

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni. Untuk uji aktivitas Ekstrak Kasar dan Ekstrak Terpurifikasi Daging Buah Labu Kuning (*Cucurbita maxima D*). 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. Konsentrasi tersebut dilihat dari penelitian sebelumnya yang diteliti oleh (Rofiqoh, 2016) menggunakan labu kuning sebagai antifungi yang dimana dengan konsentrasi sekian dapat menghambat antifungi.

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.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian akan dilakukan pada bulan Oktober - Desember 2019.

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 (Mommert), 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 daging buah labu kuning, Aluminium foil, Etanol 96%, Aquades, N-heksan, nutrient agar.

D. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan subjek penelitian berupa bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri kokus Gram positif yang menghasilkan pigmen kuning bersifat anaerob fakultatif, tidak menghasilkan spora dan tidak motil umumnya tumbuh berpasangan maupun berkelompok dengan diameter 0,8 – 1,0µm. *Staphylococcus aureus* tumbuh dengan optimum pada suhu 37°C. Bakteri ini sering ditemukan sebagai flora normal pada kulit dan selaput lendir manusia, tetapi dapat pula menyebabkan infeksi pada manusia dan binatang, bahkan ada jenis *Staphylococcus aureus* yang menyebabkan keracunan makanan.

2. *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah salah satu jenis spesies bakteri Gram negatif. Pada umumnya bakteri *Escherichia coli* ditemukan dalam usus besar manusia.

Escherichia coli adalah bakteri yang ditemukan di lingkungan, makanan, dan usus manusia dan hewan. *Escherichia coli* adalah kelompok bakteri yang besar dan beragam. Meskipun sebagian besar strain *Escherichia coli* tidak berbahaya, yang lain dapat membuat sakit. Beberapa jenis *Escherichia coli* dapat menyebabkan diare, sementara yang lain menyebabkan infeksi saluran kemih, penyakit pernafasan dan radang paru-paru, dan penyakit lainnya.

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 daging buah 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 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 di buat sama pada setiap media percobaan dan terkendali. Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu tanaman yang didapatkan dari daerah yang sama, waktu, suhu, dan panjang gelombang. Media biakan akteri, suhu inkubasi 37 °C dan waktu inkubasi selama 24 jam.

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 daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima Duch*) yang akan digunakan dalam penelitian.

2. Pembuatan ekstraksi

a. Pembuatan ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima Duch*)

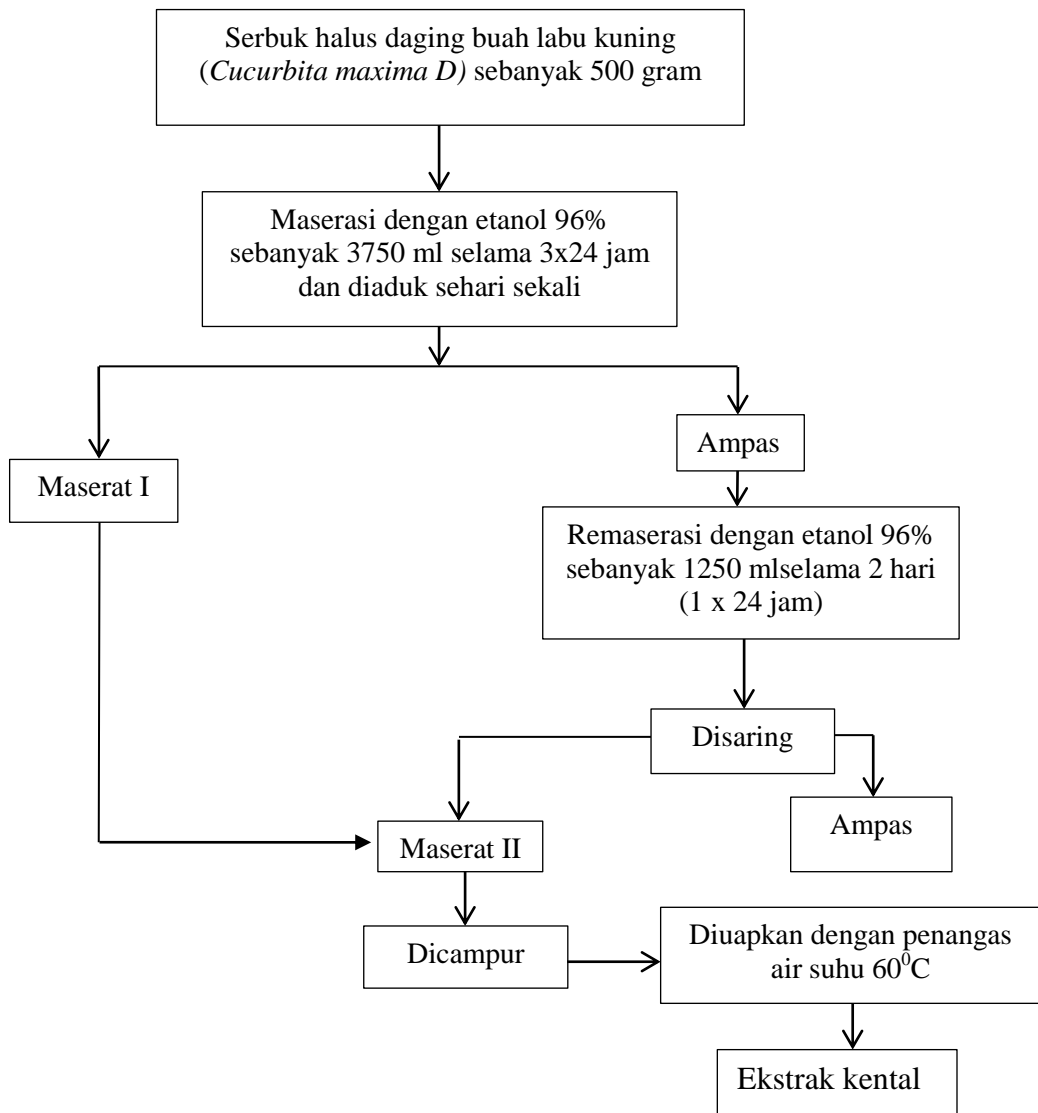
Pertama daging labu kuning (*Cucurbita maxima Duch*) yang digunakan berbentuk agak bulat keras, dan berwarna kuning dan berumur buahnya \pm 60 hari. Bahan diambil dari satu tempat dengan tujuan agar tidak terjadi perbedaan suhu, kelembapan dan tempat tumbuh karena perbedaan iklim, keadaan tanah, dan ketinggian tempat

dapat mempengaruhi kandungan bahan. Pembuatan serbuk daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima Duch*) dengan cara daging buah yang segar dikumpulkan dan dilakukan sortasi basah dengan cara memisahkan bagian lain dari tanaman yang tidak digunakan . Daging buah labu kuning kemudian dicuci dengan air mengalir lalu diangin-anginkan hingga tidak terdapat sisa air. Daging buah labu kuning kemudian dikeringkan dan kemudian dihaluskan dengan blender, setelah diblender didapatkan serbuk halus kemudian diayak menggunakan pengayak nomor 100 mesh kemudian dilakukan ekstraksi.

- b. Pembuatan ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima Duch*) sebanyak 500 gram daging buah 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. Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus :

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



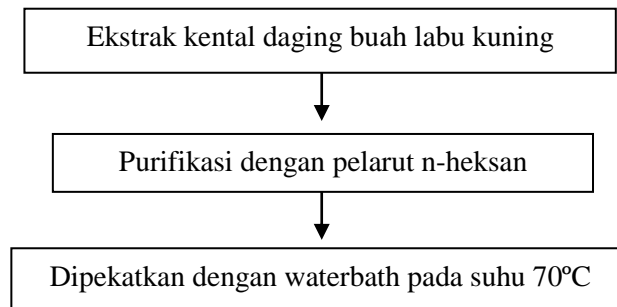
Gambar 3.1 Proses ekstraksi daging buah Labu Kuning

c. Partisi cair-cair

Setelah dilakukan ekstraksi dari daging buah 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 (Sudjadi, 1986).

Partisi dengan menggunakan n-heksan dilakukan dengan merendam 15 gram ekstrak etanol daging buah labu kuning dengan etanol 96% sebanyak 300 ml. Setiap 100 ml larutan ekstrak etanol daging buah labu kuning tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan n-heksan 100 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 etanol (Suryani *et al.*,

2017) sedangkan lapisan n-heksan dikumpulkan dan dipekatkan dengan rotary evaporator dan waterbath.



Gambar 3.2 Skema Pemisahan Ekstrak Dengan Metode Partisi

3. Uji Antibakteri

a. Sterilisasi Bahan, Media dan Alat

Sebelum penelitian perlu dilakukan sterilisasi alat dan bahan. Sterilisasi dilakukan dengan metode panas basah dan panas kering. Bahan-bahan yang digunakan seperti media NA dan 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.

b. Pembuatan larutan pembanding/kontrol positif

Kontrol positif yang digunakan berupa tablet ciprofloxacin 500 mg, dibuat dengan cara ditimbang dan dilarutkan dalam 10 ml aquadest steril di campur perlahan-lahan sampai homogen untuk memperoleh larutan ciprofloxacin 5000 µg/ml (Gabriella, 2017).

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* 2 µg/ml *Staphylococcus aureus* 4 µg/ml (Purnamasari, 2018)

c. Perhitungan stok awal ciprofloxacin dan cara pembuatan larutan kontrol positif ciprofloxacin.

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

$$\begin{aligned} 2000 \text{ ppm} &= 2000 \text{ mg / L} \\ &= 2000 \text{ µg / ml} \\ &= \frac{2000}{1000} \times 100 \text{ ml} \\ &= 200 \text{ mg Ciprofloxacin ad 100 ml.} \end{aligned}$$

Perhitungan Berat tablet Ciprofloxacin 500 mg

Berat 1 tablet X 200 mg

Kandungan ciprofloxacin

$$= \frac{700 \text{ mg}}{500 \text{ mg}} \times 200 \text{ mg}$$

$$= 280 \text{ mg}$$

1) Stok Ciprofloxacin 2 $\mu\text{g/ml}$ untuk *Escherichia coli* :

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 \times 2000 \mu\text{g/ml} = 100 \text{ ml} \times 2 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 \times 2000 = 200 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{200 \text{ ml}}{2000}$$

$$V_1 = 0,1 \text{ ml}$$

Larutan stock ciprofloxacin diambil sebanyak 0,1 ml kemudian ditambah aquadest steril add 100 ml.

2) Stok Ciprofloxacin 4 $\mu\text{g/ml}$ untuk *Staphylococcus aureus* :

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 \times 2000 \mu\text{g/ml} = 100 \text{ ml} \times 4 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 \times 2000 = 400 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{400 \text{ ml}}{2000}$$

$$V_1 = 0,2 \text{ ml}$$

Larutan stock ciprofloxacin diambil sebanyak 0,2 ml kemudian ditambah aquadest steril add 100 ml.

Stok konsentrasi ciprofloxacin 200 mg/100 ml setara dengan (2000 $\mu\text{g/ml}$)

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

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

$$V1 \times 2000 \text{ µg/ml} = 100 \text{ ml} \times 2 \text{ µg/ml}$$

$$V1 \times 2000 = 200 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{200 \text{ ml}}{2000}$$

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

Larutan stock ciprofloxacin diambil sebanyak 0,1 ml kemudian ditambah aquadest steril add 100 ml.

4) Stok Ciprofloxacin 4 µg/ml untuk *Staphylococcus aureus* :

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

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

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

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

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

Larutan stock ciprofloxacin diambil sebanyak 0,2 ml kemudian ditambah aquadest steril add 100 ml.

d. Pembuatan Seri Kosentrasi

Kosentrasi ekstrak etanol 96% daging buah labu kuning untuk bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* adalah:

1) Kosentrasi 2,5% (b/v)

0,25 gram ekstrak daging buah labu kuning + aqua p.i 10 ml

2) Kosentrasi 5% (b/v)

0,5 gram ekstrak daging buah labu kuning + aqua p.i 10 ml

3) Kosentrasi 10% (b/v)

1 gram ekstrak daging buah labu kuning + aqua p.i 10 ml

e. 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 daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima D*) dengan seri kosentrasi 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.

f. Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri

Kontrol yang digunakan pada aktivitas antibakteri ekstrak etanol daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima Duch*) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yaitu:

1) Perlakuan *Escherichia coli*

a) Kontrol positif = 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri +
Ciprofloxacin 0,1 ml

b) Kontrol negatif = 5 ml media NA + 50 µl suspensi bakteri +
Aquadest

c) Kontrol media = 5 ml media NA

d) Perlakuan 1 :

(1) 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri + ekstrak kasar
2,5 % b/v

(2) 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri + ekstrak
terpurifikasi 2,5 % b/v

e) Perlakuan 2

(1) 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri + ekstrak kasar 5
% b/v

(2) 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri + ekstrak
terpurifikasi 5 % b/v

f) Perlakuan 3

(1) 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri + ekstrak kasar 10
% b/v

(2) 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri + ekstrak
terpurifikasi 10 % b/v

2) Perlakuan *Staphylococcus aureus*

a) Kontrol positif = 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri +
Ciprofloxacin 0,2 ml

b) Kontrol negatif = 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri +
Aquadest

c) Kontrol media = 5 ml media NA

d) Perlakuan 1 :

(1) 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri + ekstrak kasar
2,5 % b/v

(2) 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri + ekstrak
terpurifikasi 2,5 % b/v

e) Perlakuan 2

(1) 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri + ekstrak kasar 5
% b/v

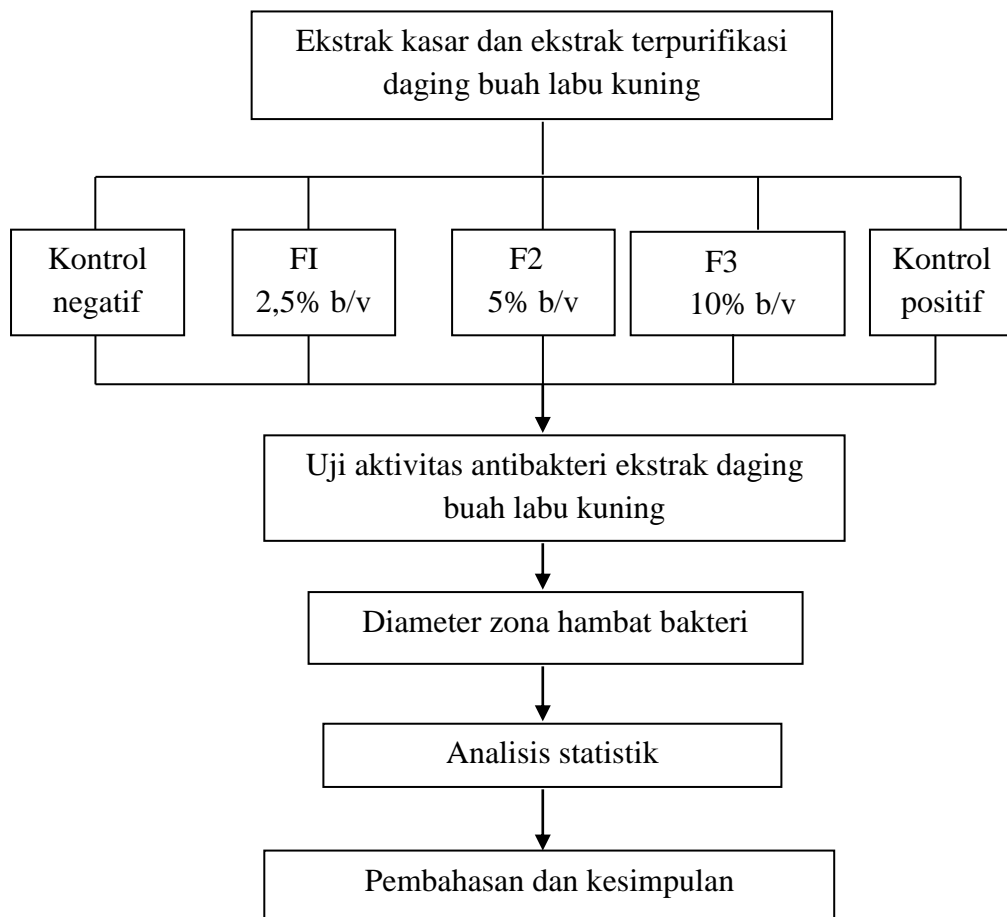
(2) 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri + ekstrak
terpurifikasi 5 % b/v

f) Perlakuan 3

(1) 5 ml media NA + 50 μ l suspensi bakteri + ekstrak kasar 10
% b/v

(2) 5 ml media NA + 50 μ l 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.



Gambar 3.3 Alur Penelitian

G. Analisa Data

Data diperoleh dari pengamatan diameter zona hambat ekstrak etanol daging buah labu kuning (*Cucurbita maxima Duch*) terhadap bakteri *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus*. Data diamati pada masing-masing konsentrasi dan didapatkan zona hambat kemudian dianalisa menggunakan SPSS 25,0 for windows dengan taraf kepercayaan 95%. Data diuji normalitas menggunakan Saphiro wilk dan uji Levene test untuk mengetahui homogenitas data. Hasil analisa data memiliki nilai signifikan $p > 0,05$ pada uji Saphiro 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).