

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium. Ekstraksi daun dan bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) menggunakan etanol 96%. Pada penelitian ini digunakan metode difusi cakram untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri daun dan bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) sebagai antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* penyebab jerawat.

B. Lokasi Penelitian

1. Lokasi penelitian

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Pembuatan ekstraksi etanol daun dan ekstrak etanol bunga cengkeh dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo, Ungaran.
- c. Penetapan kadar flavonoid menggunakan metode spektrofotometri – Uv Vis di Laboratorium Instrumen Universitas Ngudi Waluyo, Ungaran.
- d. Uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo, Ungaran.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni - Agustus 2023.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi adalah kelompok subyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi pada penelitian ini adalah tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) yang berada di daerah Desa Gogik Dusun Gintungan Ungaran.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian dari populasi. Sampel pada penelitian ini adalah daun dan bunga cengkeh yang masih segar dan tidak mengandung hama yang berada di daerah Desa Gogik Dusun Gintungan Ungaran Barat, Kabupaten Semarang.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahan atau timbulnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun dan bunga cengkeh dengan variasi konsentrasi 10 %, 20% dan 50% dengan kontrol positif antibiotik Klindamisin dan kontrol negatif DMSO (*Dimetil Sulfoksida*) 10%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variable bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini

jumlah kadar flavonoid ekstrak etanol dan aktivitas antibakteri dari daun dan bunga cengkeh.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol adalah variabel yang ikut berpengaruh yang dibuat sama pada setiap media percobaan dan terkontrol. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah media pertumbuhan bakteri, bakteri *Propionibacterium acnes*, lama inkubasi, suhu inkubasi.

E. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a) Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, gelas ukur, erlenmeyer, pipet tetes, timbangan analitik, kertas saring, batang pengaduk, blender, spuit, beaker glass, tabung reaksi, corong kaca, seperangkat alat vacuum rotary evaporator, *autoclave*, *magnetic stirrer*, mortir dan stamper, spektrofotometer cuvet UV-Vis, kertas cakram, cawan petri, jarum ose, inkubator.

b) Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.), etanol 96%, aquadest, AlCl_3 2%, asam asetat 5%, etanol pa, kuersetin, bakteri *Propionibacterium acnes*,

media *Muller Hinton Agar* (MHA), Kertas Cakram Klindamisin, DMSO (*Dimetil Sulfoksida*) 10%, dan NaCl 0,9%.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel utuh cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) yang digunakan dalam penelitian. Hal ini berkaitan dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman cengkeh yang akan di uji kebenarannya di Universitas Diponegoro.

3. Pengambilan dan Preparasi Sampel

Sampel daun dan bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) yang masih segar dan tidak mengandung hama dikumpulkan dari daerah penghasil cengkeh yang tumbuh di Desa Gogik Dusun Gintungan Ungaran Barat Kabupaten Semarang. Sampel daun dan bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dicuci bersih dengan menggunakan air mengalir, lalu ditiriskan. Sampel lalu di keringkan di bawah matahari secara tidak langsung dengan menggunakan kain hitam selama 2-3 hari. Daun dan bunga cengkeh yang sudah kering di serbuk dan ditimbang.

4. Ekstraksi Sampel

Serbuk daun dan bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) ditimbang masing-masing 200 gram kemudian dimasukan ke dalam bejana maserasi masing-masing. Dituang secara perlahan pelarut etanol 96%

sebanyak 2 L kedalam masing-masing bejana maserasi yang berisi serbuk simplisia daun dan bunga cengkeh. Setelah itu dibiarkan cairan penyari merendam seluruh serbuk simplisia selama 3 hari sambil diaduk secara berkala. Campuran kemudian disaring dan ampasnya direndam lagi dengan cairan penyari yang baru. Proses penyarian selanjutnya dilakukan sebanyak 2 kali dengan etanol 96% setiap kali sebanyak 1 L. Ekstrak cair masing-masing dikumpulkan kemudian dipekatkan dengan menggunakan alat rotavapor (*rotary evaporator vacuum*) pada suhu 50 ° C hingga diperoleh ekstrak kental (Wahyulianingsih dkk., 2016).

Dihitung rendemen yang didapat menggunakan rumus :

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Ekstrak kental (g)}}{\text{Berat Simplisia (g)}} \times 100\%$$

5. Skrining Fitokimia

a) Uji Alkaloid

Dilakukan dengan menimbang ekstrak 0,5 gram dan ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL akuades, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai untuk pengujian pada pereaksi Mayer, Bouchardat, dan Dragendroff. Pada pereaksi Mayer, tiga tetes ekstrak daun dan bunga cengkeh dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda kemudian tambahkan 2 tetes pereaksi Mayer. Bila terbentuk endapan putih atau kuning, hal tersebut menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Pada pereaksi Bouchardat, tiga tetes ekstrak daun dan

bunga cengkeh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat. Bila terbentuk endapan coklat sampai hitam, hal tersebut menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Sedangkan pereaksi Dragendroff dilakukan dengan mengambil 3 tetes ekstrak daun dan bunga cengkeh dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda dan ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendroff, bila terbentuk endapan jingga sampai merah coklat atau merah bata, hal tersebut menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Bila sedikitnya 2 dari 3 pereaksi di atas positif maka sampel mengandung alkaloid (Banu & Cathrine, 2015).

b) Uji flavonoid

Dilakukan dengan mengambil ekstrak kental daun dan bunga cengkeh sebanyak 0,5 gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, dan ditambahkan 10 mL air panas. Larutan tersebut dididihkan dan disaring dalam keadaan panas. Sebanyak 5 mL filtrat diambil dan ditambah dengan 0,1 g serbuk Mg, 1 mL HCl, dan 2 mL amil alkohol. Campuran dikocok dan biarkan memisah. Bila terbentuk warna kuning, jingga atau merah pada lapisan amil alkohol memberikan indikasi adanya flavonoid (Banu & Cathrine, 2015).

c) Uji saponin

Pada sampel dilakukan dengan mengambil ekstrak kental daun cengkeh sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi

yang berbeda. Ditambahkan air panas secukupnya, dikocok selama 15 menit. Bila setelah ditetesi asam klorida 2 N terbentuk buih permanen selama kurang lebih 10 menit, maka hal tersebut memberikan indikasi adanya saponin (Banu & Cathrine, 2015).

d) Uji tanin

Dilakukan dengan mengambil ekstrak kental daun cengkeh ditambahkan dengan 10 mL akuades dan disaring. Filtrat kemudian diencerkan dengan akuades sampai tidak berwarna. Sebanyak 2 mL filtrat dimasukkan ke dalam tabung dan ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Bila terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman, hal tersebut memberikan indikasi adanya tanin (Banu & Cathrine, 2015).

6. Penetapan Kadar Flavonoid

Penentuan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol daun dan bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dilakukan secara spektrofotometri UV-Vis dengan metode kolorimetri (AlCl_3) pada λ 410 nm dan dinyatakan sebagai flavonoid total dalam ekuivalen kuersetin (EQ) (Rebaya *et al.*, 2019).

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin.

Sebanyak 10 mg kuersetin dilarutkan dalam 10 mL etanol pa lalu larutan ini sebagai larutan 1000 ppm atau larutan induk. Kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 60 ppm. Dipipet sebanyak 1 mL larutan

kuersetin 60 ppm lalu ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Larutan diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi diukur panjang gelombang 410 nm (Yuspita et al., 2021).

b. Penentuan *Operating Time*

Larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang sudah diperoleh dari menit 0-30 dengan interval waktu 2 menit (Bakti et al., 2017). *Operating time* ditunjukkan pada waktu yang menunjukkan absorbansi yang stabil dan tidak terjadi penurunan absorbansi (Rastuti & Purwati, 2012).

c. Pembuatan Kurva Standar *kuersetin*

Ditimbang kuersetin sebanyak 10 mg dilarutkan dengan etanol pada 10 mL (1000 ppm). Dibuat variasi konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm. Masing-masing dipipet sejumlah 1 mL dari larutan standar ditambah dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit, absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimum kuersetin (410 nm), dibuat kurva kalibrasi dengan menghubungkan nilai serapan sebagai koordinat (Y) dan konsentrasi larutan standar absis (X) (Ipandi, dkk., 2016).

d. Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Dan Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.).

Ekstrak etanol daun dan bunga cengkeh ditimbang masing-masing 10 mg dan dilarutkan dengan 10 mL etanol. Sampel dipipet 1 mL, kemudian ditambahkan 1 mL AlCl₃ 10%, dan 8 mL asam asetat 5%. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit, absorbansi (410 nm) diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Setelah diperoleh absorbansi masing-masing ekstrak etanol daun dan bunga cengkeh, dihitung kadar flavonoid total. Masing-masing ekstrak dilakukan pengujian secara triplo (3 kali replikasi) (Ipandi, dkk., 2016). Kadar flavonoid dapat dihitung menggunakan rumus (Azizah, dkk., 2014):

$$F = \frac{c \times V \times f \times 10^{-6}}{m} \times 100\%$$

Keterangan:

- F** :Jumlah flavonoid metode AlCl₃;
C :Kesetaraan quersetin (µg/mL);
V :Volume total ekstrak;
F :Faktor pengenceran; dan
M :Berat sampel (g)

e. Uji Aktivitas Antibakteri

1) Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian aktivitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan dalam oven pada suhu 170°C selama ± 2 jam, jarum ose dan pinset dibakar dengan pembakaran di atas api langsung dan media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2) Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

Pembuatan media *Muller Hinton Agar* (MHA) dimulai dengan menimbang MHA sebanyak 19 gram dan dilarutkan ke dalam erlenmeyer dengan akuadest hingga mencapai volume 500 mL, kemudian dipanaskan hingga homogen. Media disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Tuang media ke dalam cawan petri sekitar 25 mL dan dibiarkan hingga memadat (Nurhayati dkk., 2020).

3) Pembuatan Larutan Uji Konsentrasi

Ekstrak kental daun dan bunga cengkeh (*Propionibacterium acnes* L.) dibuat dalam 3 konsentrasi yaitu 10%, 20% dan 50%. Ekstrak etanol daun dan bunga cengkeh dibuat dengan perhitungan (b/v), menggunakan DMSO 10 % sebagai pelarut.

- a) Konsentrasi 10 % ditimbang 1 g ekstrak di dalam cawan, kemudian dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 10 mL
- b) Konsentrasi 20% ditimbang 2 g ekstrak di dalam cawan, kemudian dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 10 mL
- c) Konsentrasi 50% ditimbang 5 g ekstrak di dalam cawan, kemudian dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 10 mL
- d) Pembuatan Larutan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif
Kontrol negatif menggunakan DMSO 10%. Pembuatan larutan kontrol positif dibuat dari kertas cakram atau cakram *disk* Klindamisin.

4) Inokulasi Bakteri Uji

Pour plate teknik penanaman mikroorganisme dengan menuang suspensi mikroorganisme dalam medium padat yang masih berbentuk air sehingga kumpulan sel akan tersebar merata ke seluruh media (tidak hanya di permukaan). Selanjutnya bakteri tersebut dicampurkan dengan medium agar MHA dan dibiarkan sampai padat. Metode difusi cakram digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri, cakram kosong direndam selama 15 menit pada masing-masing konsentrasi, kemudian cakram diletakkan pada permukaan media yang telah ditanami bakteri.

5) Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara bakteri *Propionibacterium acnes*, ditumbuhkan pada tabung reaksi atau secara agar miring. Kemudian MHA tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

6) Pembuatan Kontrol Positif (+)

Kontrol positif yang digunakan adalah *paper disk* klindamisin yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo.

7) Pembuatan Kontrol Negatif (-)

Dalam penelitian ini kontrol negatif menggunakan DMSO 10% yang dibuat dengan cara mencampur 10 mL DMSO murni dan 90 mL aquadest kemudian diaduk hingga homogen dan terlarut.

8) Teknik Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* dibuat dengan cara dibiakkan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) selama 24 jam. Koloni *Propionibacterium acnes* selanjutnya diambil sebanyak satu ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diisi 10 mL larutan steril (NaCl 0,9%). Koloni bakteri dikocok sampai koloni halus dan tampak tercampur dengan suspensi media hingga terlihat adanya kekeruhan. Setelah itu, diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar *Mc Farland* (McF) 0,5 (Merta dan I Nyoman, 2019).

9) Uji Aktivitas Antibakteri

Pour plate merupakan teknik isolasi yang dilakukan dengan membuat pengenceran secara berturut-turut dengan menggunakan jarum inokulasi dan pipet. Bakteri tersebut dicampurkan dengan medium agar dan dibiarkan sampai padat di dalam cawan petri. Setiap cawan petri dibagi menjadi 5 sektor untuk aplikasikan kertas cakram yaitu Kontrol positif, kontrol negatif dan 3 konsentrasi dan juga dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Metode difusi cakram digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri, cakram kosong direndam selama 15 menit pada masing-masing konsentrasi, kemudian cakram diletakkan pada permukaan media yang telah ditanami bakteri. Pengujian kontrol positif dilakukan dengan meletakkan *paper disk* klindamisin pada permukaan media yang telah berisi bakteri. Pengujian kontrol negatif dilakukan dengan cara

merendam kertas cakram kosong selama 15 menit dalam DMSO 10%, kemudian diletakkan media yang telah ditanami bakteri. Pengujian antibakteri direplikasi sebanyak tiga kali. Media yang telah diberi perlakuan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam diukur diameter zona hambat (mm) yang terbentuk disekitar cakram menggunakan jangka sorong (Sa'adah, *et al.*, 2020).

F. Pengolahan Data

Menurut Adhitia (2012) dalam proses pengolahan data terdapat 4 langkah, yaitu :

1. Editing

Editing adalah pemeriksaan kembali kebenaran data yang diperoleh dan juga pemisahan data-data yang tidak memenuhi kriteria penelitian.

2. Coding

Coding adalah pemberian kode numerik terhadap data yang terdiri atau beberapa kategori

3. Entri Data

Entri Data adalah memasukan data yang telah dikumpulkan ke dalam program. Data kadar flavonoid menggunakan persamaan regresi

linear menggunakan program *Microsoft excel* dan data aktivitas antibakteri menggunakan *software SPSS*.

4. *Cleaning Data*

Cleaning Data adalah pemeriksaan kembali data yang telah dimasukkan untuk memastikan data bersih dari kesalahan dan siap untuk dianalisis.

G. Analisis Data

Analisis data kadar flavonoid menggunakan persamaan regresi linear menggunakan program *Microsoft excel* kemudian dihitung kadar flavanoid totalnya. Data aktivitas antibakteri di analisis menggunakan *software SPSS*, menggunakan pengujian Uji Anova Satu Jalan.