

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun alamanda (*A. cathartica* L.) yang diambil di kota Solo, Jawa Tengah pada bulan Juli 2019. Sampel dari penelitian ini adalah daun alamanda yang merupakan daun muda. Daun diambil dalam kondisi masih segar, tidak busuk, belum berubah warna, dan bersih dari kotoran yang diperoleh dari kota Solo, Jawa Tengah.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah daun alamanda (*A. cathartica* L.) yang diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian difraksinasi dengan pelarut air, etil asetat, dan *n*-heksana.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah uji penghambatan pembentukan biofilm ekstrak dan fraksi daun alamanda (*A. cathartica* L.) terhadap bakteri *S. mutans* ATCC 25175.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang telah direncanakan untuk diteliti yang berpengaruh terhadap variabel terkontrol, variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi dan ekstrak dari daun alamanda (*A. cathartica* L.).

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian, variabel tergantung pada penelitian ini adalah penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 dan nilai IC₅₀ dari persen penghambatan yang telah dipengaruhi oleh fraksi dan ekstrak dari daun alamanda (*A. cathartica* L.).

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel tergantung, variabel kendalinya adalah bakteri uji *S. mutans* ATC 25175.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun alamanda adalah daun yang diperoleh dari tanaman alamanda (*A. cathartica* L.) yang diperoleh dari Kota Solo, Jawa Tengah dalam kondisi segar dan belum layu.

Kedua, serbuk daun alamanda adalah daun alamanda segar yang diambil kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yg menempel setelah itu dikeringkan dengan cara dioven dengan suhu 40°C selama 1 minggu, kemudian diblender dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun alamanda adalah hasil ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang kemudian dipekatan menggunakan *rotary evaporator*.

Keempat, fraksi *n*-heksana daun alamanda adalah hasil fraksinasi dari ekstrak etanol daun alamanda menggunakan pelarut *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat daun alamanda adalah hasil fraksinasi dari residu *n*-heksana menggunakan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air daun alamanda adalah hasil fraksinasi dari residu *n*-heksana menggunakan pelarut air.

Ketujuh, bakteri uji pada penelitian ini menggunakan bakteri uji *S. mutans* ATCC 25175 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Kedelapan, persentase IC₅₀ dari penghambatan biofilm oleh maserat, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak daun alamanda (*A. cathartica* L.) terhadap *S. mutans* ATCC 25175 dengan variasi konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 mg/mL.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun alamanda (*A. cathartica* L.) yang segar dan dikeringkan dan dibuat serbuk. Daun alamanda diambil dari Kota Solo, Jawa Tengah.

1.2 Bakteri Uji. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *S. mutans* ATCC 25175 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

1.3 Bahan lain yang dibutuhkan. Media BHI, larutan etanol 96%, plat silika GF₂₅₄, pelarut *n*-heksana, etil asetat, air, aqua destilata steril, cat kristal violet, reagen Mayer, reagen Dagrendoff, pereaksi Lieberman Bouchard, asam asetat, FeCl₃, serbuk Mg, HCl, kloroform, metanol, butanol, asam asetat glasial, asam asetat anhidrat, reagen H₂SO₄ pekat, CH₃COOH.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *microplate reader*, *wells microplate 96 flat bottom*, oven, alat penggiling, alat *Rotary Evaporator*, timbangan analisa, botol coklat, erlenmayer, tabung reaksi, batang pengaduk, corong pisah, corong kaca, kain flanel, pipet tetes, waterbath, kertas saring, gelas ukur, autoclave, mikroskop, objek glass, deck glass, inkubator, pipet tetes, pipet volume, siringe, Ose platina, cawan petri, pinset, mikroskop.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian adalah melakukan determinasi tanaman alamanda (*A. cathartica* L.) yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi daun alamanda (*A. cathartica* L.) dalam kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Pengumpulan bahan

Daun alamanda yang masih segar dan diambil dari Kota Solo, Jawa Tengah. Daun alamanda dibersihkan dari cemaran atau kotoran, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C kemudian diblender lalu diayak dengan ayakan nomor 40, sehingga diperoleh serbuk daun alamanda yang diinginkan.

3. Pengeringan dan pembuatan serbuk

Bahan baku segar dibersihkan dan dicuci terlebih dahulu dengan air bersih, lalu bahan diletakkan pada loyang yang terbuat dari alumunium dan dikeringkan

di dalam oven pada suhu 40°C selama 4-5 hari. Daun alamanda yang telah kering kemudian dibuat serbuk, pembuatan serbuk ini bertujuan untuk memperluas permukaan partikel bahan yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung efektif. Pembuatan serbuk simplisia merupakan proses awal pembuatan ekstrak. Serbuk simplisia dibuat dari simplisia utuh atau potongan-potongan halus simplisia yang sudah dikeringkan melalui proses pembuatan serbuk dengan suatu alat tanpa menyebabkan kerusakan atau kehilangan kandungan kimia yang dibutuhkan dan diayak hingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan yang diinginkan (Depkes RI 2011).

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun alamanda

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance* dengan menimbang sebanyak 2 gram serbuk daun alamanda pada suhu 105°C serta waktu pengeringan secara otomatis. Kemudian tunggu sampai alat *moisture balance* berbunyi yang mana menandakan hasil analisis telah selesai, kemudian catat hasil susut pengeringan dalam satuan % (Depkes RI 2011).

5. Penetapan kadar air ekstrak daun alamanda

Penetapan kadar air ekstrak daun alamanda dilakukan dengan menimbang sebanyak 20 gram ekstrak daun alamanda kemudian dimasukkan kedalam labu alas bulat pada alat *sterling-bidwell* kemudian ditambahkan xylene sebanyak 200 ml dan panaskan sampai tidak ada tetesan air lagi kemudian dilihat volume tetesan tadi dan dihitung kadarnya dalam satuan persen (Depkes RI 2011).

6. Pembuatan ekstrak

Sejumlah 800 gram serbuk kering daun alamanda dimasukkan kedalam bejana maserasi dan direndam dalam cairan penyari etanol 96% sebanyak 8000 mL (1:10), disimpan pada suhu ruang selama 3 hari sambil sesekali diaduk dan kemudian disaring. Ampas yang diperoleh kemudian diekstraksi kembali. Ekstrak etanol daun alamanda yang diperoleh kemudian digabung dan disaring menggunakan kertas *Whatmann* No. 1 dan filtrat yang didapatkan kemudian dipekatkan menggunakan evaporator dengan suhu dibawah 45°C hingga didapatkan ekstrak kental (Depkes RI 2011).

7. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang 10 gram ekstrak daun alamanda kemudian dilarutkan dengan etanol 10 ml lalu dilarutkan dengan pelarut air 65 ml, difraksi 3 kali dengan pelarut *n*-heksana masing-masing 75 ml, dalam proses fraksinasi dengan corong pisah, fase *n*-heksana terletak di atas dan fase air terletak di bawah. Fraksi *n*-heksana yang didapat dipekatkan dengan menggunakan evaporator pada suhu 40°C. Residu yang didapat dari fraksi *n*-heksana dilanjutkan fraksinasi 3 kali dengan pelarut etil asetat masing masing 75 ml. Hasil yang didapat adalah fraksi etil asetat yang terletak di atas dan fraksi air yang di bawah kemudian dipekatkan dengan menggunakan evaporator pada suhu 40-50°C sedangkan fraksi air dipekatkan dalam penangas air (Harborne 2006).

8. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak

1. Flavonoid. Sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam etanol kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi. Serbuk Mg dan HCl pekat ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Hasil tersebut ditambah amil alkohol, dikocok dengan kuat dan dibiarkan hingga memisah. Bila terdapat flavonoid maka akan membentuk warna merah atau coklat pada lapisan amil alkohol (Depkes RI 1995).

2. Tanin. Sebanyak 1 mg bahan uji dimasukkan dalam tabung reaksi. ditambahkan 1 mL FeCl₃ 10%, lalu dikocok sampai homogen. Jika terbentuk warna hijau, merah, ungu, biru tua menunjukkan adanya kandungan tanin (Robinson 1995).

3. Alkaloid. Sebanyak 1 mg bahan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 5 ml HCl 2N. Larutan yang didapat kemudian dibagi menjadi 3 tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai blanko, kedua ditambahkan pereaksi dragendroff sebanyak 3 tetes, dan tabung ketiga ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid (Robinson 1995).

4. Saponin. Sebanyak 1 mg bahan uji dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 10 ml air panas, lalu dikocok kuat sampai homogen selama 10 detik. Terbentuk buih mantab selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan HCl 2N, buih akan hilang (Depkes 2005).

5. Triterpenoid/steroid. Larutan uji sebanyak 2 mL diuapkan dalam cawan penguap. Residu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform, dipindahkan ke tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Ciulei, 1984 dalam Putri dkk. 2015).

9. Identifikasi kandungan senyawa kimia dengan kromatografi lapis tipis

Penyiapan fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan panjang 8 cm dan lebar 2 cm, kemudian dicuci dengan metanol, diaktivasi dengan oven pada suhu 100°C selama 10 menit. Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 1 ml etanol kemudian ditotolkan pada fase diam.

1. Identifikasi senyawa flavonoid. Fase gerak asam asetat glacial : butanol : air (1:4:5), dengan penampak noda uap ammonia. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna kuning coklat setelah diuapi ammonia pada pengamatan dengan sinar tampak dan berwarna biru pada UV 366 nm menegaskan adanya kandungan flavonoid (Marliana 2005).

2. Identifikasi senyawa steroid. Fase gerak yang digunakan adalah Kloroform - metanol (9:1), dengan penampak noda pereaksi Liberman-Buchard disertai dengan pemanasan pada suhu 105°C selama 1 menit. Reaksi positif steroid ditunjukkan dengan adanya noda berwarna hijau biru (Kristanti dkk. 2008).

3. Identifikasi senyawa tanin. Fase gerak metanol-air (6:4), dengan penampak noda Pereaksi FeCl₃ 5 %. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna hitam (Banu dan Nagarajan 2014).

4. Identifikasi senyawa alkaloid. Fase gerak yang digunakan adalah etil asetat : metanol : air (100:16,5:13,5) dengan penampak noda pereaksi dragendorf. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya bercak coklat jingga berlatar kuning (Harborne 1996).

10. Uji bebas alkohol ekstrak daun alamanda

Ekstrak daun alamanda bebas etanol dilakukan dan dibuktikan di Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Ekstrak

diuji etanolnya untuk mengetahui apakah ekstrak daun alamanda benar-benar bebas dari etanol, karena jika masih mengandung etanol dikhawatirkan etanol yang menghambat bakteri, karena etanol mempunyai kemampuan dalam menghambat bakteri. Ekstrak daun alamanda diuji etanolnya dengan melakukan uji esterifikasi etanol menggunakan reagen H_2SO_4 pekat dan CH_3COOH kemudian dipanaskan, hasil uji bebas etanol dalam ekstrak daun alamanda ditandai dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

11. Inokulasi bakteri pada media BHI

Inokulasi dilakukan untuk memindahkan dan meremajakan bakteri. Pertama jarum Ose dipanaskan sampai berpijar, lalu didinginkan, diambil kultur bakteri *S. mutans* ATCC 25175 kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi media *Brain Heart Infussion* (BHI) lalu ditutup dan dipanaskan kembali Ose.

12. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan bakteri *S. mutans* ATCC 25175 dalam biakan murni diambil dengan ose steril, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi media *Brain Heart Infussion* (BHI) yang kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan Mc Farland 0,5 yang menunjukkan konsentrasi kekeruhan bakteri sama dengan 10^8 CFU/mL, kemudian diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam.

1. Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Identifikasi mikroskopis bakteri *S. mutans* ATCC 25175 dilakukan dengan cara pengecatan Gram. Pertama dibuat apusan diatas objek glass, kemudian difiksasi. Selanjutnya ditetesi pewarna Gram A yang berisi kristal violet selama 1 menit, lalu cuci lanjutkan ditetesi dengan pewarna Gram B yang berisi lugol iodine sebagai mordant selama 1 menit. Cuci kembali dan dilanjutkan dengan ditetesi pewarna Gram C sebagai peluntur selama 30 detik kemudian dicuci. Terakhir ditetesi dengan pewarna Gram D yang berisi safranin selama 1 menit kemudian dicuci dan dikeringanginkan, setelah kering amati dengan mikroskop, jika didapat hasil berbentuk coccus berderet dan berwarna violet maka hasil pewarnaan adalah Gram positif bakteri *S. mutans* ATCC 25175.

2. Uji Biokimia. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil bakteri *S. mutans* ATCC 25175 dari kultur murni kemudian ditusukkan pada

media MSA (*Manitol Salt Agar*) dan dikultur pada media agar darah. Pengamatan dilakukan setelah media diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Perubahan warna yang terjadi pada media MSA yaitu dari merah menjadi kuning (asam) hasil menunjukkan bahwa *S. mutans* dapat memfermentasi manitol (Jawetz *et al.*, 2005). Perubahan yang terjadi pada media agar darah yaitu adanya hemolisis pada sel darah merah dengan adanya koloni berwarna putih dengan koloni berwarna hijau. *S. mutans* mempunyai tipe α -hemolitik yaitu melisis sel darah merah secara parsial akibat reduksi hemoglobin sehingga memperlihatkan warna kehijauan disekitar koloni (Radji 2011).

3. Uji Katalase. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengoleskan biakan murni *S. mutans* ATCC 25175 pada objek glas selanjutnya ditetesi dengan menggunakan pereaksi H₂O₂. Jika tidak terbentuk gas berupa gelembung-gelembung udara pada pereaksi H₂O₂ maka hasil uji katalase adalah positif bakteri *S. mutans* ATCC 25175 (Jawetz *et al.* 2013).

4. Uji Koagulase. Pengujian ini dilakukan dengan memasukkan bakteri *S. mutans* dalam plasma sitrat, selanjutnya diamati ada tidak gumpalan yang terbentuk. Jika terbentuk gumpalan maka hasil uji koagulase adalah positif bakteri *S. mutans* (Lay 1994).

13. Pengujian aktivitas antibiofilm ekstrak daun alamanda (*A. cathartica* L.)

13.1 Penentuan panjang gelombang maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang (λ) maksimal dari biofilm *S. mutans* dengan menggunakan alat *iMark- Biorad Microplate Reader*. Pembacaan menggunakan panjang gelombang rentang 500-600 nm. Sampel yang digunakan adalah suspensi bakteri *S. mutans* ATCC 25175 dan dicukupkan dengan penambahan media BHIB hingga 200 μ l kedalam tiap *wells* kemudian dilakukan pembacaan panjang gelombang maksimum.

13.2. Evaluasi pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175. Evaluasi pembentukan biofilm dari *S. mutans* dilakukan dengan cara masukkan 75 μ l BHI ditambah 2% sukrosa dan 25 μ l suspensi bakteri dan diinkubasi selama 4 hari pada suhu 37°C. *Microplates* kemudian dibilas menggunakan air mengalir dan sumuran pada *microplates* diwarnai dengan 0,1% kristal violet selama 15

menit, kemudian dibilas, apabila *microplates* tetap berwarna ungu, maka telah terbentuk biofilm pada sumuran *microplate* (Rasamiravaka *et al.* 2015).

13.3 Uji aktivitas penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 secara *In Vitro*. Pembentukan biofilm pada penelitian ini diuji secara *in vitro* menggunakan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* (Chamdit and Siripermpool 2012). Pengujian aktivitas penghambatan biofilm bertujuan untuk mendapatkan aktivitas dari daun alamanda dalam menghambat pertumbuhan biofilm *S. mutans* secara *in vitro* menggunakan *microtiterplater flat-bottom polystyrene 96 wells*. Pengujian dilakukan dengan cara ekstrak dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dan media dimasukkan secara bersamaan ke dalam tiap *well* dimasukkan media BHI sebanyak 60 μ l, suspensi bakteri uji sebanyak 70 μ l, ekstrak dan fraksi aktif daun alamanda 70 μ l dengan variasi konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 mg/mL Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 hari. *Microplate* dicuci dengan air mengalir sebanyak 3 kali, kemudian ditambahkan 200 μ l larutan kristal violet 1% ke dalam tiap *well* dan di inkubasi pada suhu ruang selama 15 menit, lalu cuci *microplate* menggunakan air mengalir sebanyak 3 kali, lalu tambahkan larutan etanol 96% sebanyak 200 μ l pada tiap *well* dan inkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Media BHIB dan suspensi bakteri sebagai kontrol negatif, kontrol positif menggunakan listerine® 45% v/v, kontrol pelarut yang digunakan yaitu DMSO 20% v/v, kontrol media yaitu hanya berisi media BHIB. Kemudian hasilnya dibaca menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang maksimum. Pengujian penghambatan biofilm dilakukan replikasi 3 kali, Hasil pembacaan merupakan nilai absorbansi atau *Optical Density* (OD) yang menggambarkan kuantitas pembentukan biofilm. Persentase penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 dihitung dengan menggunakan rumus berikut (Pratiwi, Lagendijk, Hertiani, De Weert, & Van Den Hondel 2015)

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \left(\frac{xODt - xODmc}{xODvc} \right) \right) \times 100\%$$

Keterangan :

ODt = *Optical Density* sumuran yang diuji

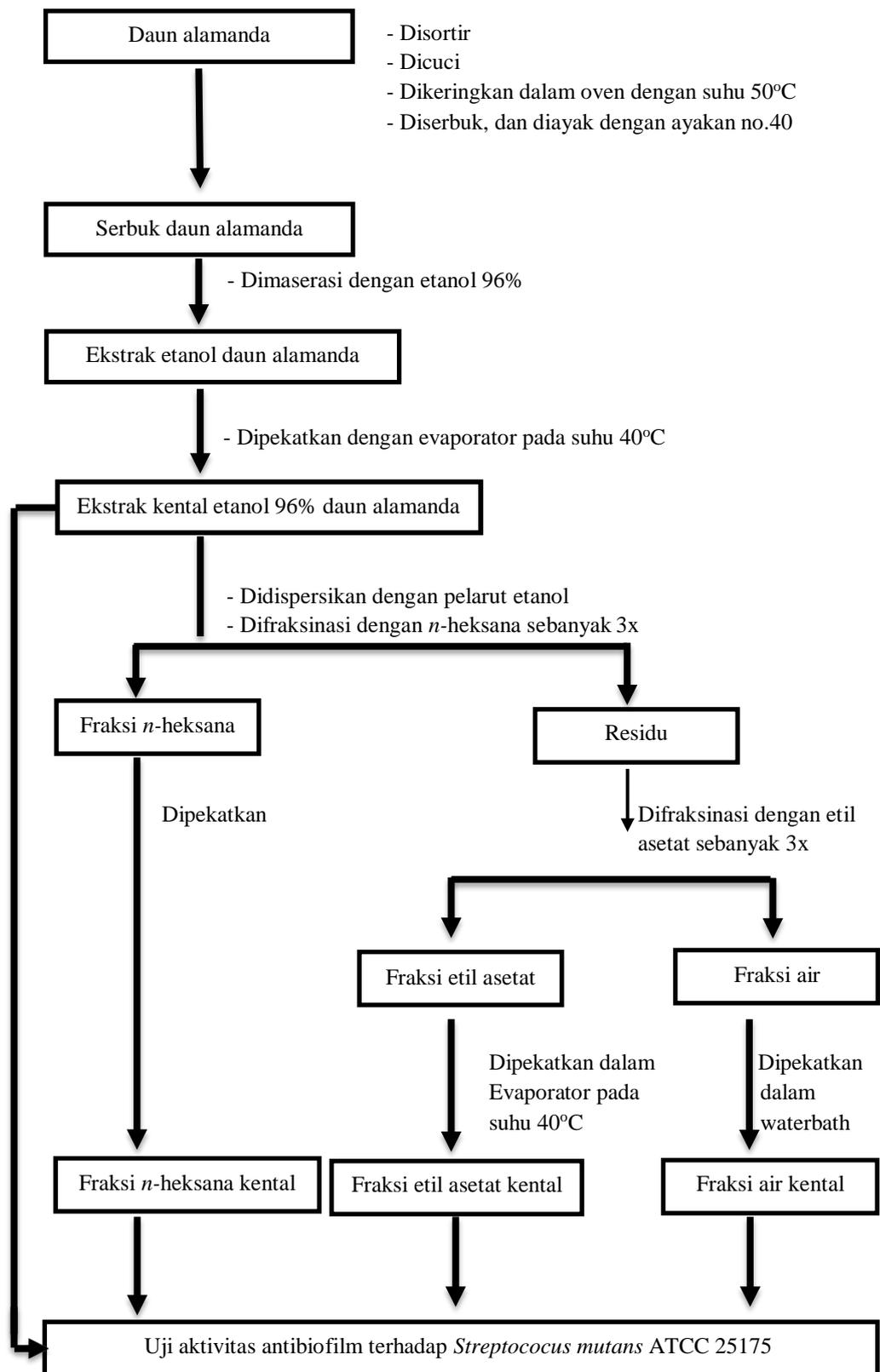
ODmc = *Optical Density* kontrol media dengan suspensi bakteri

ODvc = *Optical Density* kontrol pelarut

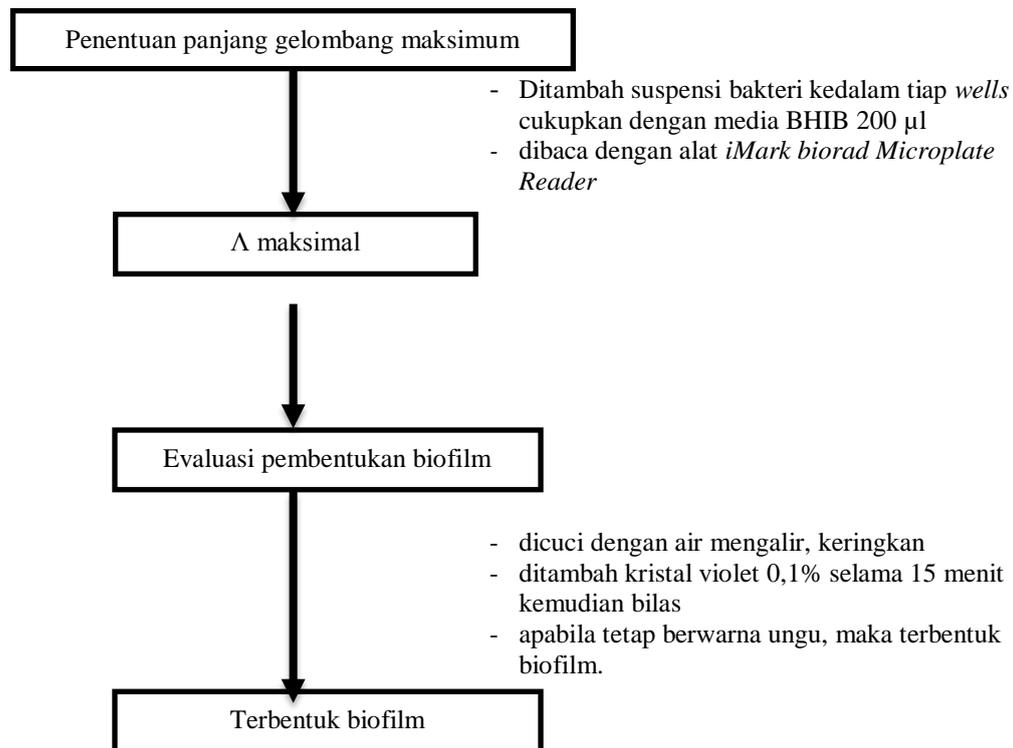
Kemudian pengujian aktivitas penghambatan antibiofilm *S. mutans* ATCC 25175 dinyatakan dengan parameter IC_{50} (*Inhibition Concentration*) yaitu konsentrasi senyawa uji yang menghambat biofilm sebesar 50%. Nilai IC_{50} ditentukan dari persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel dengan persentase penghambatan biofilm. Persamaan regresi linier, harga r tabel dengan taraf kepercayaan 0,95. Harga IC_{50} berbanding terbalik dengan aktivitas penghambatan biofilm yaitu semakin besar harga IC_{50} maka aktivitas penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 semakin kecil, artinya konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat biofilm sebesar 50% semakin besar (Tatiana 2018).

E. Analisis Data

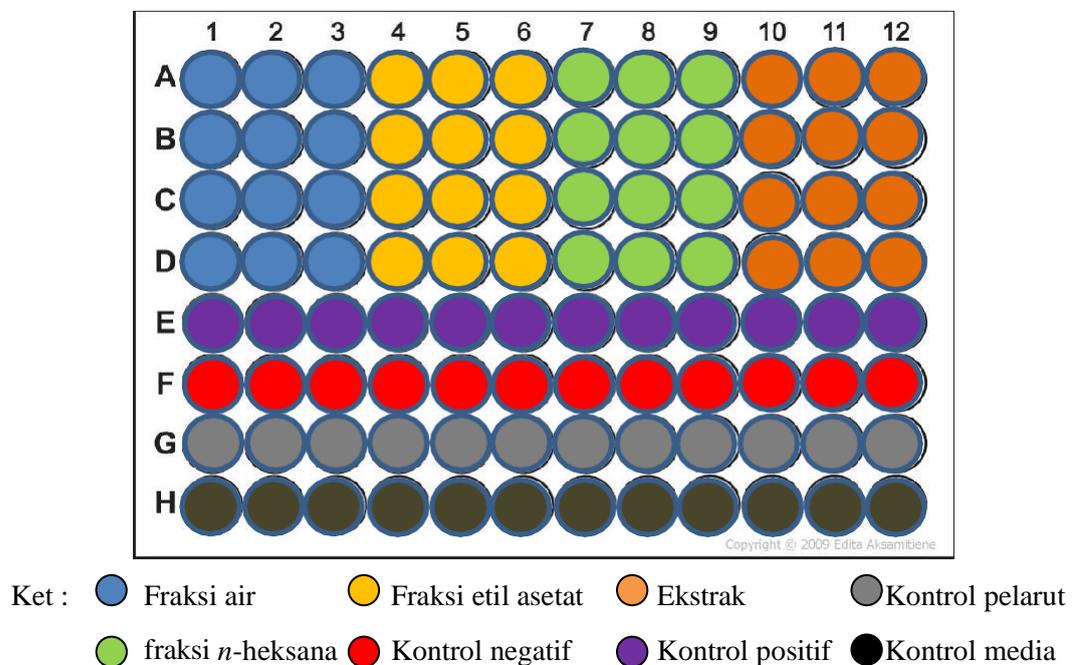
Data hasil penelitian pengujian aktivitas ekstrak dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun alamanda (*A. Cathartica* L.) terhadap penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 dianalisis secara statistik, Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov*, jika terdistribusi secara normal atau homogen kemudian dilanjutkan dengan Uji *One-Way analysis of varian* (ANOVA), jika tidak terdistribusi secara normal atau tidak homogen maka dilakukan Uji *Kruskal Wallis*. Kemudian apabila aktivitas antibiofilm berbeda secara bermakna ($p \leq 0,05$), sehingga dilanjutkan uji *posthoc*.



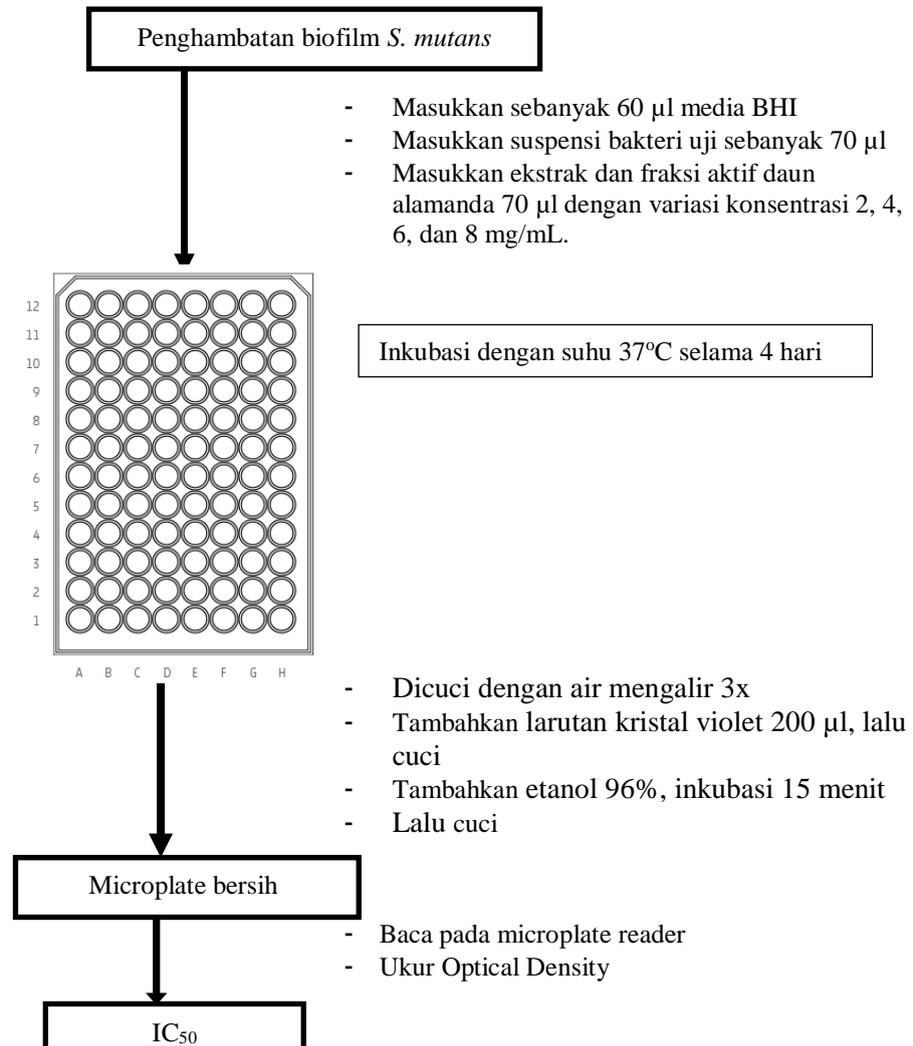
Gambar 3. Skema pembuatan Ekstraksi dan Fraksinasi daun alamanda



Gambar 4. Skema optimasi dan evaluasi pembentukan biofilm



Gambar 5. Tata letak uji antibiofilm



Gambar 6. Penghambatan biofilm