al* (2019) setelah sampel mencapai kekeruhan yang identik dengan standar, sampel tersebut diencerkan menjadi konsentrasi 10⁶ CFU/ml.

5) Pembuatan larutan uji

Proses persiapan larutan uji dilakukan dengan cara melarutkan 3 g ekstrak yang mengandung kandungan flavonoid tertinggi dalam 3 mL etanol. Hal ini menghasilkan larutan dengan konsentrasi 100%, yang disebut sebagai larutan stok. Tahap selanjutnya, larutan induk diencerkan menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

6) Uji aktivitas antibakteri

Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang secara akurat sebanyak 3,4 g dan dipindahkan ke dalam labu Erlenmayer. Selanjutnya, 100 mL air suling ditambahkan ke dalam labu dan

diaduk hingga tercapai pembubaran sempurna. Campuran kemudian dipanaskan hingga titik didih, dilanjutkan dengan sterilisasi melalui autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang telah disterilkan selanjutnya dipindahkan ke dalam cawan petri yang masing-masing bervolume 15 mL dan dibiarkan hingga memadat selama waktu yang diperlukan.

Larutan ekstrak etanol daun jati yang memiliki kadar total flavonoid tertinggi dan telah dibuat dalam berbagai seri konsentrasi digunakan untuk merendam kertas cakram yang akan digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri. Perendaman dilakukan selama 10 menit, hingga larutan mampu menembus kertas cakram dalam tingkat yang signifikan, hal tersebut dilakukan terhadap semua kertas cakram yang digunakan baik untuk kontrol positif, kontrol negatif dan uji. Kertas cakram yang dipergunakan sebagai kontrol positif direndam menggunakan 10 µg antibiotik ampicillin, kontrol negatif menggunakan cakram kertas yang tidak mengandung bahan kimia apapun.

Tuangkan 0,1 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ke dalam media agar dan distribusikan secara merata menggunakan penyebar berbentuk L yang telah disterilkan. Selanjutnya kertas cakram yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Gunakan penggaris untuk mengukur diameter zona hambatan yang dihasilkan dari berbagai perspektif, rangkap tiga, untuk menghitung ukuran rata-rata dan klasifikasi zona. (Undap et al., 2019)

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Data hasil pengukuran serapan flavonoid digunakan dalam analisis regresi linier dengan persamaan $y = bx + a$, untuk mengetahui konsentrasi flavonoid dalam sampel.
2. Kadar total flavonoid dari ekstrak dapat ditentukan dengan menggunakan rumus yang terdapat pada persamaan 2, yang dapat dilihat disini.

$$\text{TFC} = \frac{\text{C. V. Fp}}{g} \dots \dots \dots (2)$$

Ket :

TFC : *Total Flavonoid Content*

C : Konsentrasi flavonoid (x)

V : Volume ekstrak yang digunakan (ml)

Fp : Faktor pengenceran

g : Berat sampel yang digunakan (gram)

3. Aktivitas antibakteri

Penilaian aktivitas antibakteri melibatkan pengukuran diameter zona hambat dari tiga perspektif berbeda dan menghitung rata-rata pengukuran tersebut. Selanjutnya, hasilnya diklasifikasikan berdasarkan tingkat aktivitas antibakteri yang ditunjukkan. Langkah selanjutnya adalah menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) untuk memastikan konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

4. Analisis data

Penelitian ini menggunakan analisis statistik melalui software SPSS untuk menguji hubungan antara variasi konsentrasi pelarut dan lama ekstraksi dengan fluktuasi kadar dan keluaran flavonoid. Dengan mengukur diameter zona hambat, perbandingan dibuat antara kedua kelompok pada konsentrasi ekstrak yang berbeda untuk memastikan adanya varian statistik yang signifikan. Setelah itu, uji statistik dilakukan untuk memastikan data normal dan konsisten. Untuk pemeriksaan ini, uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene's* digunakan. Karena terdapat kurang dari lima puluh pengamatan, maka diterapkan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat apakah semuanya normal. Asumsi distribusi normal dibuat ketika nilai signifikansi lebih tinggi dari 0,05. Untuk memeriksa apakah data konsisten di semua kelompok, *Levene's* menggunakan uji homogenitas. Homogenitas data dinilai jika nilai signifikansi lebih tinggi dari 0,05. Dengan menggunakan teknik yang dikenal sebagai analisis varians satu arah (ANOVA), analisis tambahan dilakukan pada data yang terdistribusi secara teratur dan cukup konsisten.