

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kelengkeng (*Dimocarpus longan* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi sumuran dengan variasi konsentrasi ekstrak 20%, 30%, dan 40%.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Identifikasi tanaman kelengkeng dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Juni 2025.

#### **C. Populasi dan Sampel Penelitian**

##### 1. Populasi

Daun kelengkeng yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Kebun Kelengkeng PWR (Wisata Petik Buah) Cibuk Kidul, Margoluwih, Kecamatan Sevegan, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55561(-7.7522989,110.3120098).

##### 2. Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel daun kelengkeng yang berwarna hijau tua dengan kondisi baik, pada posisi daun ke-5 dan ke-6 dari tiap tangkainya sebanyak 2,5 Kg.

#### D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas  
Seri konsentrasi ekstrak daun kelengkeng.
2. Variabel Terikat  
Diameter zona hambat bakteri *Streptococcus mutans*.
3. Variabel Terkendali  
Pelarut ekstraksi, suhu pengeringan simplisia, kriteria daun yang digunakan (daun kelengkeng yang berwarna hijau tua, kondisi baik dan diambil dari posisi daun ke-5 dan ke-6 dari tiap tangkai), suhu dan waktu inkubasi bakteri.

#### E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun kelengkeng merupakan ekstrak kental yang didapatkan melalui metode maserasi, yaitu proses perendaman serbuk daun dalam pelarut etanol 70% untuk menarik kandungan senyawa aktif di dalamnya.
2. Diameter zona hambat yaitu area jernih yang terbentuk di sekitar sumuran pada media uji, sebagai indikator terhambatnya pertumbuhan bakteri yang diukur secara akurat menggunakan jangka sorong pada tiga arah, yaitu vertikal, horizontal, dan diagonal.

#### F. Alat dan Bahan

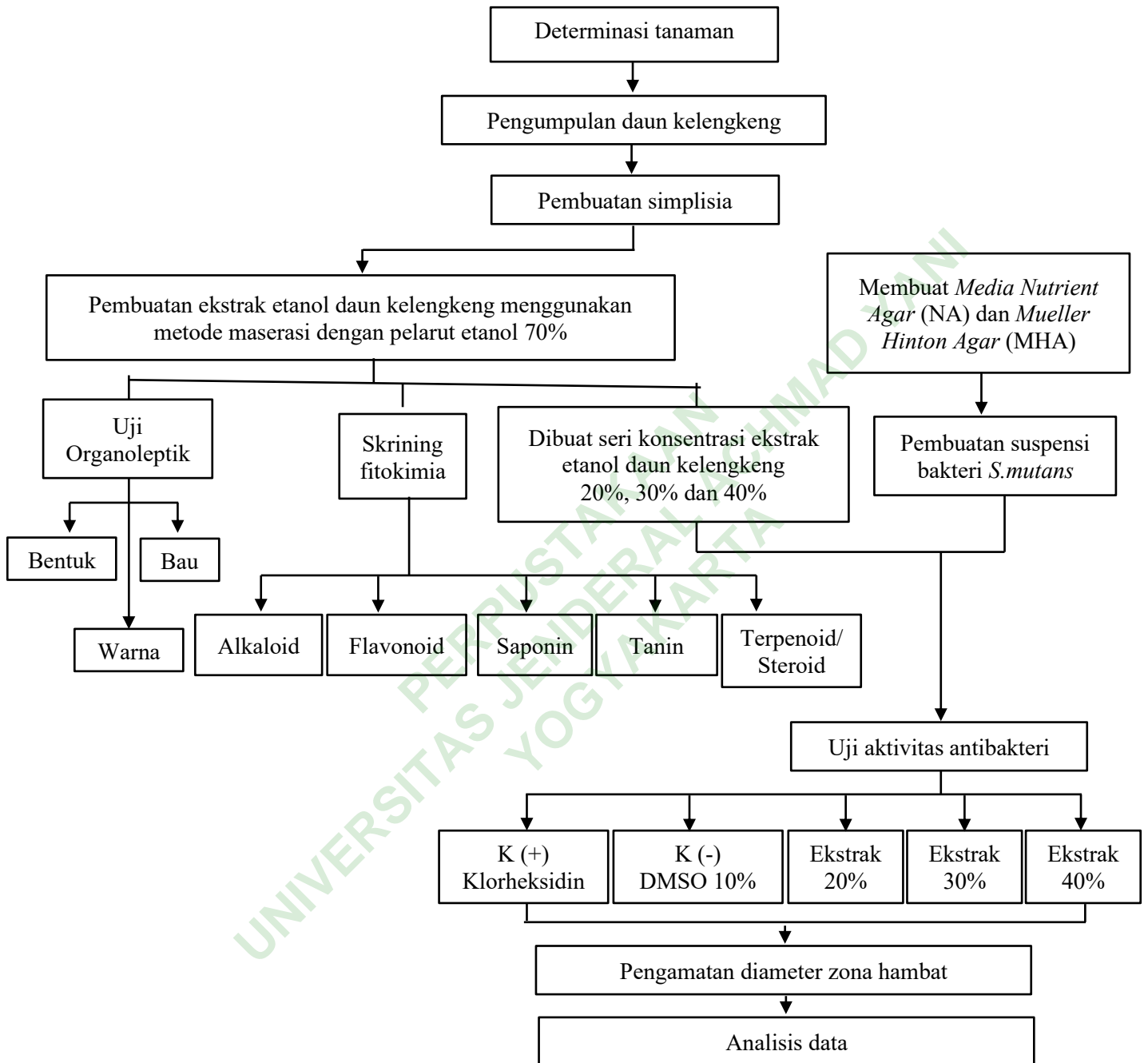
1. Alat  
Aluminium foil, *autoclave* (B-one), ayakan ukuran 40 mesh (Fomac), *beaker glass* (Iwaki), *biological safety cabinet* (BSC) (Daihan Labtech), batang pengaduk, cawan petri (Anumbra), corong (Iwaki), erlenmeyer 100 mL (Iwaki), gelas ukur 250 mL (Iwaki), *Halogen Moisture Balance*, *Hotplate* (IKA C-MAG HS-7) penangas air, inkubator (Mettler UN30), jangka sorong, jarum ose, kertas payung, labu ukur (Iwaki), lemari pendingin, mikropipet 20-200  $\mu$ L (Ohaus), oven (Mettler UN160), bunsen, pipet tetes, pipet ukur, propipet, spatula kayu, timbangan analitik (Ohaus), tabung reaksi beserta raknya, toples kaca besar, turbidimeter BD (Phoenixspec Nephelometer), *vortex*, wajan.

## 2. Bahan

Aquadest, *Cotton swab*, daun kelengkeng, DMSO 10%. etanol 70% (Teknis),  $\text{FeCl}_3$  1%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%, HCl 2 N, klorheksidin 0,2% (Minosep), *Mueller Hinton Agar* (Himedia), NaCl 0,9%, *Nutrient agar* (Merck), pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, serbuk magnesium, *Streptococcus mutans* ATTC 25175, Yellow tip.

PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI  
YOGYAKARTA

### G. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 4. Pelaksanaan Penelitian

## 1. Determinasi Tanaman Kelengkeng (*Dimocarpus longan* L.)

Determinasi tanaman kelengkeng dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta dengan tujuan untuk memastikan kebenaran jenis tanaman yang digunakan yaitu *Dimocarpus longan* L.

## 2. Persiapan Sampel

### a. Pembuatan simplisia

Sebanyak 2,5 Kg daun kelengkeng yang telah dikumpulkan dicuci untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun. Lalu daun dikeringkan menggunakan oven selama 24 jam pada suhu 50°C. Daun yang sudah kering ditandai dengan mudah hancur saat diremas (Wulandari *et al.*, 2022). Daun yang telah kering lalu dihaluskan dengan grinder hingga menjadi serbuk halus, kemudian serbuk diayak menggunakan ayakan 40 mesh untuk memperoleh partikel dengan ukuran yang seragam dan mempermudah proses ekstraksi selanjutnya (Anam, 2010).

### b. Pembuatan ekstrak

Ekstrak daun kelengkeng diperoleh melalui metode maserasi, dengan merendam bahan simplisia dengan pelarut etanol 70% dalam perbandingan 1:10. Sebanyak 100 gram serbuk daun kelengkeng dimasukkan ke dalam wadah kaca besar, lalu tambahkan 1 L pelarut etanol 70%. Proses perendaman berlangsung selama tiga hari dengan kondisi terlindung dari sinar matahari. Selama masa perendaman, campuran diaduk setiap enam jam selama lima menit untuk membantu pelarut mengekstraksi senyawa aktif secara maksimal (Prasetya *et al.*, 2020). Setelah tiga hari, hasil maserasi disaring terlebih dahulu menggunakan kain mori untuk memisahkan filtrat dari ampas simplisia. Filtrat yang diperoleh disaring kembali menggunakan kertas saring. Ampas yang tersisa kemudian dilakukan proses remaserasi, yaitu ekstraksi ulang dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama selama 24 jam, guna memastikan perolehan senyawa aktif yang lebih optimal. Seluruh maserat yang diperoleh selanjutnya dikumpulkan lalu uapkan penangas air pada suhu 40°C, hingga

menghasilkan ekstrak yang lebih kental. Ekstrak kental yang diperoleh dituangkan ke dalam botol kaca steril, dilengkapi dengan keterangan dan disimpan ke lemari (Parama *et al.*, 2019), ekstrak kental ditimbang dan dihitung rendemennya dalam bentuk persentase (% b/b) sesuai dengan rumus yang tercantum pada persamaan (1) (Supriningrum *et al.*, 2020)

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kental (Gram)}}{\text{berat simplisia (Gram)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

c. Uji Kadar Air Ekstrak

Dilakukan uji kadar air ekstrak dengan cara meletakkan 1 gram ekstrak daun kelengkeng diatas lempeng alumunium foil lalu lempeng dimasukkan kedalam alat *Halogen Moisture Balance*. Alat dijalankan hingga diperoleh data kadar air ekstrak daun kelengkeng. Uji kadar air ekstrak dinyatakan memenuhi syarat jika hasil dari kadar air ekstrak kurang dari 10% (Salamah dan Widyasari 2015).

3. Uji Organoleptik

Dilakukan uji organoleptik dengan tujuan untuk mengidentifikasi rasa, bentuk, warna dan bau ekstrak etanol daun kelengkeng (Sambode *et al.*, 2022). Sampel ekstrak dituang ke dalam wadah bersih, kemudian dilakukan pengamatan secara visual untuk menilai bentuk dan warna, penciuman untuk mengevaluasi bau, serta penilaian rasa dilakukan dengan mencicipi sedikit ekstrak.

4. Skrining Fitokimia

a. Uji alkaloid

Sebanyak 500 mg ekstrak etanol daun kelengkeng dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 mL larutan HCl 2N untuk membantu proses hidrolisis senyawa alkaloid. Campuran tersebut kemudian dipanaskan guna mempercepat reaksi, lalu didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Setelah itu, larutan hasil pemanasan dibagi merata ke dalam tiga tabung reaksi, masing-masing sebanyak 1 mL. Tabung pertama diberi 2 tetes pereaksi Mayer, tabung kedua ditambahkan 2 tetes pereaksi Wagner, dan tabung ketiga ditetesi 2 tetes pereaksi Dragendorff. Uji ini bertujuan

untuk mendeteksi keberadaan senyawa alkaloid berdasarkan karakteristik endapan yang terbentuk. Reaksi positif terhadap alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau kuning pada pereaksi Mayer, endapan coklat pada pereaksi Wagner, dan endapan jingga pada pereaksi Dragendorff (Muthmainnah, 2019).

b. Uji flavonoid

Sebanyak 500 mg ekstrak etanol daun kelengkeng dilarutkan dalam 5 mL etanol di dalam tabung reaksi, kemudian campuran tersebut dipanaskan selama lima menit untuk memaksimalkan pelarutan senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. Setelah proses pemanasan, larutan ditambahkan 1 mL larutan HCl 2N serta 0,2 gram serbuk magnesium sebagai pereaksi yang memicu terjadinya reaksi reduksi flavonoid. Ekstrak yang mengandung flavonoid ditunjukkan adanya perubahan warna larutan menjadi merah, kuning, atau jingga sebagai hasil interaksi antara flavonoid, magnesium, dan asam kuat (Nurjannah *et al.*, 2022).

c. Uji saponin

500 mg ekstrak etanol daun kelengkeng dilarutkan dalam 1 mL aquadest hangat dalam tabung reaksi, kemudian dikocok hingga menimbulkan buih. Hasil penggojogan didiamkan selama 2 menit, terbentuknya buih setinggi 1-10 cm yang bertahan  $\pm 10$  menit menunjukkan hasil positif untuk kandungan saponin. (Chezar *et al.*, 2025).

d. Uji tanin

Sebanyak 500 mg ekstrak etanol daun kelengkeng ditempatkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1% sebagai reagen uji. Warna hitam kebiruan yang muncul secara visual pada sampel menunjukkan hasil positif terhadap kandungan senyawa tanin dalam sampel (Chezar *et al.*, 2025).

e. Uji terpenoid/steroid

Sebanyak 500 mg ekstrak etanol daun kelengkeng ditempatkan dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 0,5 mL kloroform dan 0,5 mL asam asetat anhidrat untuk membentuk larutan uji. Tahap selanjutnya menambahkan 2 mL asam sulfat pekat secara perlahan melalui dinding tabung hingga membentuk lapisan terpisah. Indikasi positif mengandung terpenoid jika terbentuk warna merah atau ungu pada lapisan larutan, sementara pembentukan warna hijau kebiruan mengindikasikan keberadaan senyawa steroid. (Chezar *et al.*, 2025).

5. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi alat

Peralatan seperti cawan petri dan tabung reaksi yang digunakan dalam kegiatan penelitian terlebih dahulu dicuci untuk menghilangkan sisa kotoran maupun kontaminan yang berpotensi mengganggu validitas hasil. Setelah bersih, peralatan seperti cawan petri dan tabung reaksi dibungkus dengan kertas payung, sementara itu pada bagian mulut tabung reaksi ditutup menggunakan kapas yang telah dilapisi kasa guna mencegah masuknya mikroorganisme dari udara. Tahapan berikutnya adalah proses sterilisasi kering, di mana seluruh peralatan tersebut masukkan kedalam oven kemudian panaskan pada suhu 171°C selama satu jam untuk memastikan eliminasi total mikroorganisme (Ida *et al.*, 2021). Adapun peralatan seperti jarum ose disterilkan secara berbeda, yakni melalui perendaman dalam alkohol selama dua menit sebagai desinfeksi awal, kemudian dipijarkan langsung di atas nyala api bunsen hingga mencapai kondisi berpijar sebagai langkah sterilisasi akhir, memastikan alat benar-benar bebas mikroba sebelum digunakan.

b. Sterilisasi bahan

Larutan NaCl 0,9%, blue tip, serta media *Nutrient Agar* dan *Mueller Hinton Agar* disterilisasi menggunakan autoklaf untuk memastikan kebersihan dan bebas dari kontaminasi mikroba. Proses sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit, sehingga seluruh

bakteri, jamur, maupun spora yang terdapat dalam larutan dan media dapat dimusnahkan secara efektif, memastikan keakuratan hasil dalam penelitian mikrobiologi (Aprillia *et al.*, 2023).

c. Pembuatan media

1) Media *Nutrient Agar* (NA)

Ditimbang 1,2 gram *Nutrient Agar* (NA), kemudian masukkan ke labu Erlenmeyer. Setelah itu, ditambahkan 60 mL aquadest secara perlahan untuk memastikan pencampuran yang merata. Panaskan media menggunakan *hot plate* selama  $\pm 15$  menit hingga media homogen yang ditandai dengan warna larutan yang jernih. Sterilkan media dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi media *Nutrient Agar* (NA) didinginkan pada suhu ruang hingga mencapai kisaran  $40\text{-}45^{\circ}\text{C}$ . Dituangkan media tersebut secara aseptik kedalam tabung reaksi sebanyak 10 mL, dibiarkan beberapa saat hingga memadat dalam keadaan posisi miring pada kemiringan  $45^{\circ}$  (Sinaga *et al.*, 2022).

2) Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

Seberat 7,88 gram media *Muller Hinton Agar* (MHA) di masukkan kedalam erlenmeyer lalu tambahkan 235 mL aquadest. Panaskan campuran media hingga homogen. Media MHA distreilisasi menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, media didinginkan secara perlahan pada suhu ruang hingga mencapai  $\pm 50^{\circ}\text{C}$  agar tetap dalam kondisi hangat dan siap digunakan. Kemudian, media tersebut dituangkan secara aseptik ke dalam cawan petri dengan volume sekitar  $\pm 15$  mL per cawan, lalu dibiarkan hingga memadat membentuk permukaan yang stabil untuk proses inokulasi bakteri (Wijayanti, 2022).

d. Peremajaan bakteri

Diambil sebanyak 2 ose kultur murni bakteri *Streptococcus mutans* lalu diinokulasikan di permukaan media NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rahmah *et al.*, 2024).

e. Pembuatan pelarut ekstrak

Untuk melarutkan ekstrak etanol daun kelengkeng digunakan pelarut DMSO 10%. Dibuat pelarut ekstrak dengan memasukkan 5 mL DMSO ke dalam labu ukur, lalu tambahkan aquadest sampai volumenya 50 mL (Dessyre & Sandriana, 2024).

f. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak

Larutan stok ekstrak etanol daun kelengkeng dengan konsentrasi 100% disiapkan dengan melarutkan 20 gram ekstrak ke dalam 20 mL larutan DMSO 10%, sehingga menghasilkan larutan induk dengan konsentrasi yang sesuai. Diencerkan larutan stok tersebut secara bertahap hingga diperoleh konsentrasi akhir 20%, 30%, dan 40%, yang nantinya akan digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Proses pengenceran dilakukan menggunakan rumus  $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ , dan rincian perhitungan volume masing-masing konsentrasi dapat dilihat pada **Lampiran 8**.

g. Pembuatan suspensi bakteri

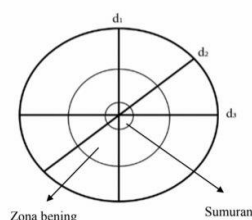
Koloni bakteri *Streptococcus mutans* yang tumbuh pada media *Nutrient Agar* diambil sebanyak satu ose, kemudian dimasukkan ke dalam *conical tube* berisi 5 mL larutan NaCl 0,9% steril. Suspensi bakteri yang terbentuk kemudian distandarisasi kekeruhannya menggunakan turbidimeter dengan standar McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL) (Nurhayati *et al.*, 2020). Jika kekeruhan suspensi melebihi standar, dilakukan pengenceran dengan NaCl 0,9% steril. Sebaliknya, jika kekeruhan belum mencapai standar, ditambahkan lebih banyak koloni bakteri hingga diperoleh tingkat kekeruhan yang sesuai (Anita *et al.*, 2020).

#### h. Uji aktivitas antibakteri

Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri diinokulasikan secara aseptik ke dalam cawan petri yang telah berisi media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Ratakan suspensi tersebut secara menyeluruh menggunakan *cotton swab* dan dibiarkan hingga benar-benar kering. Setelah proses pengeringan, dibuat tiga sumuran berdiameter 6 mm menggunakan *cork borer* sebagai tempat untuk menampung larutan uji. Masing-masing sumuran diisi dengan 50  $\mu\text{L}$  larutan uji pada konsentrasi 20%, 30%, dan 40%. Perlakuan serupa juga diterapkan pada cawan petri lainnya, yang digunakan untuk uji kontrol positif dan kontrol negatif guna membandingkan efektivitas antibakteri ekstrak yang diuji. Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan klorheksidin 0,2% yang diperoleh dari produk komersial merk Minosep yang tersedia di Apotek. Cawan petri diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C untuk memungkinkan bakteri berkembang dan menunjukkan reaksi terhadap perlakuan, pada setiap perlakuan baik pada kelompok perlakuan maupun kontrol, dilakukan dalam tiga kali replikasi (Sinaga *et al.*, 2022).

Setelah masa inkubasi selesai, zona hambat terbentuk di sekitar sumuran diamati kemudian diukur dengan alat jangka sorong dalam tiga arah berbeda, yaitu vertikal (a mm), horizontal (b mm), dan diagonal (c mm). Nilai dari ketiga pengukuran tersebut dijumlahkan dan dibagi tiga (n) untuk memperoleh rata-rata diameter zona hambat (Jumardin *et al.*, 2024). Diameter zona hambat yang terbentuk dihitung menggunakan persamaan (2).

$$\text{Diameter zona hambat} = \frac{d1+d2+d3}{3} \dots\dots\dots(2)$$



Keterangan:

$d1$  = Vertikal

$d2$  = Diagonal

$d3$  = Horizontal

**Gambar 5.** Diagram Pengukuran Zona Hambat

## H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Data diameter zona hambat *Streptococcus mutans* yang diperoleh diolah untuk menentukan nilai rata-rata dan standar deviasi setiap kelompok perlakuan. Parameter statistik ini menjadi dasar dalam mengevaluasi efektivitas antibakteri ekstrak dengan mengacu pada kriteria baku daya hambat: kategori lemah (<5 mm), sedang (6-10 mm), kuat (11-20 mm), dan sangat kuat (>21 mm) (Winastri *et al.*, 2020).

Pengolahan data lebih lanjut dilakukan menggunakan *software* SPSS versi 26. Tahap pertama melibatkan uji normalitas distribusi data melalui metode *Shapiro-Wilk*, dimana nilai signifikansi (p-value) >0,05 menunjukkan data terdistribusi normal, sementara nilai <0,05 mengindikasikan penyimpangan dari distribusi normal. Tahap berikutnya adalah uji homogenitas varians menggunakan uji *Levene* dengan kriteria penilaian serupa dimana p-value >0,05 menandakan homogenitas varians antar kelompok. Pemenuhan kedua asumsi parametrik ini menjadi prasyarat untuk melanjutkan ke analisis varian (ANOVA).

Jika hasil uji *One-Way ANOVA* pada tingkat signifikansi  $\alpha=0,05$  menunjukkan perbedaan yang bermakna (p<0,05) maka dilanjutkan dengan uji *post-hoc* LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengidentifikasi perbedaan spesifik antar kelompok perlakuan. Namun jika hasil pengujian normalitas dan homogenitas tidak memenuhi syarat maka digunakan uji *Kruskal walls*. Prosedur

analitik berjenjang ini memastikan bahwa kesimpulan yang dihasilkan mengenai efektivitas antibakteri ekstrak memiliki dasar statistik yang kuat dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI  
YOGYAKARTA