

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni. Untuk uji aktivitas Ekstrak Kasar dan Ekstrak Terpurifikasi Biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi cakram dengan media dasar NA yang dimana hasilnya dilihat dari diameter zona hambat pada kertas cakram dengan perbandingan konsentrasi yaitu 2,5% b/v, 5% b/v, dan 10% b/v.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian
 - a. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
 - b. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk panjang, corong kaca, blender (Maspion), timbangan analitik (OHAUS), gelas ukur, beker glass, cawan penguap, kain flanel, oven (Memmert),

Ayakan No. 60 mesh, *Rotary evaporator* (RE100-Pro), pipet ukur (Iwaki), Batang pengaduk, Kertas Saring, Kertas Cakram.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji buah labu kuning, Aluminium foil, Etanol 96%, Aquades, N-heksan, nutrient agar.

D. Definisi Operasional

1. Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, dan protein. Senyawa aktif dalam berbagai simplisia di golongan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid dan flavonoid. Dengan diketahuinya senyawa aktif dalam simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Supriyatna, 2014).
2. Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan melakukan ekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian pelarut diuapkan dan serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang ditetapkan (Supriyatna, 2014).
3. Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Proses maserasi adalah proses menggabungkan bahan yang telah dihaluskan dengan bahan ekstrak. Metode ekstraksi maserasi memiliki kelebihan karena

pengerjaannya dan alat yang digunakan lebih sederhana. Proses pengekstrakan simplisia dilakukan dengan menggunakan suatu pelarut tertentu, dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruang (kamar) yaitu suhu 40°C-50°C (Aimanjuntak, 2008).

4. Remaserasi berarti dilakukan dengan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya. Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan (Depkes RI, 2000).
5. Partisi cair-cair adalah proses pemisahan zat terlarut di dalam 2 macam zat pelarut yang tidak saling bercampur atau dengan kata lain perbandingan konsentrasi zat terlarut dalam pelarut organik dan pelarut air. Partisi cair cair juga disebut sebagai metode corong pisah. Jika suatu cairan ditambahkan ke dalam ekstrak yang telah dilarutkan dalam cairan lain yang tidak dapat bercampur dengan yang pertama, akan terbentuk dua lapisan. Satu komponen dari campuran akan memiliki kelarutan dalam kedua lapisan tersebut (biasanya disebut fase) dan setelah beberapa waktu dicapai kesetimbangan konsentrasi dalam kedua lapisan. Waktu yang diperlukan untuk tercapainya kesetimbangan biasanya dipersingkat oleh pencampuran keduanya dalam corong pisah (Ditjen POM, 1986).
6. Proses purifikasi adalah metode untuk mendapatkan komponen bahan alam murni bebas dari komponen kimia lain yang tidak dibutuhkan. Untuk tingkatan kemurnian (*purity*) suatu struktur senyawa tertentu, kemurnian bahan harus 95-100%. Sedangkan ekstrak terpurifikasi harus dijelaskan

bahwa ekstrak terpurifikasi dari komponen apa sehingga tidak menimbulkan multipersepsi. Komponen kimia dalam ekstrak yang tidak dibutuhkan seperti lipid, pigmen (klorofil), tanin, plastisiser, dan pelumas yang dapat berasal dari alat.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau sebab perubahan timbulnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi 2,5% b/v , 5% b/v, dan 10% b/v , ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi biji labu kuning terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi akibat dari adanya variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah uji aktivitas antibakteri dengan adanya zona hambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ditandai dengan adanya daerah bening di sekeliling cakram yang pengukurannya dengan mengukur diameter hambatan.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali adalah variabel lain yang ikut berpengaruh yang dibuat sama pada setiap media percobaan dan terkendali. Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu tanaman yang didapatkan dari daerah yang sama, waktu, dan suhu.

F. Prosedur Penelitian

1) Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistemik fakultas Sains dan Matematika Program Studi Biologi Universitas Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran dari biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) yang akan digunakan dalam penelitian.

2) Pembuatan ekstraksi

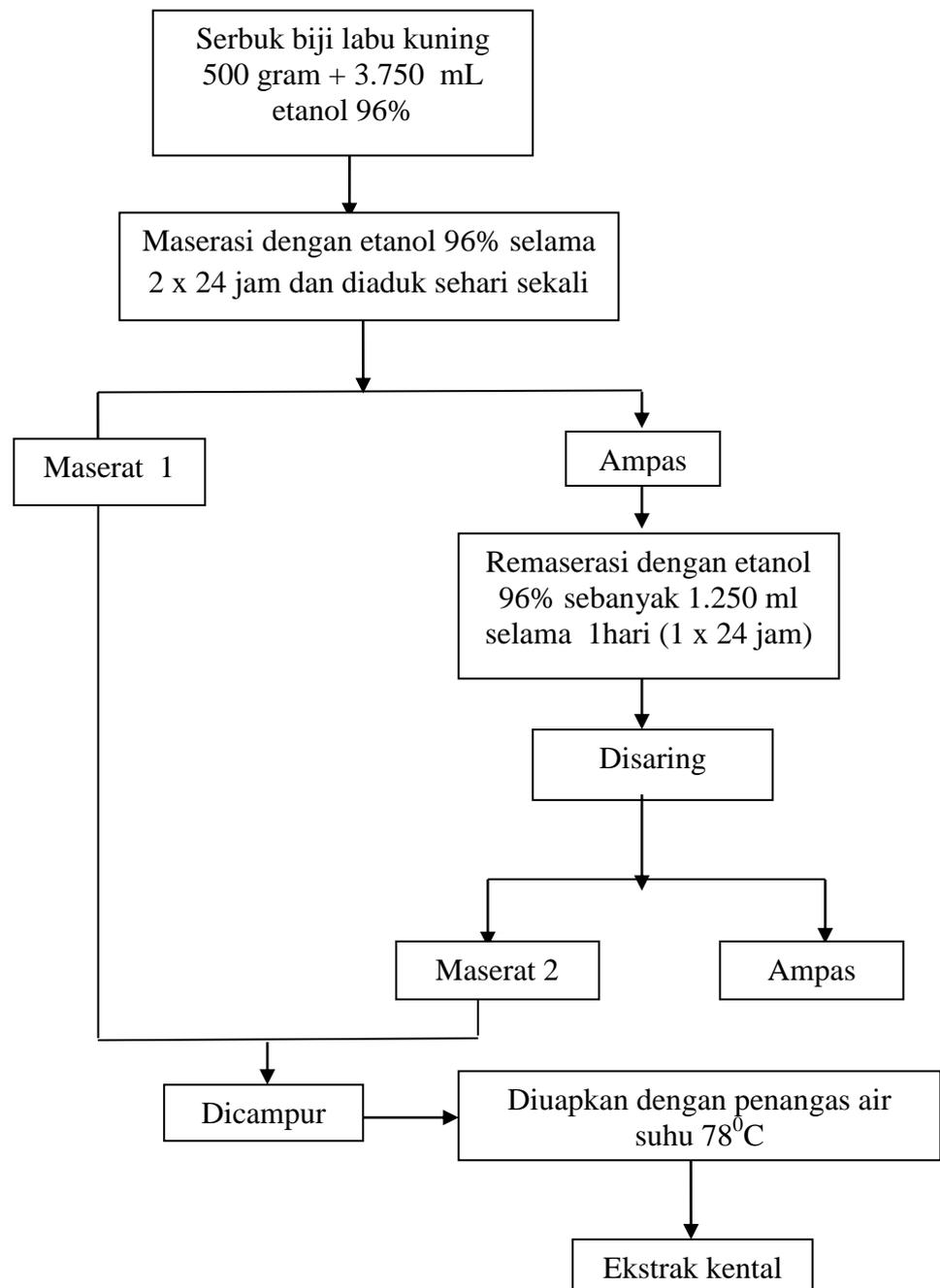
a. Pembuatan ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*)

Pertama biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) yang digunakan berbentuk pipih, keras, dan berwarna putih susu dan berumur buahnya \pm 60 hari. Bahan diambil dari satu tempat dengan tujuan agar tidak terjadi perbedaan suhu, kelembapan dan tempat tumbuh karena perbedaan iklim, keadaan tanah, dan ketinggian tempat dapat mempengaruhi kandungan bahan. Pembuatan serbuk biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dengan cara biji yang segar dikumpulkan dan dilakukan sortasi basah dengan cara memisahkan bagian lain dari tanaman yang tidak digunakan dan biji yang rusak. Biji labu kuning kemudian dicuci dengan air mengalir lalu diangin-anginkan hingga tidak terdapat sisa air. Biji labu kuning kemudian dikeringkan dan kemudian dihaluskan dengan blender, setelah di blender didapatkan serbuk halus kemudian diayak menggunakan pengayak nomor 60 mesh kemudian dilakukan ekstraksi.

Pembuatan ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) sebanyak 500 gram serbuk biji labu kuning dimaserasi dengan 3.750 ml pelarut etanol 96% selama 2 kali 24 jam, lalu dilakukan pengadukan secara kontinu sepanjang waktu maserasi berlangsung yang mungkin interaksi pelarut dan zat pelarut berjalan lebih optimal dalam waktu relatif singkat. Kemudian disaring menggunakan kain flanel dan ampasnya diremaserasi sebanyak satu kali dengan 1.250 ml pelarut etanol 96% selama 24 jam. Maserat dijadikan satu kemudian diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 70-80°C hingga diperoleh ekstrak kental dan hitung rendemennya. Proses *evaporasi* ini dilakukan untuk memisahkan pelarut dari ekstrak berdasarkan perbedaan titik didih. Maserasi adalah teknik yang digunakan untuk menarik atau mengambil senyawa yang diinginkan dari suatu larutan atau padatan dengan teknik perendaman terhadap bahan yang akan diekstraksi. Remaserasi adalah penyarian yang dilakukan setelah penyarian yang dilakukan setelah penyarian pertama selesai, ampas diperas dan ditambahkan dari cairan penyari.

b. Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental (g)}}{\text{Bobot bahan sampel (g)}} \times 100\%$$



Gambar 3.1 Proses Ekstraksi Biji Labu Kuning

c. Partisi cair-cair

Setelah dilakukan ekstraksi dari biji labu kuning menghasilkan ekstrak kental, selanjutnya ekstrak kasar tersebut diberi perlakuan partisi dengan menggunakan n-heksan. Partisi cair-cair adalah proses

pemisahan zat terlarut di dalam 2 macam zat pelarut yang tidak saling bercampur atau dengan kata lain perbandingan konsentrasi zat terlarut dalam pelarut organik dan pelarut air. Prinsip pemisahan partisi adalah *like dissolve like* yang berarti senyawa organik polar sebagian besar akan berada pada fase air. Sedangkan senyawa organik non polar sebagian besar akan terdapat pada fase organik. Tujuan dilakukan fraksinasi yaitu untuk memisahkan senyawa sesuai kepolaran pelarut.

Partisi dengan menggunakan n-heksan dilakukan dengan merendam 15 gram ekstrak etanol biji labu kuning dengan etanol 96% sebanyak 150 ml. Setiap 50 ml larutan tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan n-heksan 50 ml. Corong dikocok secara terus-menerus, kemudian didiamkan. Setelah terpisah menjadi 2 bagian, maka lapisan etanol dan n-heksan dipisahkan. Pelarutan dengan n-heksan diulangi hingga diperoleh cairan tak berwarna atau terlihat jernih. Setelah cairan n-heksan cukup jernih kemudian dipisahkan dan dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental fraksi etanol (Suryani *et al.*, 2017) sedangkan n-heksan dikumpulkan dan dipekatkan dengan rotary evaporator dan waterbath.

d. Perhitungan Rendemen Ekstrak Terpurifikasi

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot fraksi etanol}}{\text{Bobot ekstrak}} \times 100\%$$

3) Penapisan Fitokimia

a. Identifikasi flavonoid

Masukkan sampel kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan 10 ml etanol dan dipanaskan selama 5 menit. Ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan ditambah 0,2 gram serbuk Mg. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah tua (magenta) dalam waktu 3 menit (Harnorne, 1987).

b. Identifikasi Alkaloid

Masukkan sampel kedalam tabung reaksi lalu ditambah 0,5 ml HCl 1%, kemudian ditambahkan 1-2 tetes dragendorf. Hasil positif ditunjukkan apabila hasil pengujian menghasilkan warna jingga (Harborne, 1987).

c. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan menambah 2 tetes H₂SO₄ pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat, adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan terjadinya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan (Robinson, 1995).

4) Uji Antibakteri

1. Sterilisasi Bahan, Media dan Alat

Sebelum peneelitan perlu dilakukan sterilisasi alat dan bahan. Sterilisasi dilakukan dengan metode panas basah dan panas kering. Bahan-bahan yang digunakan seperti media NA adn aquadest disterilkan dengan pemanasan basah menggunakan autoclave pada suhu

121°C selama 15 menit. Alat-alat seperti tabung reaksi, cawan petri, batang pengaduk, gelas ukur, dan erlenmeyer dicuci bersih kemudian dikeringkan hingga tidak terdapat titik air agar tidak timbul noda yang sulit hilang setelah disterilkan. Setelah alat-alat tersebut kering kemudian dibungkus dengan kertas dan disterilkan dengan pemanasan kering menggunakan oven, pada suhu 181-200°C selama 30 menit.

2. Pembuatan Media

Pembuatan media dilakukan dengan cara menyiapkan bahan-bahan untuk medium yaitu dengan menimbang media Nutrien Agar (NA) sebanyak 20 gram kemudian dilarutkan dengan aquades sebanyak 500 ml, kemudian dipanaskan diatas *hot plate* sambil terus diaduk hingga NA melarut dan berwarna jernih. Medium dimasukkan kedalam erlenmeyer kemudian disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan atm selama 15 menit.

3. Pembiakan Bakteri

Pembiakan bakteri dilakukan dengan cara bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* digoreskan pada media padat NA menggunakan ose steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah bakteri tumbuh disimpan pada almari es (4°C) sebagai stok bakteri.

4. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* diambil beberapa koloni dari biakan induk menggunakan ose steril,

disuspensikan dengan NaCL 0,9% sebanyak 10 ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam.

5. Pembuatan larutan pembanding

Sebagai pembanding digunakan ciprofloxacin sebagai kontrol positif, sedangkan kontrol negatifnya menggunakan Aquadest.

Pembuatan stok awal ciprofloxacin 1 mg yang setara dengan konsentrasi 1000 µg/ml. Kemudian dibuat pengenceran untuk masing-masing bakteri sehingga didapatkan kadar *Escherichia coli* 2µg/ml *Staphylococcus aureus* 4 µg/ml (Purnamasari, 2018)

6. Perhitungan stok awal ciprofloxacin

Stok konsentrasi ciprofloxacin 200 mg/100 ml setara dengan (2000 µg/ml)

$$\begin{aligned}
 2000 \text{ ppm} &= 2000 \text{ µg/ml} \\
 &= 2000 \text{ µg/ml} \\
 &= \frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} \\
 &= 200 \text{ mg} \\
 &= \frac{\text{Berat 1 tablet}}{\text{Kandungan cipro}} \times 200 \text{ mg} \\
 &= \frac{700 \text{ mg}}{500 \text{ mg}} \times 200 \text{ mg} \\
 &= 280 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

Stok Ciprofloxacin 2µg/ml untuk *Escherichia coli*:

$$\begin{aligned}
 V1 \times C1 &= V2 \times C2 \\
 V1 \times 2000\text{µg/ml} &= 100 \text{ ml} \times 2 \text{ µg/ml} \\
 V1 \times 2000 &= 200 \text{ ml} \\
 V1 &= \frac{200 \text{ ml}}{2000}
 \end{aligned}$$

$$V1 = 0,1 \text{ ml}$$

Larutan stock ciprofloxacin diambil sebanyak 0,1 ml kemudian ditambah aquadest steril add 10 ml.

- a. Stok Ciprofloxacin 4 μ g/ml untuk *Staphylococcus aureus*:

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$V1 \times 2000\mu\text{g/ml} = 100 \text{ ml} \times 4 \mu\text{g/ml}$$

$$V1 \times 2000 = 400 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{400 \text{ ml}}{2000}$$

$$V1 = 0,2 \text{ ml}$$

Larutan stock ciprofloxacin diambil sebanyak 0,2 ml kemudian ditambah aquadest steril add 10 ml.

7. Pembuatan Seri Kosentrasi

Kosentrasi ekstrak etanol 96% biji labu kuning untuk bakteri *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus* adalah:

- a) Kosentrasi 2,5% (b/v)

0,25 gram ekstrak biji labu kuning + aqua p.i add 10 ml

- b) Kosentrasi 5% (b/v)

0,5 gram ekstrak biji labu kuning + aqua p.i add 10 ml

- c) Kosentrasi 10% (b/v)

1 gram ekstrak biji labu kuning + aqua p.i add 10 ml

8. Uji Antibakteri Dengan Difusi Cakram

Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dilakukan dengan cara Kirby bauer, dengan cara suspensi bakteri diuji sensitivitas dengan meratakan suspensi bakteri tersebut pada permukaan media agar.

Kertas cakram yang telah diberi ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dengan seri konsentrasi 2,5% b/v, 5% b/v dan 10% b/v diletakkan di atas media tersebut dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu diamati dan diukur zona hambat yang terbentuk.

9. Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri

Kontrol yang digunakan pada aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yaitu:

a) Perlakuan *Escherichia coli*

- 1) Kontrol positif = 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + Ciprofloxacin 0,1 ml
- 2) Kontrol negatif = 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + Aquadest
- 3) Kontrol pertumbuhan = 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri
- 4) Perlakuan 1 :
 - 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak kasar 2,5 % b/v
 - 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak terpurifikasi 2,5 % b/v

5) Perlakuan 2

- 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak kasar
5 % b/v
- 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak
terpurifikasi 5 % b/v

6) Perlakuan 3

- 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak kasar
10 % b/v
- 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak
terpurifikasi 10 % b/v

b) Perlakuan *Staphylococcus aureus*

- 1) Kontrol positif = 5 ml media NA + 50 µl suspensi
bakteri + Ciprofloxacin 0,2 ml
- 2) Kontrol negatif = 5 ml media NA + 50 µl suspensi
bakteri + Aquadest
- 3) Kontrol pertumbuhan = 5 ml media NA + 50 µl
suspensi bakteri
- 4) Perlakuan 1 :
 - 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak
kasar 2,5 % b/v
 - 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak
terpurifikasi 2,5 % b/v

5) Perlakuan 2

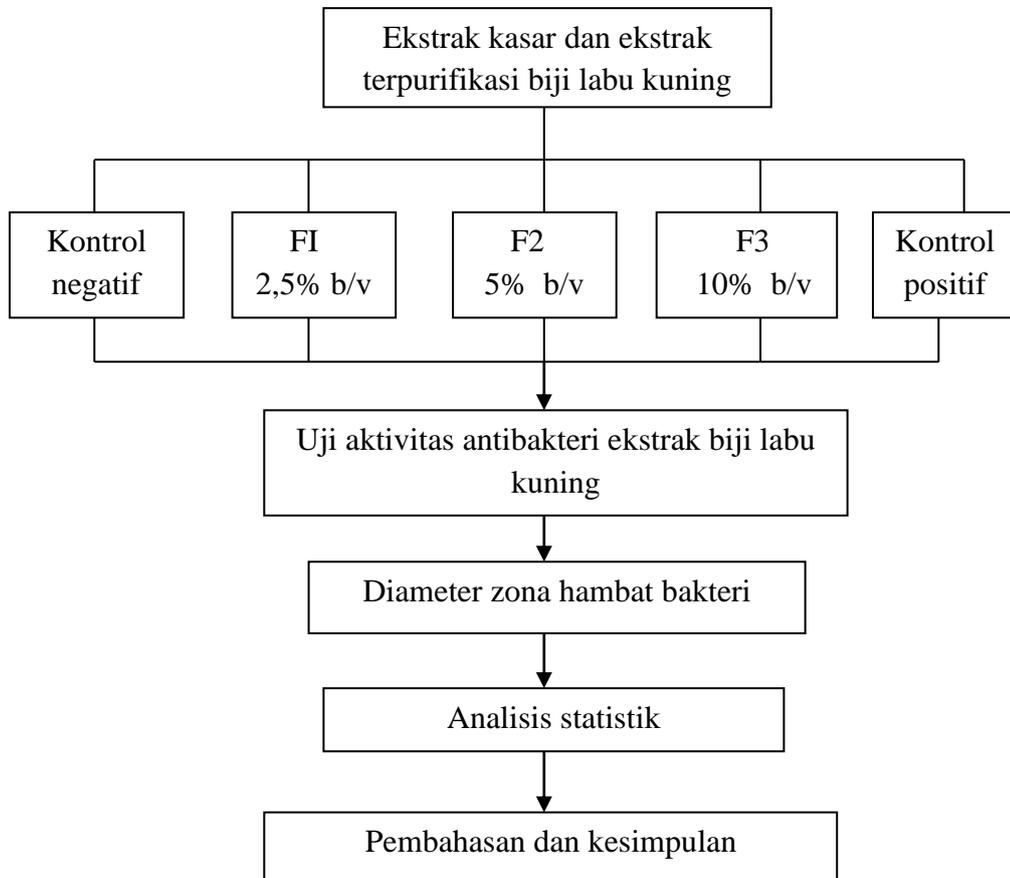
- 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak kasar 5 % b/v
- 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak terpurifikasi 5 % b/v

6) Perlakuan 3

- 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak kasar 10 % b/v
- 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri + ekstrak terpurifikasi 10 % b/v

Setelah itu medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan posisi terbalik. Pada tiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Hasilnya diperoleh dengan mengukur diameter zona bening disekeliling kertas cakram yang menunjukkan daerah hambatan pertumbuhan bakteri. Kemudian untuk tiap konsentrasi dihitung setiap rata-rata hasil yang diperoleh.

G. Alur penelitian



Gambar 3.3 Alur Penelitian

H. Analisis Data

Data diperoleh dari pengamatan diameter zona hambat ekstrak etanol biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan perhitungan diameter zona bening yang dibagi dua dan dicari diameter terpanjang dan dikurangi dengan diameter dari kertas cakram tersebut. Data diamati pada masing-masing konsentrasi dan didapatkan diameter zona hambat kemudian dianalisa menggunakan SPSS 25,0 for windows dengan taraf kepercayaan 95%. Data diuji normalitas menggunakan Shapiro Wilk dan uji Levene test untuk mengetahui homogenitas data. Hasil analisa data memiliki nilai signifikan $p > 0,05$ pada uji Shapiro Wilk dan Levene test artinya data terdistribusi normal dan memiliki nilai signifikan $p < 0,05$ artinya terdapat perbedaan sehingga dilanjutkan dengan uji statistik parametrik ANOVA satu jalan dan uji *Least Significant Differences LSD* (Dahlan, 2011).