

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental, yaitu menentukan aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% buah strawberry terhadap bakteri *propionibacterium acnes*.

B. Lokasi Dan Waktu Penelitian

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.
2. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo Ungaran, Semarang.
3. Uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran, Semarang.

4. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober-November 2019.

C. Subjek Penelitian

Pada penelitian ini digunakan populasi dan sampel tanaman strawberry (*Fragaria x ananassa*) yang dipetik langsung dari Kalisoro, Tawangmangu Kabupaten Karanganyar. Bagian yang digunakan adalah buah strawberry yang sudah berwarna merah dengan umur panen kurang lebih 2 bulan.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah perbandingan ekstraksi buah strawberry dengan menggunakan etanol 70% dan etanol 96% dengan konsentrasi sampel 1% b/v, 2% b/v dan 3% b/v.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% buah strawberry dan zona hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

3. Variabel Terkendali

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

E. Pengumpulan Data

1. Alat Dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan antara lain blender(Maspion), timbangan analitik (Nagata), seperangkat alat maserasi (Toples kaca), autoclave, micropipet, oven, inkubator, *rotary evaporator*, cawan petri, enkas, jarum ose, kain flanel, tabung reaksi (Pyrex), *erlenmayer* (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), beaker glass (Pyrex), batang pengaduk, kertas cakram (Blank), lampu spiritus, aluminium foil, kertas coklat, cawan penguap, objek glass, mikroskope.

b. Bahan

Bahan utama yang digunakan yaitu buah strawberry yang diperoleh dari daerah Kalisoro, Tawangmangu Kabupaten Karanganyar. Buah dipetik dalam keadaan segar, buah yang dipetik adalah buah yang berumur sekitar 2 bulan dari masa berbunga yang sudah berwarna merah.

Bahan kimia yang digunakan antara lain etanol 70%, etanol 96%, Aquades, media *Nutrient Agar*, suspensi bakteri, antibiotik Clindamycin, serbuk Mg, asam klorida, pereaksi mayer, pereaksi wagner, pereaksi dragendorff, FeCl₃ 1% (Pudak), NaCl 0.9%.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

3. Pembuatan Simplisia

Buah strawberry diperoleh dari daerah Kalisoro, Tawangmangu Kabupaten Karanganyar. Sebanyak 7 Kilo gram buah strawberry yang dipetik dalam kondisi segar berwarna merah, setelah di petik buah di cuci dengan air mengalir untuk menghilangkan debu dan pengotor lainnya, buah strawberry ditiriskan dan dipotong-potong dengan ketebalan seragam, lalu dikeringkan dibawah sinar matahari. Setelah buah strawberry kering kemudian diserbukan dan dikemas dalam plastik.

4. Pembuatan Ekstrak Buah Strawberry

Serbuk simplisia buah strawberry diekstraksi dengan cara di maserasi, yaitu dengan cara ditimbang 300 gram serbuk simplisia dimasukkan kedalam masing-masing bejana tertutup (toples kaca), maserasi dilakukan dengan menggunakan dua pelarut yaitu pelarut etanol 70% dan etanol 96% kemudian ditambahkan pelarut etanol untuk masing-masing bejana sampai serbuk terendam. Maserasi dilakukan selama 2 hari pada ruangan yang terlindungi dari cahaya matahari dan sering dilakukan pengadukan. Lakukan remaserasi pada ampas yang sudah dimaserasi menggunakan etanol 70% dan etanol 96%. Hasil maserasi disaring menggunakan kain flanel sehingga diperoleh filtrat berupa ekstrak etanol buah strawberry. Kemudian maserat dipisahkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental buah strawberry.

Banyaknya rendemen ekstrak yang didapatkan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Bobot sampel yang diekstrak}} \times 100\%$$

5. Skrining Fitokimia

a. Uji Kualitatif Dengan Uji Warna

1) Uji Flavonoid

Ditimbang 0,1 g ekstrak ditambahkan 0,2 g serbuk Mg, lalu ditambahkan 5 mL asam klorida pekat. Apabila terbentuk warna

jingga, merah atau kuning menunjukkan adanya flavonoid (Harbone, 1987).

2) Uji Saponin

Saponin dapat dideteksi dengan uji busa dalam air panas. Busa yang stabil akan terus terlihat selama 5 menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2 N menunjukkan adanya saponin (Harbone, 1987).

3) Uji Tanin

Ditimbang 0,1 g sampel ditambahkan 10 mL aquades, disaring dan filtratnya ditambahkan reagen FeCl_3 1% sebanyak 5 mL. Warna biru tua atau hitam menunjukkan adanya tanin (Harbone, 1987).

6. Uji bebas Etanol 70% dan Etanol 96% Ekstrak Buah Strawberry

Ekstrak buah strawberry di uji bebas etanol 70% dan etanol 96% dengan menggunakan uji kualitatif yaitu ekstrak ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat, adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan terjadinya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan (Harbone, 2006).

7. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Uji

Pada penelitian ini menggunakan konsentrasi ekstrak etanol 70% dan etanol 96% masing-masing 1% b/v, 2% b/v dan 3% b/v . Pembuatan konsentrasi dengan cara mengencerkan ekstrak etanol 70% dan etanol 96% buah strawberry menggunakan pelarut aquadest.

Konsentrasi tersebut dibuat dengan cara :

- a. Konsentrasi 1% b/v dibuat dengan cara menimbang 0,1 gram ekstrak dan dilarutkan dengan aquadest sampai 10 ml.
- b. Konsentrasi 2% b/v dibuat dengan cara menimbang 0,2 gram ekstrak dan dilarutkan dengan aquadest sampai 10 ml.
- c. Konsentrasi 3% b/v dibuat dengan cara menimbang 0,3 gram ekstrak dan dilarutkan dengan aquadest sampai 10 ml.
- d. Kontrol positif 0,1% b/v dibuat dengan cara menimbang 0,01 gram Clindamycin dan dilarutkan dengan aquadest sampai 10 ml.
- e. Kontrol negatif menggunakan aquadest.

F. Pengolahan Data

1. Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*

a. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan 2 cara yaitu sterilisasi panas kering untuk alat-alat berupa kaca dan sterilisasi panas basah untuk alat-alat berupa plastik dan media. Sterilisasi panas kering dengan oven pada suhu 100°C selama 30 menit untuk alat-alat gelas, sedangkan sterilisasi panas basah dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk alat-alat plastik dan media. Alat-alat lain seperti jarum ose disterilisasi dengan cara dipijarkan di atas api lampu spiritus sebelum digunakan (Pratiwi,2008).

b. Pembuatan Media Agar

Nutrient agar ditimbang sebanyak 10 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmayer, ditambahkan dengan 500 ml aquadest, kemudian

dipanaskan di atas hot plate hingga mendidih sambil diaduk sampai homogen (Suriawiria, 2005).

c. Pewarnaan Gram

Kaca objek dibersihkan dengan alkohol dan lewatkan beberapa kali pada nyala api bunsen, kemudian diambil bakteri dengan jarum ose secara aseptik dan oleskan pada kaca lalu ditetesi dengan ungu violet dan di biarkan selama 1 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Bakteri tersebut ditetesi lagi dengan larutan iodine dan di biarkan selama 1 menit, di cuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Selanjutnya ditetesi alkohol 95⁰/₀ selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir dianginkan dan dikeringkan dengan kertas penghisap, setelah itu dilakukan pengamatan dibawah mikroskop. Bakteri Gram positif akan terlihat dengan warna ungu sedangkan bakteri Gram negatif akan terlihat dengan warna merah (Jawetz,2008).

d. Pembuatan suspensi bakteri

Pembiakan bakteri diambil sebanyak 1-2 ose dan disuspensikan kedalam 5 mL NaCl 0,9% sampai diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5 McFarland atau sebanding dengan jumlah bakteri 10⁸(CFU)/ml (Wardhani, 2012).

e. Uji Daya Antibakteri Terhadap *Propionibacterium acnes*

Uji Aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram yaitu dengan menanamkan kertas cakram yang sudah diberi larutan uji ekstrak etanol 70% dan etanol 96% buah strawberry, dengan konsentrasi 1% b/v, 2% b/v dan 3% b/v dalam media agar yang

telah diberi bakteri *Propionibacterium acnes* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Uji daya hambat bakteri, dengan cara diambil suspensi bakteri uji sebanyak 100 µl dituangkan secara merata pada medium *Nutrient Agar* menggunakan metode *pour plate*. Ditunggu beberapa saat setelah semi memadat, lalu diletakan kertas cakram yang telah dijenuhkan dengan ekstrak etanol 70% dan etanol 96% buah strawberry, dengan konsentrasi 1% b/v, 2% b/v dan 3% b/v, dibuat pengulangan 3 kali. Sebagai kontrol positif digunakan media yang sudah berisi bakteri *Propionibacterium acnes* dan cakram yang sudah dijenuhkan dengan clindamycin 0,1%. Kontrol negatif berisi media, bakteri *Propionibacterium acnes* dan cakram yang sudah dijenuhkan dengan aquadest steril. Kelompok perlakuan yaitu cawan petri yang berisi media, bakteri *Propionibacterium acnes* dan ekstrak buah strawberry, kontrol pertumbuhan yaitu cawan petri yang berisi media dan bakteri, dan kontrol media yaitu cawan petri berisi media natrium agar. Media yang sudah berisi bakteri uji sebagai kontrol pertumbuhan, kontrol positif, kontrol negatif, dan kontrol media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam .

f. Pengukuran Zona Hambat

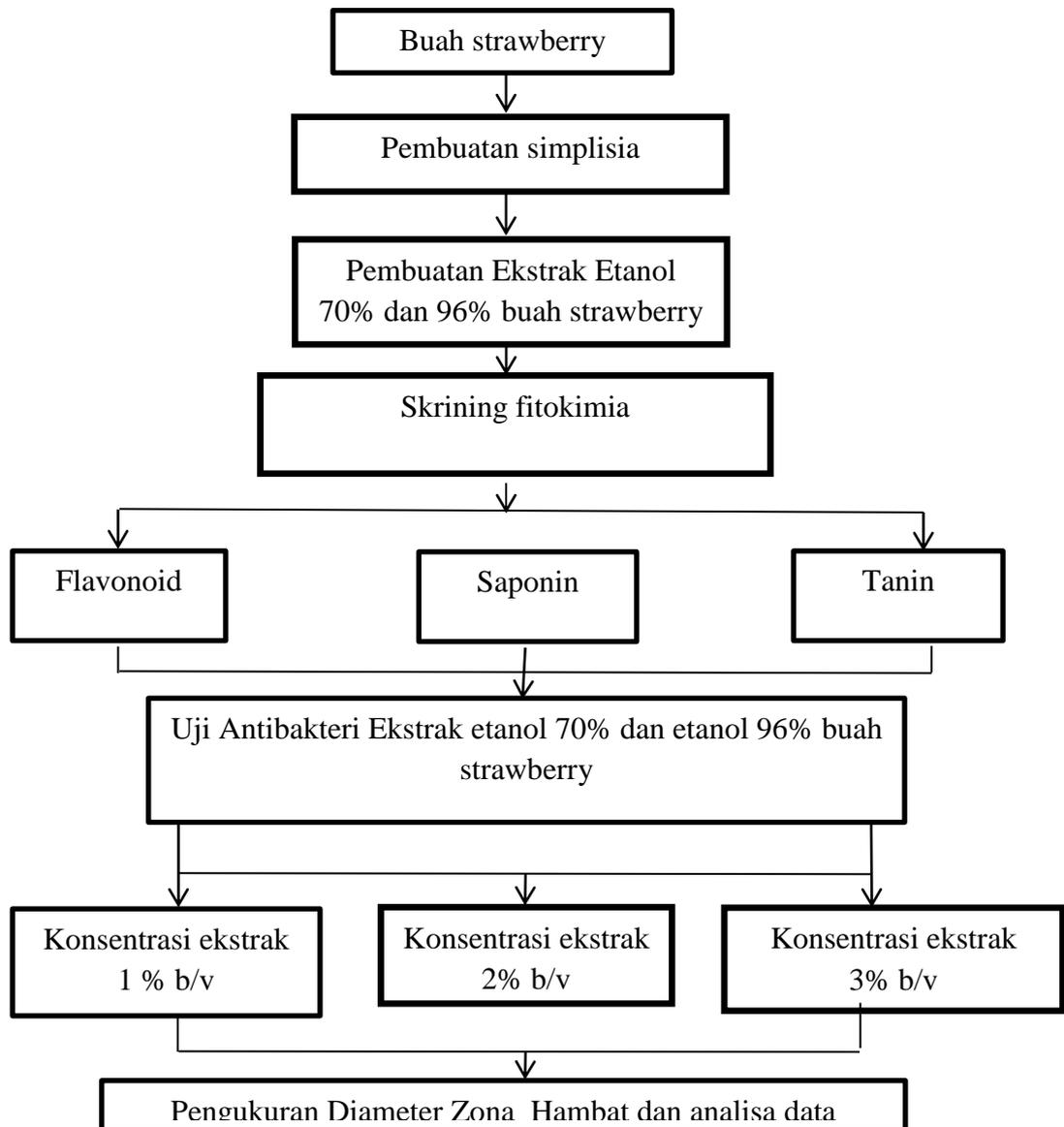
Zona hambat yang terbentuk setelah diinkubasi selama 24 jam diukur menggunakan jangka sorong dan diinterpretasikan kekuatan zona hambatnya. Adanya aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram yang mengandung larutan uji dan kontrol positif Clindamycin 0,1%.

Klasifikasi respon zona hambat (Davis dan Stout, 1971):

Tabel 3.1 Klasifikasi respon zona hambat

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan
> 20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
< 5 mm	Lemah

2. Skema Prosedur Penelitian



Gambar 3.1 Prosedur Penelitian

G. Analisa data

Analisa data pada penelitian ini dengan cara mengamati zona hambat ekstrak etanol 70% dan etanol 96% buah strawberry pada masing-masing konsentrasi dan kelompok kontrol terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*. Adanya zona hambat ditandai dengan adanya zona bening pada media disekitar kertas cakram. Diameter zona hambat yang terbentuk dianalisa dengan SPSS 25.0 *for windows*. Uji Normalitas data dilakukan dengan analisis statistik *Saphiro-Wilk* kemudian dilanjutkan menggunakan *Uji Levene test* untuk melihat homogenitas data. Hasil analisa data memiliki nilai signifikansi $p > 0,05$ pada uji *Saphiro-Wilk* dan *Uji Levene test* artinya data terdistribusi normal dan memiliki nilai signifikansi $p < 0,05$ artinya terdapat perbedaan. Data yang terdistribusi normal dan variansnya homogen dianalisis menggunakan uji statistik One Way Anova (Analysis Of Varians) dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil diperoleh bahwa data terdistribusi normal akan tetapi tidak homogen sehingga tidak memenuhi syarat parametrik. Oleh karena itu, dilakukan uji non parametrik yaitu *Kruskal Wallis*. Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji Tukey HSD lalu dilanjutkan uji T-Test untuk mengidentifikasi perbedaan antar kedua pelarut yg digunakan.