

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian ialah penelitian eksperimental dengan membandingkan aktivitas antara kelompok perlakuan dan kontrol.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

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

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi penelitian ialah daun pandan wangi yang tumbuh di perkebunan Jopa Green yang berlokasi di Jalan Pasir Luhur, Desa Sukoharjo, Kecamatan Ngaglik, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel penelitian ialah daun pandan wangi yang berwarna hijau tua, segar serta utuh diambil sebanyak 3 kilogram. Sampel bakteri pada penelitian ini didapat dari Laboratorium *Molecular Medicine and Therapy* Rumah Sakit Gigi Mulut Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas: variasi konsentrasi dari ekstrak etanol daun pandan wangi
2. Variabel Terikat: konsentrasi hambat minimum serta diameter zona hambat dari bakteri *S. mutans* ATCC 25175.
3. Variabel Terkendali: bagian daun yang digunakan, pelarut ekstraksi, , suhu pengeringan tanaman, waktu inkubasi media.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun pandan wangi merupakan sediaan pekat diperoleh dari hasil ekstraksi dengan metode maserasi pelarut etanol 70%.
2. Diameter zona hambat pada bakteri uji ialah zona bening disekitar kertas cakram yang tidak ditumbuhi bakteri serta diukur secara diagonal, horizontal serta vertikal dengan alat jangka sorong.
3. Konsentrasi hambat minimum (KHM) ialah konsentrasi terkecil dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* ATCC 25175.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Alat Pembuatan Simplisia dan Ekstrak
Ayakan 40 mesh, gelas beaker 1000 mL (Iwaki), gelas ukur 50 mL (Iwaki), grinder, gunting, kain mori, kompor listrik (Maspion), oven, toples kaca, spatula kayu, timbangan neraca analitik (Ohaus).
 - b. Alat Uji Organoleptik dan Uji Fitokimia
Gelas ukur 10 mL (Iwaki), gelas beaker 100 mL (Iwaki), pipet tetes, *hotplate* (IKA HS-7), kertas saring, tabung reaksi (Iwaki), timbangan neraca analitik (Ohaus).
 - c. Alat Uji Aktivitas Antibakteri
Autoclave (Gea LS-B50L), Biologi Safety Cabinet (Daihan Labetch), gelas beaker 250 mL (Iwaki), gelas ukur 50 mL (Iwaki), erlenmeyer 250 mL (Iwaki), cawan petri, *Hotplate* (IKA HS-7), *magnetic stirrer*, mikropipet 20-200 μ L serta 100-1000 μ L, inkubator (Memmert IN30), jangka sorong, jarum ose, lemari es, labu takar 5 mL, bunsen, oven, tabung reaksi (Iwaki).
2. Bahan
 - a. Bahan Pembuatan Simplisia dan Ekstrak
Etanol 70% dan daun pandan wangi.

b. Bahan Uji Skrining Fitokimia

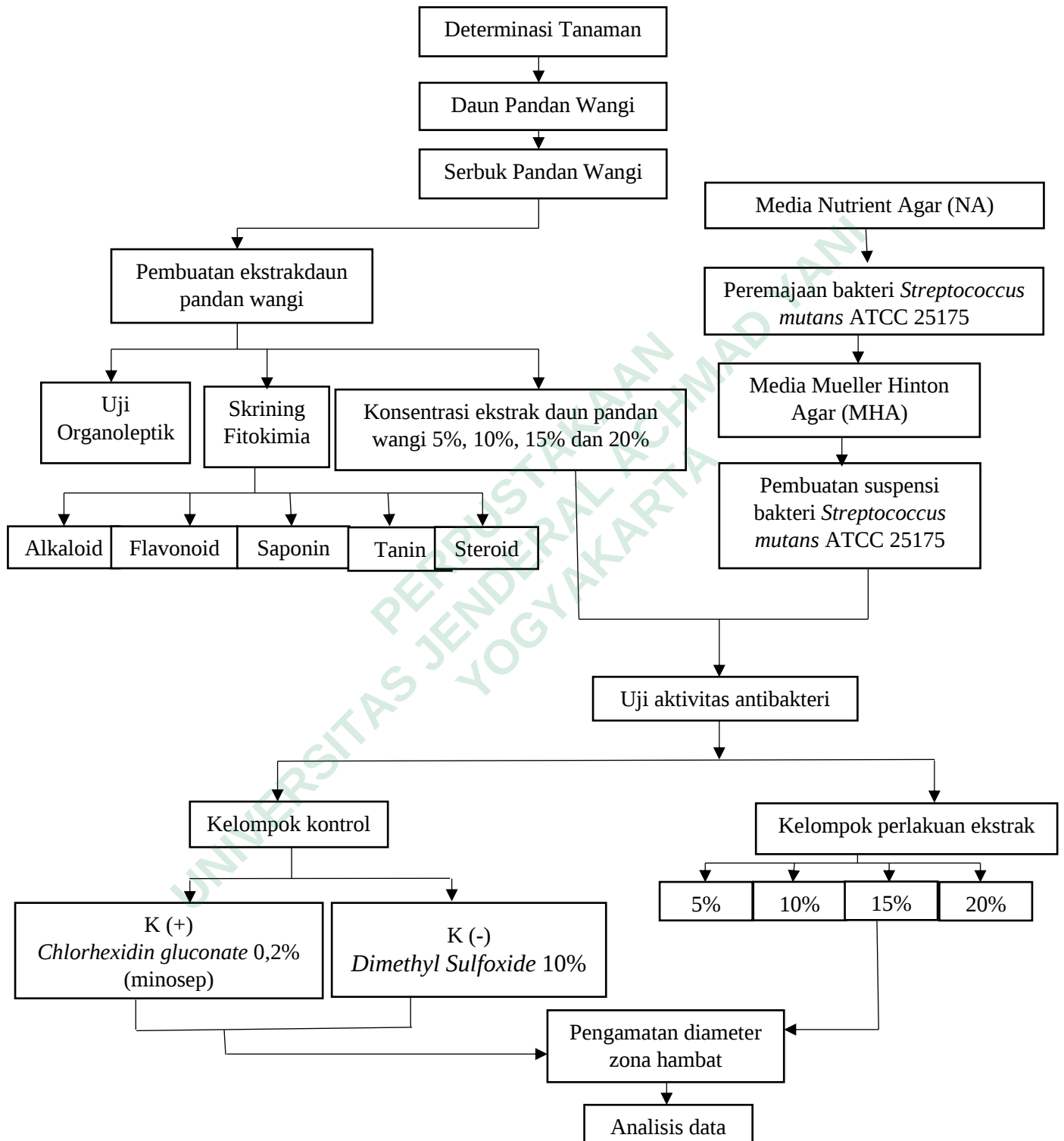
Aquadest, asam sulfat 1%, ammonia pekat, asam asetat glasial, etanol 70%, ekstrak etanol daun pandan wangi, etil asetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), FeCl_3 1%, HCl 2N, serbuk Mg, pereaksi *Dragendrof*, *Mayer* dan *Wagner*.

c. Bahan Uji Aktivitas Antibakteri

Aquadest, alkohol, *aluminium foil*, asam sulfat 1%, barium klorida 1%, *bluetip*, *yellowtip*, *cotton swab* steril, *S. mutans* ATCC 25175, *chlorhexidin gluconate* 0,2%, *Dimethyl Sulfoxide* 10%, ekstrak etanol daun pandan wangi, kapas, kassa, *Sodium Chloride* (NaCl) 0,9% media MHA dan NA, kertas cakram (*paper disk blank*).

PERPUSTAKAAN
JENDERAL ACHMAD YAHYI
UNIVERSITAS YOGYAKARTA

G. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 4. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta, tujuan untuk mengurangi terjadinya kesalahan mengambil tanaman serta mengetahui kebenaran dari identitas tanaman yang diuji.

2. Preparasi Sampel

a. Pembuatan Serbuk Daun Pandan Wangi

Daun pandan wangi dikumpulkan sebanyak 3 kilogram. Dilakukan pencucian bersih dengan air yang mengalir, untuk mengurangi dari kotoran yang melekat di sampel. Sampel yang sudah dicuci bersih, dirajang serta dikeringkan dengan oven selama 48 jam atau hingga kering (ditandai dengan jika diremas daun menjadi hancur) pada suhu 50°C. Simplisia kering digrinder hingga menjadi serbuk halus, serta diayak dengan ayakan 40 mesh. Serbuk hasil ayakan ditimbang dan disimpan kedalam wadah yang sudah kering serta bersih (Komala *et al.*, 2017).

b. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi

Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut etanol 70% dalam proses maserasi dengan perbandingan serbuk serta pelarut pada proses maserasi yaitu 1:10. Daun pandan wangi ditimbang 400 gram, kemudian dimasukkan kedalam toples kaca serta tambahkan pelarut etanol 70% sebesar 4000 mL. Ditutup toples kaca, kemudian dimaserasi selama tiga hari di tempat sejuk serta terlindung dari cahaya luar, dilakukan pengadukan selama kurang lebih 5 menit setiap 8 jam. Hasil maserasi disaring dengan kain mori terlebih dahulu kemudian disaring lagi dengan kertas saring hingga dihasilkan filtrat hasil maserasi yang disebut dengan filtrat 1. Ampas hasil penyaringan pertama diremaserasi kembali menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 1000 mL selama 48 jam. Hasil remaserasi disaring dengan kain mori terlebih dahulu kemudian disaring lagi dengan kertas saring hingga mendapatkan filtrat dua. Filtrat satu serta dua kemudian digabungkan, diuapkan diatas alat kompor listirk pada suhu 50°C hingga mendapatkan

ekstrak kental (Assauqi *et al.*, 2023). Hitung rendemen ekstrak menggunakan rumus pada persamaan 1.

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

3. Uji Organoleptik dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi

a. Uji Organoleptik

Uji ini dilakukan dengan pengamatan dengan visual yang melibatkan pengamatan bau, bentuk, serta warna ekstrak yang uji (Gangga *et al.*, 2017).

b. Skrining Fitokimia

1) Identifikasi Alkaloid

Ditimbang 0,5 gram ekstrak, masukkan sampel ke dalam tabung reaksi serta tambahkan etanol 70% sebanyak 2 mL. Kemudian tambahkan ammonia pekat sebanyak 5 tetes. Campuran disaring menggunakan kertas saring, filtrat ditambahkan 2 mL asam sulfat 2N, hingga membentuk 2 lapisan pada tabung reaksi. Lapisan bawah dipindahkan kedalam tiga tabung reaksi. Tabung pertama tambahkan pereaksi *Mayer* sebesar 1 tetes, jika terbentuk endapan berwarna putih menunjukkan positif alkaloid. Pada tabung kedua tambahkan pereaksi *Dragendorf* 1 tetes, jika terdapat endapan berwarna jingga menunjukkan positif alkaloid. Tabung 3 tambahkan pereaksi *Wagner* 1 tetes, jika terdapat endapan berwarna coklat menunjukkan positif alkaloid. Jika salah satu atau salah dua positif mengandung alkaloid maka dituliskan positif tetapi dituliskan juga pereaksi mana yang positif terkandung alkaloid (Kiyato *et al.*, 2022).

2) Identifikasi Flavonoid

Ditimbang 0,5 gram ekstrak, masukkan kedalam tabung reaksi. Tambahkan etanol 70% sebanyak 5 tetes, gojog hingga homogen. Tambahkan 0,2 gram serbuk Magnesium serta HCl pekat sebanyak 5 tetes kedalam tabung reaksi, jika terbentuk warna orange, merah atau

kuning di larutan maka menunjukkan positif mengandung flavonoid (Kiyato *et al.*, 2022).

3) Identifikasi Saponin

Ditimbang 0,5 gram ekstrak, masukkan kedalam tabung reaksi. Tambahkan aquadest sebanyak 2 mL, kemudian gojog hingga homogen. Panaskan campuran selama 3 menit. Dinginkan campuran, campuran yang sudah dingin digojog kembali. Jika terdapat busa yang stabil selama kurang lebih 30 detik maka positif terkandung saponin (Kiyato *et al.*, 2022).

4) Identifikasi Tanin

Ditimbang 0,5 gram ekstrak, masukkan kedalam droplate. Tambahkan FeCl_3 1% sebanyak tiga tetes. Jika terbentuk larutan berwarna biru tua atau warna hitam kehijauan maka menyatakan positif tanin (Kiyato *et al.*, 2022).

5) Identifikasi Steroid dan Terpenoid

Ditimbang 0,5 gram ekstrak, masukkan kedalam droplate. Tambahkan satu tetes asam asetat glasial serta dua tetes H_2SO_4 kedalam tabung reaksi. Jika terbentuk larutan berwarna ungu atau warna jingga, maka positif mengandung steroid dan terpenoid (Kiyato *et al.*, 2022).

4. Persiapan Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Alat seperti tabung reaksi yang telah dicuci, dibersihkan selanjutnya disemprot dengan alkohol 70%. Untuk mencegah kontaminasi, alat yang mempunyai lubang ditutup dengan kapas yang terbungkus kassa. Sebelum dimasukkan ke dalam oven, bungkus alat dengan kertas payung. Disterilkan menggunakan oven dengan suhu 171°C dengan durasi waktu 1 jam. Peralatan yang tidak tahan pada kondisi panas seperti *bluetip* serta *yellowtip* kemudian cawan petri disterilkan menggunakan autoklaf, alat yang telah dicuci, dibersihkan kemudian disemprot dengan alkohol 70% dibungkus dengan kertas payung kemudian di *wrapping* plastik. Diautoklaf dengan suhu 121°C pada

tekanan 1 atm dalam waktu 15 menit. Cawan petri yang telah di sterilisasi menggunakan autoklaf, selanjutnya dikeringkan dengan oven (Tunny *et al.*, 2021). Jarum ose disterilkan menggunakan bunsen hingga memijar (Misna & Diana, 2016).

b. Pembuatan Media

1) Media *Nutrient Agar* (NA) Untuk Peremajaan Bakteri

Ditimbang 0,8 gram NA dan tambahkan 40 mL aquadest kedalam erlenmeyer aduk hingga homogen. Kemudian dituang kedalam 6 tabung reaksi yang telah disterilkan, masing-masing berisi 5 mL. Tabung reaksi yang berisikan media kemudian disterilisasi, Autoklaf digunakan untuk mensterilkan media pada suhu 121°C dengan durasi waktu 15 menit serta tekanan 1 atm. Posisikan tabung dalam keadaan miring hingga media memadat. Media yang telah memadat disimpan di dalam lemari es (Chasani *et al.*, 2015).

2) Media *Mueller Hinton Agar* Untuk Uji Aktivitas Antibakteri

Ditimbang 5,32 gr MHA serta tambahkan 140 mL aquadest kedalam labu erlenmeyer. MHA dipanaskan saat diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga bahan tercampur. Proses sterilisasi dilakukan dengan autoklaf dengan durasi waktu 15 menit pada suhu 121°C serta tekanan 1 atm. Tuangkan campuran kedalam 6 cawan petri sebesar 20 mL serta tunggu sampai memadat. Media yang telah memadat disimpan di dalam lemari es (Utomo *et al.*, 2018).

c. Pembuatan Larutan Standar *McFarland* 0,5

1) Pembuatan Larutan Barium Klorida 1 %

Ditimbang 0,5 gram barium klorida dengan teliti. Larutkan dalam labu takar 50 mL menggunakan aquadest. Tambahkan aquadest sampai tanda batas lalu dihomogenkan. Disimpan larutan BaCl₂ 1% di lemari es (Rosmania dan Yanti, 2020).

2) Pembuatan Larutan Asam Sulfat 1 %

Siapkan labu ukur berkapasitas 100 mL dan tuangkan 50 mL aquadest ke dalamnya. Kemudian pipet dengan hati-hati 0,520 mL asam sulfat pekat serta tuang melalui dinding kedalam labu ukur 100 mL yang berisi aquadest. Tambahkan kembali sisa aquadest 50 mL atau sampai tanda batas lalu dihomogenkan. Disimpan asam sulfat 1% di suhu kamar (Rosmania dan Yanti, 2020).

3) Pembuatan Larutan *McFarland* 0,5

Campurkan larutan BaCl_2 1 % 0,05 mL dan larutan H_2SO_4 1% 9,95 mL didalam tabung reaksi. Vortex campuran hingga tercampur sempurna (Rosmania & Yanti, 2020). Ukur absorbansi campuran menggunakan alat Spektrofotometer UV-Vis yang diatur pada panjang gelombang 625 nm dengan syarat nilai absorbansi yang terukur ialah 0,08 sampai 0,1. Disimpan larutan didalam lemari es (Dalyn, 2014 dalam Yanti *et al.*, 2021).

d. Peremajaan Bakteri *Streptococcus mutans*

Peremajaan bakteri dilaksanakan dengan menumbuhkan bakteri *S. mutans* ATCC 25175 pada tabung reaksi berisikan media *Nutrient Agar* steril. Isolat bakteri digoreskan pada media NA miring. Proses penanaman bakteri dilakukan didalam BSC. Diinkubasi tabung reaksi yang telah digores bakteri dalam inkubator dalam waktu 24 jam dengan suhu 37°C (Aviany dan Pujiyanto, 2020).

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Larutan *Sodium Chloride* 0,9% steril diambil sebesar 10 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian diambil bakteri yang sudah diremajakan dengan jarum ose steril sebanyak satu sampai tiga ose. Gojog campuran hingga homogen, bandingkan larutan suspensi yang dibuat dengan larutan *McFarland* 0,5. Standar kekeruhan *McFarland* 0,5 sebanding dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Jika suspensi bakteri terlalu keruh maka diencerkan kembali dengan *Sodium Chloride* 0,9%,

sedangkan jika suspensi bakteri kurang keruh maka ditambahkan bakteri *S. mutans* ATCC 25175 (Rahayu *et al.*, 2021).

f. Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Uji

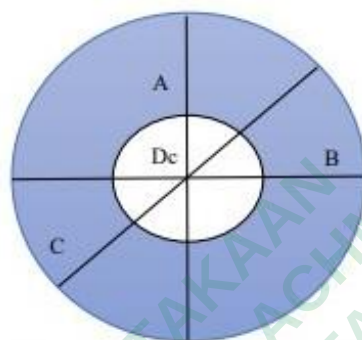
Ekstrak etanol daun pandan wangi dibuat dalam 4 seri konsentrasi yaitu 5%, 10%, 15% serta 20%. Dibuat larutan stok konsentrasi 100% dengan ditimbang 5 gram ekstrak dan dilarutkan menggunakan pelarut *Dimethyl Sulfoxide* 10% ad 5 mL. Perhitungan pengenceran menggunakan rumus $V1 \times M1 = V2 \times M2$. Penjelasan lengkap mengenai perhitungan dapat ditemukan pada **Lampiran 11** (Adha dan Ibrahim, 2021).

g. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan pada media MHA. Suspensi bakteri *S. mutans* ATCC 25175 diambil sebesar 100 μ L, diratakan menggunakan *cotton swab* steril di atas permukaan agar yang sudah memadat. Siapkan kertas cakram (*paper disk blank*) steril, direndam kertas cakram (*paper disk blank*) pada sampel sesuai dengan konsentrasi (5%, 10%, 15% serta 20%) kemudian kontrol positif yaitu *chlorhexidin gluconate* 0,2% (minosep) dan kontrol negatifnya yaitu *Dimethyl Sulfoxide* 10% dibuat dengan cara mengencerkan 10 mL *Dimethyl Sulfoxide* konsentrasi 100% dengan aquadest steril masukkan kedalam labu takar 100 mL dan digojog hingga homogen, kemudian rendam dalam waktu 10 menit. Kertas cakram (*paper disk blank*) yang sudah direndam, ditempatkan pada masing-masing cawan petri diatas permukaan media *Mueller Hinton Agar* secara aseptis dengan pinset yang sudah dipanaskan diatas bunsen dan disemprot dengan alkohol, kemudian diberi label pada masing-masing cawan petri pada setiap konsentrasinya dan kontrolnya. Diinkubasi cawan petri selama 8 jam pada suhu 37°C. pengukuran diameter zona hambat dilakukan sebanyak 3x, untuk zona hambat yang terbentuk diukur diagonal, horizontal serta vertikal. Rumus untuk menghitung diameter zona hambat dapat dilihat pada persamaan 2 (Diniawati dan Setyo, 2023).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Zona bening di sekitar kertas cakram dapat diukur dengan membalikkan cawan petri. Zona bening ialah petunjuk kepekaan dari bakteri terhadap zat antibakteri yang dipergunakan sebagai bahan uji serta dinyatakan sebagai luas zona hambat. Hasil tersebut ialah nilai rata-rata ketiga pengukuran (Mozartha *et al.*, 2019). Diagram pengukuran zona hambat dilihat pada **Gambar 5**.



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

Keterangan

- : Zona Hambat
- A : Diameter vertikal
- B : Diameter horizontal
- C : Diameter diagonal
- Dc : Diameter cakram

Pengukuran diameter zona hambat dilakukan dengan rumus pada persamaan 2.

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

Pengamatan dilakukan dengan menggunakan jangka sorong untuk mengukur area bening yang terbentuk, yang dikenal sebagai zona hambat (Susanto *et al.*, 2012). Kategori kekuatan daya hambat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Kategori Kekuatan Daya Hambat (Susanto et al., 2012)

Diameter	Kekuatan daya hambat
≤ 5 mm	Lemah
6-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
≥ 21 mm	Sangat kuat

Berdasarkan data dari diameter zona hambat yang diperoleh, analisis dilakukan menggunakan program SPSS. Nilai normalitas data ditentukan

menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Data yang dianalisis dikatakan memiliki distribusi normal jika nilai signifikansi $>0,05$. Analisis homogenitas varian data dari setiap kelompok dilakukan dengan menggunakan uji *Levene*. Data dikatakan homogen jika nilai signifikansi $>0,05$ (Daud *et al.*, 2023).

Setelah syarat normalitas serta homogenitas telah terpenuhi, uji dilanjutkan dengan analisis ANOVA. Jika uji ANOVA $<0,05$ karena itu menunjukkan bahwa ada perbedaan yang nyata (signifikan) antar kelompok perlakuan. Untuk analisis lanjutan, uji LSD digunakan untuk mengidentifikasi kelompok perlakuan mana yang menunjukkan perbedaan yang signifikan. Uji *Kruskall-Wallis* digunakan jika uji normalitas data menunjukkan hasil yang tidak normal serta data tidak homogen (Daud *et al.*, 2023).

PERPUSTAKAAN
JENDERAL ACHMAD YANI
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA