

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Juni - Agustus 2020 bertempat di Laboratorium Farmasi dan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan, Bogor dan Institut Pertanian Bogor.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan yaitu: timbangan digital (LabPro®), timbangan analitik (And®), alat penggiling (*grinder*), *autoklaf* (All American®), oven (Memmert®), kain batis, alumunim foil, krus, *ose*, penjepit kayu, batang pengaduk, pembakar spiritus, alat refluks (pemanas listrik, labu leher tiga, kondensor), *Hot Plat stirrer* (Termo Scientific Cimarec®), *Laminar Air Flow* (LAF), *Vacum dry*, tanur(Vulcan A-55®), masker, sarung tangan, penangas air, serta alat-alat gelas seperti erlenmeyer; gelas ukur; labu ukur; tabung reaksi, corong kaca dll. (Pyrex®), vial.

Bahan yang diigunakan yaitu: Kulit kayu manis yang berasal dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO), etanol 96% (Emsure®), n-heksan (Emsure®), etil asetat (Emsure®), Media NA (Nutrient Agar), NaCl fisiologis, *paper disk whatman*, antibiotik Amoksilin, *Staphylococcus aureus* serta bahan-bahan kimia lainnya.

3.3 Tahapan Persiapan Bahan Penelitian

3.3.1 Persiapan Bahan Penelitian

Kulit kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO), kemudian tanaman kayu manis dilakukan determinasi di Herbarium, Pusat Konservasi Tumbuhan, pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Bogor.

3.3.2 Pembuatan Serbuk Simplisia Kayu Manis

Kayu manis yang akan dibuat serbuk simplisia adalah kulit kayu manis yang sudah tua dan berumur lebih dari 5 tahun yang ditandai dengan kulit batang yang sudah tebal dan berwarna coklat tua. Lalu kayu manis yang telah didapatkan dibersihkan dari pengotor, kemudian dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan kulit kayu manis dari kotoran yang masih menempel. Setelah itu kulit kayu manis dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C. Setelah kulit kayu manis kering lalu dihaluskan dan selanjutnya diayak menggunakan ayakan mesh 40. Dan selanjutnya rendemen dihitung dengan menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot serbuk simplisia}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

3.3.3 Uji Karakteristik Simplisia dan Ekstrak

3.3.3.1 Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara gravimetri yaitu sampel ditimbang sebanyak 2 gram, lalu dimasukkan kedalam cawan penguap yang sebelumnya sudah ditara. Lalu simplisia dikeringkan selama 5 jam pada suhu 105°C, dan kemudian ditimbang pada jarak waktu 1 jam sampai didapatkan perbedaan antara 2 kali penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,0025 g. (Wiendarlina, dkk 2019). Dan selanjutnya kadar air dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Kadar air} = \frac{W1 - W2}{\text{bobot sampel}} \times 100\%$$

Keterangan : W1 = Bobot cawan + isi sebelum pemanasan

W2 = Bobot cawan + isi setelah pemanasan

3.3.3.2 Penetapan Kadar Abu

Penetapan kadar abu dilakukan dengan cara menimbang 2 gram sampel yang kemudian di masukan pada kurs porselen yang telah ditara setelah dipijarkan pada suhu 600°C. Lalu ditara sampel didalam kurs , yang kemudian akan dipijarkan perlahan hingga arang habis, kemudian sampel yang telah dipijarkan ditimbang

hingga konstan kembali setelah didinginkan dengan selisih 0,25% (DepKes RI, 2013).. Kadar abu dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{bobot krus isi} - \text{bobot krus kosong}}{\text{bobot sampel}} \times 100\%$$

3.3.4 Ekstraksi dengan Metode Refluks

500 gram serbuk kulit batang kayu manis disiapkan lalu 250 gram dimasukkan kedalam labu dasar bulat, kemudian ditambahkan 1250 ml pelarut n-Heksan dan dilakukan pengulangan untuk serbuk yang sama sebanyak 2x. Kemudian labu dasar bulat diset alat refluks dan serbuk simplisia direfluks pada suhu titik didih pelarut selama 3 jam. Setelah itu, residu diekstraksi kembali dengan pelarut etil asetat dengan waktu yang sama, setelah itu diulangi lagi dengan pelarut etil asetat dan etanol 96%. Kemudian hasil refluks disaring hingga diperoleh ekstrak kulit kayu manis. Ekstrak dari kulit kayu manis hasil dari refluks kemudian dievaporasi untuk menghilangkan pelarutnya hingga diperoleh ekstrak kental kulit kayu manis (Rusidi, 2018).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

3.3.5. Skrining Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti. Pemilihan pelarut dan metode dalam mengekstraksi merupakan faktor yang berpengaruh terhadap hasil pengujian fitokimia. Pengujian fitokimia pada kulit kayu manis dilakukan secara kualitatif dengan melihat perubahan warna dan pengendapan. Pengujian yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin.

3.3.5.1 Uji Alkaloid

Ditimbang 20 mg sampel dan dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 5 ml HCL 2M lalu dipanaskan dengan penangas air hingga mendidih setelah itu didinginkan dan kemudian disaring.

1. Uji Degendroff (Kalium bismuth nitrat). Pada pengujian ini hasil positif adanya alkaloid jika terbentuknya endapan coklat. Pengujian tabung pertama dengan menambahkan beberapa tetes pereaksi degendroff.
2. Uji mayer (Kalium merkuri iodida). Dengan menambahkan beberapa tetes pereaksi mayer pada tabung kedua larutan uji. Hasil positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih kekuningan.
3. Uji Bouchardat (Kalium iodida). Pada tabung ketiga ditambahkan beberapa tetes larutan uji bouchardat. Jika menghasilkan endapan coklat, menandakan adanya alkaloid (Hanani, 2015).

3.3.5.2 Uji Flavonoid

Pengujian Shinoda, sampel diuapkan hingga kering, lalu ditambahkan 2-3 tetes etanol dan kemudian sampel dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama ditambahkan serbuk Mg dan beberapa tetes asam klorida 5M, jika menghasilkan warna merah atau merah lembayung maka menandakan positif mengandung senyawa flavonoid. Bagian kedua ditambahkan serbuk Zn dan beberapa tetes asam klorida 5M, hasil positif mengandung flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau merah lembayung pada larutan (Hanani, 2015).

3.3.5.3 Uji Tanin

Disiapkan 0,5 gram sampel dan dilarutkan didalam akuadest lalu ditambahkan 1% gelatin dalam 10% natrium Klorida , jika menghasilkan endapan putih maka hasil tersebut menunjukkan positif mengandung tanin. Dan sebanyak 0,5 gram sampel ditambahkan larutan FeCl_3 , hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru pada larutan (Hanani, 2015).

3.3.5.4 Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air, setelah itu dikocok kuat-kuat selama 10 detik, jika menghasilkan busa yang stabil setelah penambahan asam klorida maka hasil tersebut positif (Hanani, 2015).

3.3.6 Uji Antibakteri

3.3.6.1 Sterilisasi Alat

Peralatan yang akan digunakan dalam pengujian antimikroba diantaranya adalah cawan petri, erlen meyer, tabung reaksi, kertas cakram, pipet volume, ose, dan pinset yang disterilisasi dengan cara menutup setiap peralatan dengan menggunakan kertas yang akan dimasukkan kedalam oven selama 1-2 jam pada suhu 160-180°C, sedangkan tabung reaksi ditutup dengan sumbat yang terbuat dari kapas yang dibalut dengan kain kassa (Waluyo, 2008).

3.3.6.2 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

Pada pembiakan bakteri digunakan Nutrien Agar sebagai media pertumbuhan, ditimbang sebanyak 23 gram Nutrien Agar yang dilarutkan dalam 1 liter larutan *aquadest* yang akan di panaskan hingga larut. Nutrien yang telah larut lalu disterilkan dalam *autoklaf* dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit pada suhu 121°C (Safitri, 2010).

3.3.6.3 Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri yang akan diujikan yaitu *Staphylococcus aureus* diremajakan pada medium NA dengan cara menggoreskan bakteri menggunakan jarum ose pada permukaan agar, kemudian semua biakan bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

3.3.6.4 Pembuatan Suspensi Bakteri

Hasil dari biakan bakteri yang sudah diinkubasi selama 24 jam diambil menggunakan ose, yang kemudian akan disuspensikan kedalam 5 mL larutan NaCl fisiologis steril dan diukur kekeruhannya menggunakan standar 0,5 Mc Farland.

3.3.6.5 Pembuatan Larutan Uji dan Kontrol Positif

Larutan uji dari masing-masing ekstrak n-Heksan, etil asetat, dan etanol 96% kulit kayu manis dibuat dalam seri konsentrasi, untuk pengujian KHM dibuat larutan uji ekstrak dilakukan dengan cara melarutkan 2,5 gram ekstrak dengan DMSO 1 % 10 ml sebagai stock setelah itu diencerkan menjadi konsentrasi 1%, 3%, 6% dan 12% untuk semua pelarut. Untuk mendapatkan seri konsentrasi yang ingin di uji, larutan stock dilakukan pengeceran menggunakan rumus $V1.N1 = V2.N2$.

Kontrol positif yang digunakan untuk bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu kapsul amoksisilin dan untuk kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 1%.

3.3.6.6 Preparasi Kertas Cakram

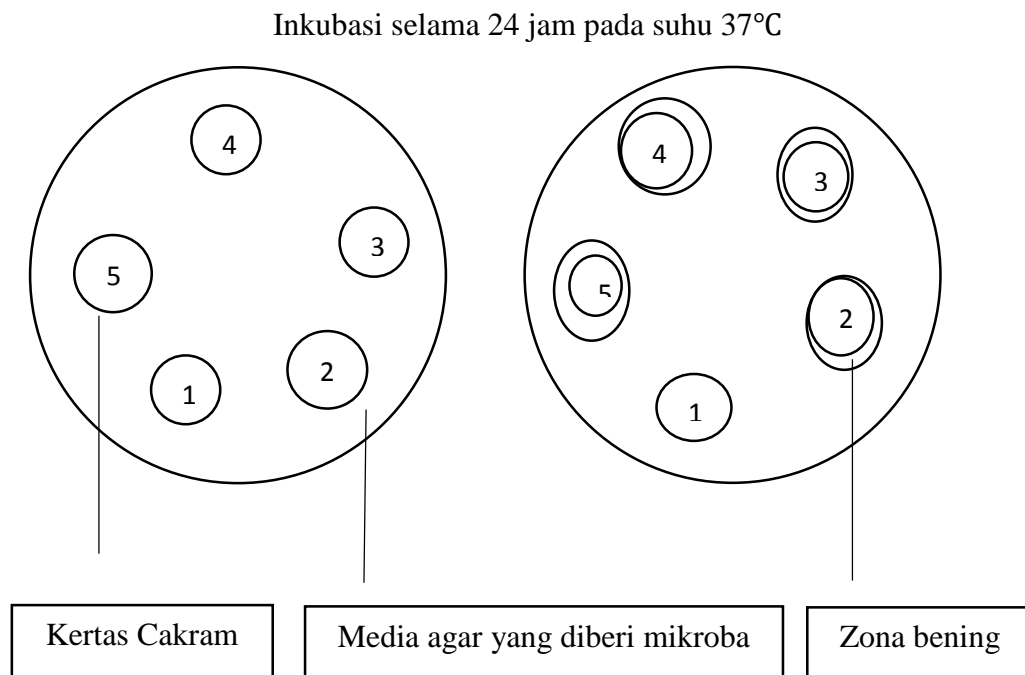
Kertas cakram dibuat dari kertas saring *whatman* dibentuk bulat dengan diameter 6mm. Kertas cakram yang telah disterilkan secara aseptis direndam dengan larutan uji, larutan kontrol positif dan larutan kontrol negatif. Secara terpisah masing-masing kertas cakram ditetesi dengan larutan sampel dan direndam selama 30 menit. Selanjutnya diambil kelebihan larutan sampel, kemudian cawan petri berisi cakram ekstrak dikeringkan ke dalam oven dengan suhu 40 - 50°C selama 24 jam hingga kering dan siap untuk digunakan.

3.3.6.7 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum

Penentuan KHM ini menggunakan metode dilusi, konsentrasi yang diuji yaitu ekstrak n-Heksan 0,37%, 0,75%, 1,5% dan 3%. Untuk ekstrak etil asetat 1,5%, 3%, 6% dan 12%, sedangkan untuk ekstrak etanol 96% yaitu 6%, 12%, 15% dan 18%, beserta kontrol positif pada pengujian dengan menggunakan media NA. Sebanyak 20 mL media steril dengan suhu 45°C dimasukkan kedalam cawan Petri, kemudian ditambahkan masing-masing konsentrasi ekstrak sebanyak 1mL secara aseptis. Selanjutnya biakan bakteri yang digunakan sebanyak 0,2 mL ditambahkan kedalam masing-masing media agar, kemudian dihomogenkan dan dibiarkan mengeras dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya diamati adanya pertumbuhan koloni bakteri atau tidak, konsentrasi terkecil yang tidak dtumbuhi oleh bakteri disebut dengan Konsentrasi Hambat Minimum atau KHM.

3.3.6.8 Penentuan Daya Hambat Ekstrak

Pada masing-masing media NA yang sudah disterilkan diberikan suspensi mikroba sebanyak 0,2 mL menggunakan pipet steril keatas media padat dan dihomogenkan dengan cara melingkar dan didiamkan hingga agak mengering. Kertas cakram yang berisi zat aktif berupa ekstrak dengan konsentrasi yang sesuai dan telah disiapkan dan diletakan diatas permukaan masing-masing media dengan menggunakan pipet steril secara aseptis. (Waluyo, 2008). Media yang sudah tersuspensi mikroba dan diatasnya diberikan kertas cakram dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.



Gambar 4. Pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram

Keterangan :

- 1 = Kontrol Negatif (DMSO 1%)
- 2 = Ekstrak etil asetat, n-Heksan dan etanol 96% kulit batang Kayu Manis 3%
- 3 = Ekstrak etil asetat, n-Heksan dan etanol 96% Kulit Batang Kayu Manis 6%
- 4 = Ekstrak etil asetat, n-Heksan dan etanol 96% Kulit Batang Kayu Manis 12%
- 5 = Kontrol Positif (Amoksilin)

Setelah 24 jam bakteri diinkubasi selanjutnya diukur luas area bening yang terbentuk pada setiap disekitar cakram disc perlakuan kontrol pada cawan petri menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05mm (Waluyo, 2008). Lalu dibandingkan dengan area bening dari cakram uji ekstrak kulit kayu manis, kontrol positif dan kontrol negatif yang bertujuan untuk membandingkan sensitifitas mikroba terhadap ekstrak kulit kayu manis. Diameter daerah bening yang terbentuk

dikurangi dengan diameter kertas cakram (6mm), pengujian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Perhitungan Lebar Daerah Hambat (LDH) :

$$LDH = \frac{DDH - DC}{2}$$

Keterangan : LDH = Lebar daerah Hambat (mm)

DDH = Diameter Daya Hambat (mm)

DC = Diameter Cakram (mm)

3.3.6.9 Parameter Penelitian

Parameter penelitian yang diamati adalah :

1. Menentukan nilai kadar abu dan kadar air simplisia kulit kayu manis.
2. Identifikasi senyawa fitokimia meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, yang terkandung dalam kulit kayu manis secara kualitatif dan pada ekstrak n-heksan, etil asetat, dan etanol 96%.
3. Penentuan nilai (KHM) ekstrak kulit kayu manis terhadap *Staphylococcus aureus*.
4. Pengukuran (LDH) ekstrak kulit kayu manis dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk terhadap *Staphylococcus aureus*.

3.3.6.10 Analisis Data

Analisis data dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan hasil LDH dengan perlakuan. Hasil data pengamatan LDH dikumpulkan dan diolah secara statistik menggunakan Tabel ANOVA (Analysis of Variance) dengan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap) menggunakan program IBM® SPSS® Statistic 24 for Windows. Perlakuan masing-masing 3 kali dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha \leq 0,05$) untuk masing-masing bakteri, dimana 1 jenis pelarut terdiri dari 3 ekstrak perlakuan konsentrasi diulang sebanyak 3 kali. Setelah dianalisis dengan RAL selanjutnya dianalisis menggunakan uji Duncan.

Mode matematika yang biasa digunakan dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} = Pengamatan terhadap perlakuan ke i pada pengulangan ke j

μ = Rataan Umum

τ_i = Pengaruh perlakuan ke i yang diuji

ε_{ij} = Komponen eror acak (setiap perlakuan ke i dengan ulangan ke j)

i = Taraf Pengulangan (1,2,3)

j = Taraf perlakuan pemberian ekstrak (konsentrasi 1,2,3; kontrol positif dan kontrol negatif)

Daftar analisis dan kaidah keputusan dapat dilihat pada tabel 1 dan Tabel 2, untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan, maka uji dilanjut menggunakan uji Duncan

Tabel 1. Daftar *Analysis of Variant* (ANOVA) untuk RAL

No.	Sumber Ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadran	Kuadran Tengah	F Hitung	F Table (0,05)
1	Perlakuan	t-1	$\Sigma x^2/r - (x..)^2/rt$	JK1/DB1	KT1/KT2	
2	Galat	t(r-1)	$\Sigma 9 \Sigma x_{ij}^2 - x_i^2 / r$	JK2/DB2		
	Total	Rt-1	$\Sigma x_{ij}^2 - (x..)^2 / r$			

Tabel 2. Kaidah Keputusan

Hasil Analisis	Kesimpulan Analisis	Kesimpulan Penelitian
$F_h \leq F_{0,05}$	Tidak Nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antar perlakuan

$F_h 0,05 < F_h < F 0,01$	Nayat	Ada perbedaan pengaruh antar perlakuan
$F_h > F 0,01$	Sangat Nyata	Ada perbedaan sangat nyata antar perlakuan

Sumber : Matjik dan Sumertajaya, 2013.