

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode dari penelitian ini adalah eksperimental karena peneliti melakukan kegiatan dimana dibuat dan diatur oleh peneliti sendiri dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak buah parijoto. Adapun rancangan penelitian yang digunakan adalah *post-test only control group design*.

B. Waktu dan lokasi Penelitian

1. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei – Juli 2019.

2. Lokasi penelitian

- a. Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo proses penimbangan ekstrak dan waterbath.
- b. Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo proses pembuatan ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) dan pengentalan ekstrak.
- c. Laboratorium Biologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo proses penanaman bakteri dan proses penanaman dalam perlakuan ekstrak terhadap bakteri.
- d. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNDIP untuk determinasi

C. Waktu dan lokasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah buah parijoto diambil dari daerah Colo, Kabupaten Kudus, Jawa Tengah. Kondisi kulit buah yang diperoleh dipilih kualitas yang paling baik. Sedangkan sampel dari penelitian ini adalah pengujian aktivitas antibakteri buah parijoto.

D. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

a. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau sebab perubahan timbulnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanolik buah parijoto (*Medinilla speciosa* B) dengan konsentrasi 5%, 7,5%, dan 10% (b/v).

b. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

c. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah alat, bahan, suhu, pencampuran bahan, dan kondisi laboratorium.

2. Definisi Operasional

a. Aktivitas antibakteri ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* B)

Ekstrak etanolik buah parijoto (*Medinilla speciosa* B) dengan konsentrasi 5%, 7,5%, dan 10% (b/v).

b. Zona hambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Zona hambat merupakan area ataupun zona bening dimana bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terhambat pertumbuhannya akibat ekstrak buah pariijoto (*Medinilla speciosa* B). Diameter hambat yang diperoleh dari senyawa yang berpotensi sebagai antimikroba. Hasil tersebut dapat diukur karena di sekitar kertas cakram memperlihatkan terbentuknya area ataupun zona bening. Zona bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji dan dinyatakan dengan diameter zona hambat.

E. Pengumpulan Data

1. Pengumpulan Bahan

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah pariijoto (*Medinilla speciosa* B) diambil dari daerah Colo, Kudus Jawa Tengah.

2. Determinasi Tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah Identifikasi tanaman dalam tahap penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel buah pariijoto yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis dan mencocokkan morfologis yang ada dalam tanaman yang akan diteliti terhadap kepustakaan. Determinasi dilakukan di Laboratorium Ekologi dan biosistemik, Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

3. Penyiapan Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender (Maspion), cawan penguap (Iwaki), cawan petri (Pyrex) dan (Iwaki), penangas air/waterbath, beaker glass (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), mikroskop cahaya (Olympus), LAF(*Laminar Air Flow*) (Purifer), timbangan analitik (Ohrus), pipet mikro (Socorex), labu erlenmeyer (Herma), inkubator (Memmert IN30), autoclave (All American), tabung reaksi (Pyrex), jarum inokulum/ose, bunsen, batang pengaduk, spatula logam (Sellaco), pipet tetes (Pudak), rotary evaporator (RE100-PRO), kertas label, aluminium foil, kertas pembungkus, kertas cakram steril (Oxoid), dan seperangkat alat maserasi.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Etanol 70%, etanol 96%, Media *Nutrien Agar*, bahan uji mikrobiologi yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa*

4. Pembuatan Simplisia

Buah parijoto (*Medinilla speciosa* B) dibersihkan dengan cara dicuci dengan air mengalir kemudian disortasi basah dan dilakukan perajangan menjadi bentuk lebih kecil untuk memudahkan pengeringan selanjutnya dikeringkan pada suhu tidak lebih dari 60°C sampai kadar air kurang dari 10%. Pengeringan tersebut bertujuan untuk mengurangi kadar air dan reaksi enzimatik pada simplisia buah parijoto (*Medinilla speciosa* B). Simplisia yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender, dan diayak

menggunakan ayakan nomor 20 mesh. Proses penghalusan dilakukan agar memperkecil ukuran partikel dan memperbesar luas permukaan sehingga pada saat dilakukan proses ekstraksi akan membuat pelarut masuk ke dalam simplisia dan dapat menarik semua zat aktif yang ada di dalamnya secara maksimal, kemudian dikeringkan dalam lemari pengering simplisia pada suhu 30°C selama 3 – 4 hari.

5. Ekstraksi Menggunakan Metode Maserasi

Serbuk simplisia buah parijoto (*Medinilla speciosa* B). ditimbang 300 gr kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% dan 96% sebanyak 3000 ml (1:10) direndam selama ± 48 jam dengan beberapa kali pengadukan, kemudian disaring dengan kertas saring dan dievaporasi dengan *vacum rotary evaporator* suhu 78°C sehingga diperoleh ekstrak kental buah parijoto (*Medinilla speciosa* B).

Ekstrak kental yang dihasilkan diuapkan dalam oven dengan suhu 40°C hingga seluruh pelarut etanol menguap. Ekstrak ditimbang dan disimpan dalam wadah gelas tertutup sebelum digunakan untuk pengujian. Kemudian ekstrak kental tersebut dihitung persen (%) randemen menggunakan rumus: (Putri *et al.*, 2013)

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental}}{\text{Bobot simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

6. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan pada ekstrak etanol 70% dan etanol 96%. Pengujian ini dilakukan untuk menguji adanya golongan

senyawa metabolit sekunder flavonoid, saponin, tanin, dan glikosida.

Prosedur pengujian adalah sebagai berikut :

a. Uji Flavonoid

Ekstrak ditetesi dengan larutan NaOH pembentukan warna kuning intens, yang kemudian memudar pada saat penambahan larutan asam, menunjukkan adanya flavonoid (Tiwari *et al.*, 2011).

b. Uji Saponin

Pada 0,5g ekstrak ditambahkan 5mL air suling dalam tabung reaksi. Kocok campuran ekstrak dan air dan diamati hingga terbentuk buih yang stabil (Ayoola *et al.*, 2008).

c. Uji Tanin

Sebanyak 0,5g ekstrak direbus dalam 10mL air dalam tabung reaksi dan kemudian disaring. Ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 0,1% dan diamati warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman (Ayoola *et al.*, 2008).

d. Uji Glikosida

Sejumlah 0,5g ekstrak yang diencerkan dengan 5mL air ditambah dengan asam asetat glasial yang berisi satu tetes larutan FeCl_3 . Kemudian ditambah dengan 1mL asam sulfat pekat. Terbentuknya cincin coklat pada permukaan mengindikasikan adanya gula deoksi kardenolida (Ayoola *et al.*, 2008).

F. Pengujian Anti Bakteri

1. Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas seperti cawan petri, pipet, labu takar, beker glass, pengaduk, dan lain-lain disterilisasi dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit kemudian di oven kering selama 2-3 jam pada suhu 160°C-180°C. Media yang disterilkan ditempatkan di dalam autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C, kemudian didinginkan dan disimpan dalam lemari es (Dwidjoseputro, 2003). *Laminar air flow* disterilkan dengan dibersihkan dari debu lalu disemprot dengan etanol 70%. Jarum ose disterilkan dengan cara flambeer (pemijaran) dengan melewatkannya pada nyala api lampu spiritus.

2. Pengujian Skrining Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak etanol 70% dan 96% buah pari-joto (*Medinilla speciosa* B). Metabolit sekunder yang diuji secara kualitatif ini antara lain flavonoid, saponin, glikosida, dan tanin, antara lain :

- a. Uji Flavonoid Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dengan 2 mL etanol 70% dan ditambahkan 3 tetes larutan NaOH. Terjadinya perubahan intensitas warna kuning menjadi tidak berwarna pada penambahan asam sulfat mengindikasikan adanya senyawa flavonoid (Tiwari. *et al.*, 2011).

- b. Uji Saponin Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 20mL aquades, kemudian larutan dikocok dalam labu ukur selama 15 menit. Terbentuknya busa setinggi 1 cm mengindikasikan adanya senyawa saponin (Farnsworth, 1969).
- c. Uji Glikosida Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 1 mL aquades dan ditambahkan larutan NaOH. Terbentuknya warna kuning mengindikasikan adanya senyawa glikosida (Tiwari. *et al.*, 2011).
- d. Uji Tanin Sebanyak 0,5 gram ekstrak dididihkan dalam 10 ml aquadest dalam tabung reaksi, lalu disaring. Kemudian kedalam filtrat ditambahkan 3 tetes larutan FeCl₃. Terbentuk warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman menunjukkan adanya tannin (Ayoola, 2008).

3. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Uji

Pada penelitian ini seri konsentrasi ekstrak uji ekstrak etanol 70% dan etanol 96% yang digunakan adalah 5%, 7,5%, dan 10% menggunakan pelarut dimetilsulfoksida (DMSO) sebanyak 10ml (Natheer *et al.*, 2012). Ekstrak uji konsentrasi 5% ditimbang ekstrak sebanyak 0,05gram ditambah 10ml DMSO diencerkan hingga homogen, konsentntrasi 7,5% ditimbang 0,075gram ditambah 10ml DMSO, konsentrasi 10% ditimbang ekstrak 0,1 ditambah 10ml DMSO. Kertas cakram steril direndam dengan 10ml larutan ekstrak uji dan dikeringkan dalam cawan petri steril pada suhu ruangan.

4. Pembuatan Media Nutrien Agar

Sebanyak 10 gram NA ditimbang sebanyak 5 gram lalu dilarutkan dengan pemanasan dalam 250 ml aquadest pada erlenmeyer dipanaskan hingga larut dan bening, kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. pembuatan agar miring NA dilakukan dengan memasukan media yang telah disterilkan kedalam tabung reaksi sebanyak ± 5 ml, tabung disumbat dengan kapas steril dan diletakan miring $\pm 45^{\circ}$ ditunggu hingga setengah memadat. (Alexander, 2007)

5. Peremajaan Bakteri

Bakteri uji dari stok kultur diremajakan dengan cara menggores 1-2 jarum ose biakan mikroba pada media agar miring NA, lalu diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 30-37°C.

6. Pembuatan Suspensi Bakteri

Dalam pembuatan suspensi bakteri menggunakan metode bidang miring dengan alat tabung. Langkah pertama pembuatan Nutrien Agar dengan tambahan aquadest lalu dilarutkan, setelah larut NA dituang didalam tabung yang sudah di sterilisasi dengan memiringkan tabung ditunggu sampai setengah memadat lalu pengambilan bakteri menggunakan ose digoreskan zig-zag di permukaan NA yg sudah setengah memadat. Setelah itu dilakukan penuangan NaCl hingga mencapai batas ujung NA ditutup rapat dan disimpan dalam inkubator

dengan suhu ruang 27°C selama 24 jam. (Lopez, 2003; Widiastomo, 2013).

7. Identifikasi Bakteri Uji

Pewarnaan bakteri uji yang dilakukan adalah pewarnaan Gram. Pewarnaan bakteri dilakukan untuk identifikasi dan untuk memastikan tidak ada kontaminan pada kultur kerja. Kaca obyek yang akan digunakan terlebih dahulu dibersihkan dengan alkohol 70% dan dikeringkan. Dibuat lingkaran dengan pensil warna di bagian bawah kaca obyek untuk menandai tempat bakteri. Identifikasi bakteri uji dilakukan dengan teknik pewarnaan Gram menggunakan Gram A, B, C dan D. Warna bakteri mengandung kristal violet, sewaktu proses pewarnaan Gram. Bakteri Gram negatif akan berwarna merah, karena warna ungu dapat dilunturkan mengikat cat Gram D sebagai warna kontras. Perbedaan klasifikasi antara Gram positif dan negatif adalah didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri (Jawetz *et al.*, 2001). Bentuk dan warna sel bakteri dalam preparat diamati secara mikroskopik pada perbesaran 40 x.

8. Pembuatan Kultur Murni Bakteri

Koloni bakteri diambil menggunakan jarum ose steril kemudian ditanam dalam permukaan media Nutrien Agar (NA) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C untuk memperoleh koloni yang murni (Shinkafi, 2013).

9. Uji Aktivitas Antibakteri

Tahap pertama yang dilakukan dalam uji aktivitas antibakteri ini adalah pengenceran ekstrak menggunakan pelarut DMSO dengan menimbang ekstrak sebanyak variasi konsentrasi yang digunakan lalu di encerkan dengan larutan DMSO sebanyak 10 mL diaduk hingga homogen pengambilan ekstrak di kertas cakram diteteskan sebanyak 50 μ L. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi kertas cakram. Kertas cakram dengan diameter 6 mm diambil secara aseptis menggunakan pinset yang telah disterilisasi. Kertas cakram tersebut diteteskan dengan mikropipet sebanyak 50 μ L dalam salah satu variasi konsentrasi ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla spesiosa* B) diletakkan pada media yang berisi bakteri uji. Masing-masing perlakuan variasi konsentrasi ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla spesiosa* B) yaitu 5%, 7,5%, dan 10% dibuat pengulangan sebanyak 3 kali serta aquades steril sebagai kontrol negatif. Media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Efektivitas ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla spesiosa* B) dilihat dari zona hambat yang didapatkan. Zona hambat terlihat lebih bening dari pada daerah sekitarnya dan tidak ditumbuhi bakteri. Zona hambat diukur menggunakan jangka sorong. Zona hambat diukur dengan cara meletakkan jangka sorong pada batas luar kertas saring sampai dengan batas terpanjang dan batas terpendek daerah hambat yang terbentuk sehingga diperoleh jari-jari zona hambat terpanjang dan jari-jari zona hambat terpendek. Parameter untuk

menilai efektivitas ekstrak etanol buah pari-joto (*Medinilla speciosa* B) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* adalah menggunakan rumus berikut (Rumahlewang dalam Kristanti, 2014):

$$R = \frac{p+q}{2}$$

Keterangan:

R : diameter zona penghambatan (mm)

p : diameter zona penghambatan terpanjang (mm), dan

q : diameter zona penghambat terpendek (mm)

10. Uji Daya Hambat Antibakteri

Media Nutrien Agar sebelum digunakan ditimbang terlebih dahulu sebanyak 5 Gram lalu dipanaskan terlebih dahulu hingga larut. Medium NA yang telah larut disterilisasikan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit, kemudian medium yang telah steril didinginkan, lalu dituangkan sebanyak 20 mL kedalam cawan petri steril ditunggu setengah memadat. Setelah itu, suspensi bakteri sebanyak 500 µL disemprotkan dan dicampur dalam medium NA hingga homogen. Untuk pembuatan kontrol media, medium NA yang sudah disterilisasi didinginkan lalu dituangkan kedalam cawan petri dan dibiarkan hingga setengah memadat. Plat agar yang digunakan berukuran 100 mm. Plat agar dengan ukuran 100 mm tidak boleh berisi lebih dari 5 cakram dalam setiap plat agar. Cakram yang diletakkan pada plat agar harus memiliki jarak minimal 24 mm dari masing-masing pusat cakram (Cockerill, Patel, Alder, Bradford, & Dudley, 2013). Media agar NA yang telah disterilkan dimasukkan kedalam cawan petri steril masing-masing sebanyak 20 mL dan dibiarkan setengah memadat pada suhu kamar. Media tersebut ditetesi

dengan 500 μ L suspensi bakteri uji dan diratakan dengan menggunakan alat mikropipet sampai rata. Kertas cakram steril dengan diameter 6 mm ditetaskan ekstrak etanol 70% dan 96% buah parijoto (*Medinilla speciosa* B) sebanyak 50 μ L. Kemudian kertas cakram diletakkan diatas media dan ditekan dengan menggunakan pipet supaya menempel sempurna.

Konsentrasi 5% ditimbang sebanyak 0.05gram ditambahkan DMSO 10ml, Konsentrasi 7,5% ditimbang sebanyak 0.075gram ditambahkan DMSO 10ml, Konsentrasi 10% ditimbang sebanyak 0.1 gram ditambahkan DMSO 10ml. Pengulangan ini dilakukan hingga 3 kali. Setelah selesai diberi label, lalu diinkubasi secara terbalik selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil inkubasi berupa daerah bening di sekitar cakram menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri diinterpretasikan sebagai zona hambat dan dihitung menggunakan jangka sorong. Masing-masing konsentrasi yaitu 5%, 7,5%, dan 10% dalam b/v dan DMSO sebagai kontrol negatif.

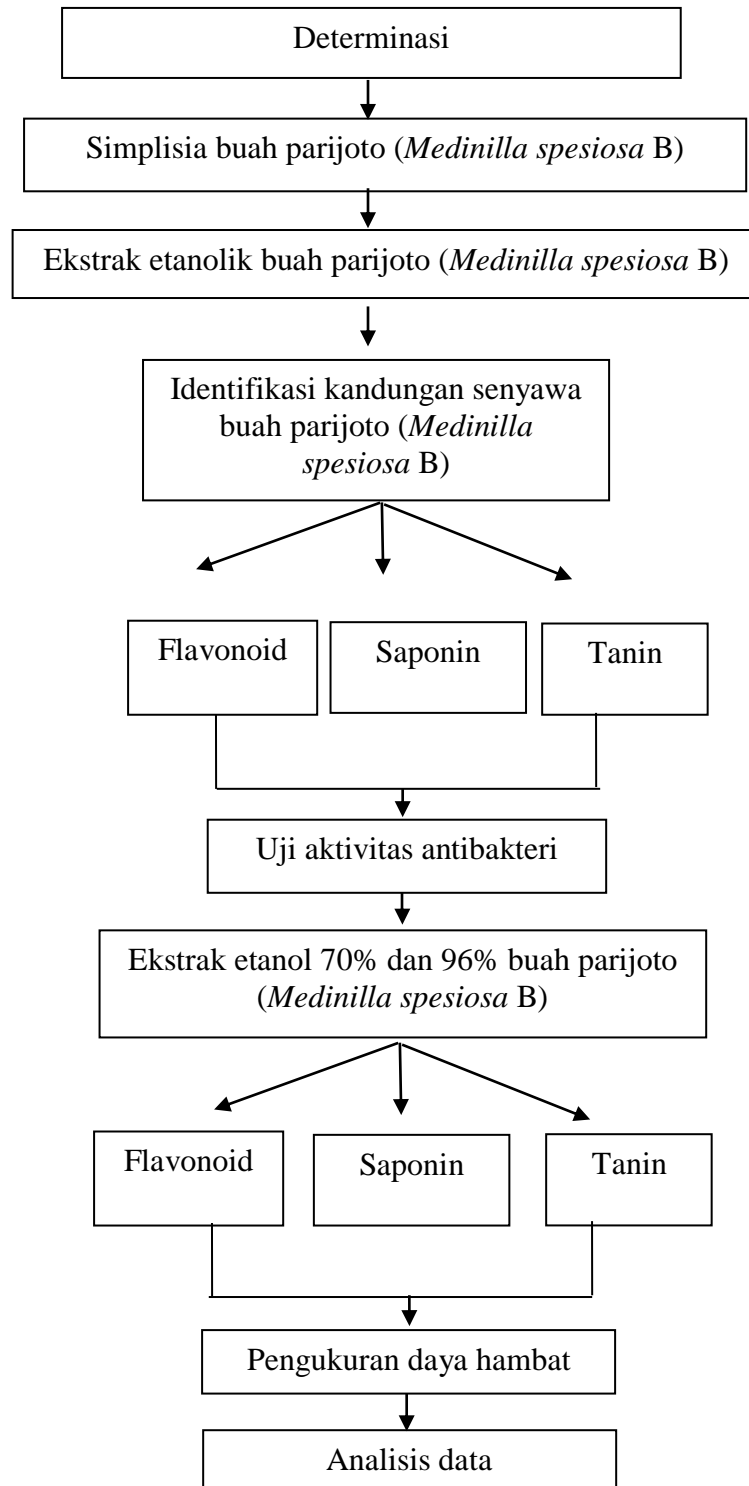
Uji daya hambat antibakteri ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) dengan konsentrasi 5%, 7,5%, dan 10% dalam penelitian ini menggunakan metode difusi cakram. Media yang telah dituangi suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sampai sedikit padat. Kemudian kertas cakram ditetaskan 50 μ L pada masing-masing kelompok perlakuan konsentrasi ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) yang telah dilakukan pengenceran 1 Gram buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) dalam 10 ml aquadest selama 20 menit.

Kelompok Perlakuan :

- a. Kelompok I : Cawan petri berisi media sebagai kontrol media.
- b. Kelompok II : Cawan petri berisi media dan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sebagai kontrol pertumbuhan.
- c. Kelompok III : Cawan petri berisi media dan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terhadap DMSO sebagai pengujian kontrol negatif.
- d. Kelompok IV : Cawan petri berisi media dan *Pseudomonas aeruginosa* + ekstrak etanol 70% buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) dengan konsentrasi 5% b/v.
- e. Kelompok V : Cawan petri berisi media dan *Pseudomonas aeruginosa* + ekstrak etanol 70% buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) dengan konsentrasi 7,5% b/v.
- f. Kelompok VI : Cawan petri berisi media dan *Pseudomonas aeruginosa* + ekstrak etanol 70% buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) dengan konsentrasi 10% b/v.
- g. Kelompok VII : Cawan petri berisi media dan *Pseudomonas aeruginosa* + ekstrak etanol 96% buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) dengan konsentrasi 5% b/v.
- h. Kelompok VIII : Cawan petri berisi media dan *Pseudomonas aeruginosa* + ekstrak etanol 70% buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) dengan konsentrasi 7,5% b/v.

- i. Kelompok VI : Cawan petri berisi media dan *Pseudomonas aeruginosa* + ekstrak etanol 96% buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) dengan konsentrasi 10% b/v.
- j. Setelah itu medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan posisi terbalik. Pada tiap perlakuan dilakukan perulangan sebanyak 3 kali. Hasilnya diperoleh dengan mengukur diameter zona hambat/zona bening disekeliling kertas cakram yang menunjukkan daerah hambatan pertumbuhan bakteri. Kemudian untuk tiap konsentrasi dihitung setiap rata-rata dari hasil yang diperoleh.

G. Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur penelitian

H. Analisa Data

Dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak buah pariijoto (*Medinilla spesiosa* B) data yang diperoleh dengan menggunakan metode difusi cakram yaitu besarnya diameter zona hambat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Analisis data diameter zona hambat dilakukan dengan perangkat lunak SPSS 25.0. Untuk mengetahui normalitas data menggunakan uji Shapiro-wilk karena jumlah sampel kecil (<50). Data dikatakan terdistribusi normal jika $p > 0,05$ dan data dikatakan tidak terdistribusi normal jika $p < 0,05$. Kemudian dilanjutkan dengan uji Levene'stest yaitu untuk mengetahui homogenitas data. Data dikatakan homogen jika $p > 0,05$ dan data dikatakan tidak homogen jika $p < 0,05$. Data yang terdistribusi normal dan varietasnya homogen dianalisis menggunakan uji statistik One Way Anova (*Analysis Of Varians*) dengan taraf kepercayaan 95%. Data yang tidak memenuhi syarat tersebut maka dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis. Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji Tukey HSD lalu dilanjutkan uji T-Test untuk mengidentifikasi perbedaan antar kedua pelarut yang digunakan.