

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan yaitu eksperimental untuk membandingkan kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

B. Lokasi dan Waktu

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

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi pada penelitian ini adalah daun kayu putih yang diambil dari Pedukuhan Kepek 1, Kalurahan Banyusoco 2, Kecamatan Playen, Kabupaten Gunung Kidul, Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta
2. Sampel pada penelitian ini yaitu daun kayu putih sebanyak 2.000 gram yang masih segar berwarna hijau, dan utuh.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variasi konsentrasi ekstrak etanol daun kayu putih.

2. Variabel terikat

Diameter zona hambat pada bakteri *Propionibacterium acnes*, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

3. Variabel terkontrol

Pelarut ekstraksi, kriteria daun yang digunakan, waktu inkubasi dan suhu pengeringan.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun kayu putih merupakan sediaan pekat atau kental daun kayu putih yang diperoleh dari hasil ekstraksi menggunakan pelarut yang sesuai.
2. Zona hambat bakteri merupakan zona bening atau daerah bersih disekeliling sumuran yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.
3. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ialah konsentrasi terendah yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri.

F. Alat dan Bahan

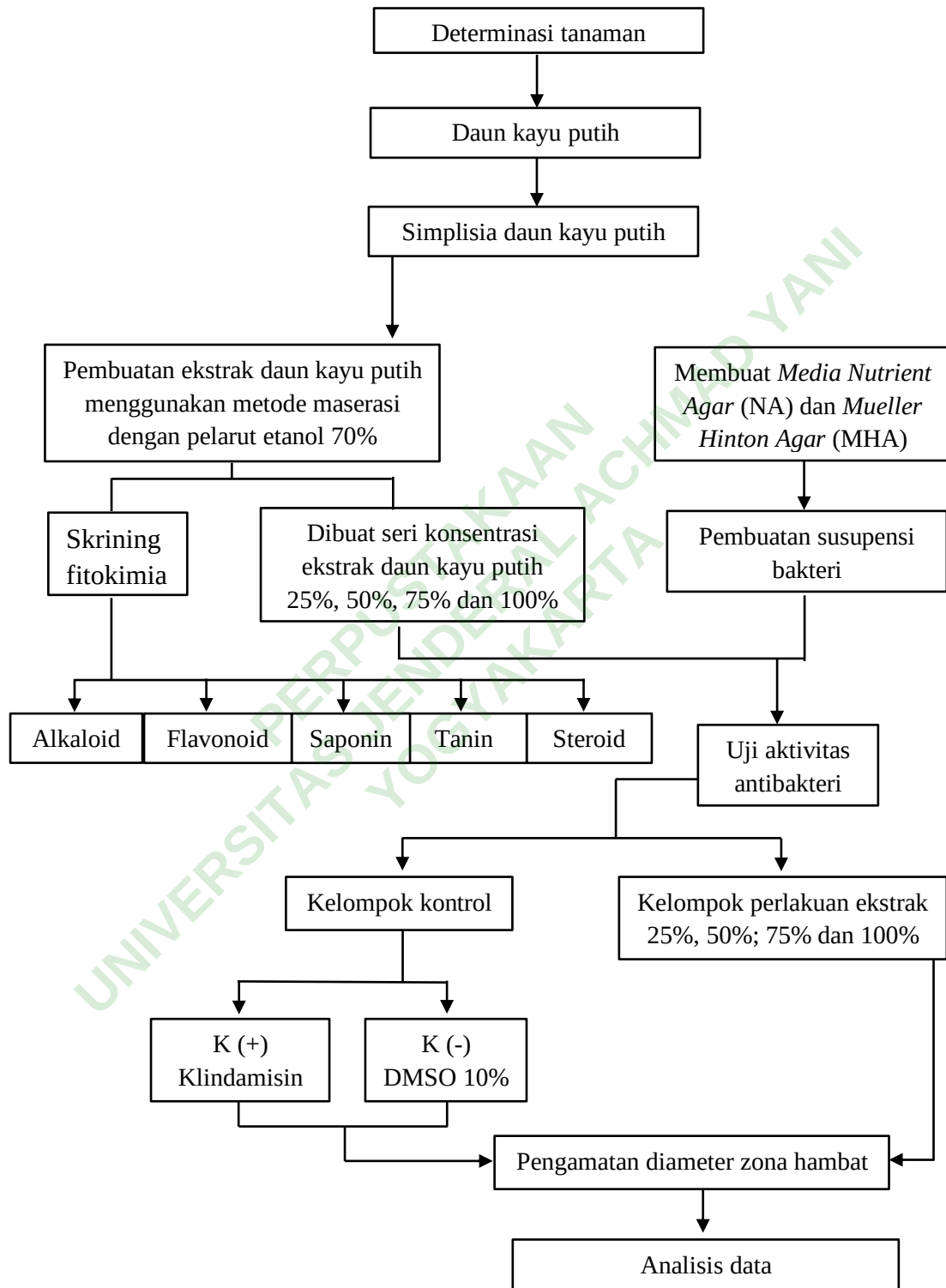
1. Alat

Pada proses pembuatan ekstrak digunakan alat sebagai berikut, yaitu: ayakan 40 mesh, gelas ukur 50 mL, gelas beaker 1000 mL, gunting, grinder kain mori, kompor listrik, oven, spatula kayu, toples besar, neraca analitik. Alat untuk uji organoleptik dan uji fitokimia yaitu, gelas ukur 10 mL, kaca arloji, pipet tetes, pipet ukur, plat tetes, rak tabung, tabung reaksi, timbangan analitik. Alat untuk uji aktivitas antibakteri adalah autoklaf, *Biological Safety Cabinet*, batang L, *bluetip*, *beaker glass* 250 mL, cawan petri, *cork borer*, *hotplate*, inkubator, jarum ose, jangka sorong, labu takar 5 mL, lemari pendingin, erlenmeyer 250 mL, labu takar 10 mL, mikropipet 100-1000 μ L dan 20-200 μ L, *magnetic stirrer*, oven, pembakar bunsen, gelas ukur 50 mL, tabung reaksi, turbidimeter, *yellowtip*.

2. Bahan

Bahan yang dipakai untuk membuat ekstrak dan uji fitokimia adalah serbuk daun kayu putih, etanol 70% dan kain mori dan kertas saring, asam sulfat 1% akuades, ekstrak daun kayu putih, etanol 70%, etil asetat, FeCl_3 1%, HCL 2N, pereaksi *Dragendroff*, pereaksi *Mayer*, pereaksi *Wagner*, Mg. Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu aluminium foil, *P. acnes* ATCC 6919 yang didapatkan dari laboratorium PT. Agritama Sinergi Inovasi, dimetil sulfoksida 10%, ekstrak daun kayu putih, kasa, kapas, klindamisin, *Muller Hinton Agar*, *Nutrient Agar* dan Natrium klorida 0,9%

G. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 4. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tanaman kayu putih dideterminasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta, tujuan determinasi agar meminimalisir terjadinya kesalahan saat pengambilan tanaman,

2. Persiapan Sampel

Sebanyak 2.000 gram daun kayu putih dibersihkan menggunakan air mengalir, dikeringkan dengan oven di suhu 45°C hingga kering, selanjutnya dihaluskan dengan grinder, lalu diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh, simpan di dalam toples kaca (Suhendar & Fathurrahman, 2019).

3. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kayu Putih

Ditimbang 400 gram serbuk daun kayu putih ditambahkan etanol 70% 4000 mL (perbandingan 1:10) dan di maserasi 3×24 jam ditempat sejuk serta terhindar dari sinar matahari dan pengadukan dilakukan setiap tiga jam sekali dengan durasi lima menit, setelah 3 hari kemudian diambil filtrat yang pertama dengan cara disaring menggunakan kain mori, kemudian ampas hasil penyaringan pertama diremaserasi hingga 24 jam, hasil maserasi disaring lagi dengan kain mori sampai dihasilkan filtrat kedua, kemudian hasil kedua filtrat dicampurkan dan diuapkan menggunakan kompor listrik dan panci pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kental (Hakim *et al.*, 2019). Perhitungan rendemen menggunakan rumus pada persamaan 1.

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

4. Kontrol Kualitas Ekstrak Etanol Daun Kayu Putih

a. Uji Organoleptik

Uji yang dilakukan menggunakan alat indra manusia, pengamatan uji organoleptik meliputi bentuk, warna, dan aroma.

b. Uji Fitokimia

1) Identifikasi Alkaloid

Ditimbang 1 gram ekstrak lalu dimasukkan ke tabung reaksi, tambahkan dengan 9 mL akuades dan 1 mL asam klorida 2N,

dipanaskan 2 menit menggunakan penangas air ditunggu hingga dingin lalu dilakukan penyaringan sampai didapatkan filtratnya. Hasil filtrat yang diperoleh dibagi menjadi 3 lalu masukkan kedalam tabung reaksi. Tabung ke 1 ditambahkan reagen *Mayer* 5 tetes, apabila terlihat endapan berwarna putih, sampel mengandung alkaloid. Pada tabung ke 2 ditambahkan 5 tetes pereaksi *Dragendoff*, lalu diamati jika terbentuk endapan warna jingga maka sampel tersebut mengandung alkaloid. Tabung ke 3 ditambahkan 5 tetes pereaksi *Wagner*, adanya endapan berwarna coklat maka sampel tersebut mengandung alkaloid (Nurjannah *et al.*, 2022).

2) Identifikasi Flavonoid

Ditimbang 0,3 gram ekstrak, tambahkan 0,2 gram Mg, kemudian ditambahkan 1 mL HCL pekat digojog, apabila berubah warna menjadi merah atau jingga, positif flavonoid (Afriani *et al.*, 2016).

3) Identifikasi Saponin

0,5 gram ekstrak dilarutkan dengan 10 mL air panas lalu digojog, tambahkan satu tetes HCL 2N dan digojog 10 detik. Saponin dikatakan positif apabila timbul busa dengan ketinggian 1-10 cm yang stabil selama 10 menit (Rahmasiahi *et al.*, 2023)

4) Identifikasi Tanin

0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL air panas, digojog sampai merata, selanjutnya ditambahkan 3 tetes FeCl_3 1% lalu amati perubahan yang terjadi. Perubahan warna menjadi hitam atau biru tua menandakan positif tanin (A'yun & Laily, 2015).

5) Identifikasi Steroid dan Terpenoid

0,5 gram ekstrak ditambah 2 mL etil asetat lalu diteteskan di atas plat tetes didiamkan hingga mengering, setelah mengering ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 dan diamati. Positif terpenoid jika warna berubah menjadi kuning maupun merah, positif steroid apabila perubahan warna menjadi hijau (Pudiarifanti & Farizal, 2022).

5. Persiapan Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Erlenmeyer serta tabung reaksi pada lubangnya ditutup dahulu menggunakan kapas yang sudah dibalut menggunakan kasa, selanjutnya dibungkus menggunakan kertas payung, disterilisasi menggunakan oven dengan durasi waktu satu jam di suhu 171°C. Sterilisasi untuk cawan petri, *bluetip*, *yellowtip*, dan bahan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm (Athaillah & Sugesti, 2020)

b. Pembuatan Media

1) Media *Nutrient Agar* (NA)

Sebanyak 0,6 gram *Nutrient Agar* (oxoid) dimasukkan kedalam erlenmeyer, ditambahkan 30 mL akuades, dihomogenkan dengan *hotplate* menggunakan *magnetic stirrer*, setelah homogen erlenmeyer dibalut menggunakan aluminium foil, disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm. 5 mL larutan dituangkan ke tabung reaksi dan didiamkan sampai memadat pada posisi miring (Nor *et al.*, 2018).

2) Media *Muller Hinton Agar* (MHA) Untuk Uji Aktivitas Antibakteri.

Ditimbang 7,22 gram MHA (oxoid) ditambahkan dengan 190 mL akuades dalam erlenmeyer. MHA diaduk menggunakan magnetic stirrer hingga bahan benar-benar larut (jika sudah berwarna kuning bening, menandakan bahwa MHA sudah tercampur secara baik dengan akuades) kemudian sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Selanjutnya dipindahkan ke cawan petri 20 mL, lalu didiamkan sampai memadat, kemudian media di simpan di dalam lemari es (Sarmira *et al.*, 2021).

c. Peremajaan Kultur Murni Bakteri

Diambil 2 ose bakteri *Propionibacterium acnes*, diinokulasi dipermukaan media NA, setelah bakteri diinokulasikan lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

d. Pembuatan DMSO 10%

10 mL DMSO dimasukkan kedalam labu takar 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas.

e. Pembuatan Varian Konsentrasi

Dibuat seri konsentrasi dengan cara dibuat dahulu larutan stok 100% dengan cara ditimbang ekstrak 10 gram dan dilarutkan menggunakan larutan DMSO 10% sebanyak 10 mL, selanjutnya seri konsentrasi 25%, 50% dan 75% dibuat dengan cara pengenceran dari larutan stok, untuk konsentrasi 100% tidak perlu dilakukan pengenceran.

f. Pembuatan Suspensi Bakteri

Dimasukkan 10 mL Natrium klorida 0,9% ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 ose koloni bakteri uji dan dikocok hingga homogen (Anita *et al.*, 2020). Diukur menggunakan alat turbidimeter dengan kekeruhan setara dengan *McFarland* 0,05 dengan jumlah koloni $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Jika larutan terlalu keruh maka diencerkan menggunakan NaCl, tetapi jika larutan terlalu encer maka ditambahkan lagi bakteri.

g. Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan klindamisin konsentrasi 0,03%, dibuat menggunakan sediaan klindamisin 300 mg, dengan cara ditimbang klindamisin 3,8 gram dan dilarutkan dengan 10 mL DMSO 10%.

h. Uji Aktivitas Antibakteri

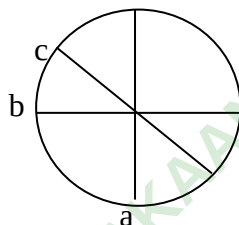
Diinokulasikan 100 μ L suspensi bakteri kedalam cawan petri yang berisi media, diratakan dengan batang L. Setelah kering dibuat 4 sumuran menggunakan alat *cork borer* yang memiliki diameter 6 mm, kemudian dimasukan 50 μ L masing-masing 4 seri konsentrasi sampel selanjutnya dibuat lagi 2 lubang sumuran pada cawan petri yang berbeda lalu dimasukkan masing-masing kontrol ke dalam sumuran (3 kali replikasi). Diinkubasi 24 jam dengan suhu 37°C, kemudian diukur zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran dengan jangka sorong (Fitriyanti *et al.*, 2023).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan Aktivitas Antibakteri

Pengukuran zona bening dilakukan secara horizontal (b mm) vertikal (a mm), dan diagonal (c mm) menggunakan jangka sorong, selanjutnya hasil dari pengukuran ketiganya dijumlah lalu dibagi 3 (n) atau dicari jumlah rata-ratanya (Jumardin & Masnawati, 2015). Perhitungan diameter zona hambat menggunakan rumus persamaan 3.

$$\text{Diameter zona hambat} = \frac{a+b+c}{3} \dots\dots\dots(3)$$



Gambar 5. Diagram Pengukuran Zona Hambat

Keterangan :

a: Diameter vertikal

b: Diameter horizontal

c: Diameter diagonal

Klasifikasi zona hambat dapat dilihat pada tabel 2

Tabel 2. Klasifikasi Zona Hambat

Diameter (mm)	Kategori
≤5	Lemah
6-10	Sedang
11-20	Kuat
≥20	Sangat kuat

Sumber: Surjowardojo et al., (2015)

2. Analisis Data

Analisis data dimulai dengan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk*, dimana data di kategorikan normal apabila di atas 0,05 selanjutnya uji homogenitas dilakukan dengan uji *Levene* dengan nilai signifikan > 0,05. Apabila data memenuhi kedua kriteria tersebut maka dilakukan uji ANOVA (Hasanah et al., 2023).