

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Metode penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental, buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) di ekstraksi dengan metode maserasi yaitu menggunakan pelarut etanol. Kemudian hasil dari ekstrak akan di buat menjadi sediaan krim ekstrak etanol buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) dan di uji aktivitasnya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi cakram, dimana dalam teknik ini media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri kemudian dimasukan kertas cakram dalam media dan diisi dengan senyawa uji. Dan untuk mengetahui uji sifat fisik sediaan krim ekstrak etanol buah labu kuning dengan menguji organoleptis dari sediaan krim.

#### **B. Lokasi penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan di laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro untuk determinasi tanaman. Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo untuk proses pembuatan ekstrak buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) serta penapisan fitokimia. Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo, untuk uji aktivitas antibakteri ekstrak buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) terhadap bakteri

*Staphylococcus aureus* dengan metode difusi Kirby-Bauer atau metode cakram.

### **C. Subjek Penelitian**

Subjek dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol buah labu kuning sebagai uji aktivitas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Untuk metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi cakram. Sedangkan sampel yang dipakai adalah daging buah labu kuning yang diperoleh dari Desa Kalikuto Kecamatan Grabag Kabupaten Semarang.

### **D. Variabel penelitian**

1. Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau sebab perubahan timbulnya variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu krim konsentrasi ekstrak etanol buah labu kuning 10%, 15%, 20%, dan 25%
2. Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi, akibat dari adanya variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu uji aktivitas sediaan krim ekstrak etanol buah labu kuning
3. Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang ditetapkan tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu pembuatan sediaan krim ekstrak etanol buah labu kuning.

## **E. Pengumpulan Data**

### 1. Alat penelitian

- a. Untuk Ekstraksi buah labu kuning digunakan peralatan gelas standar, batang pengaduk, kertas saring, corong kaca, erlenmeyer, gelas ukur, neraca analitik, rotary evaporator.
- b. Alat untuk uji aktivitas antibakteri meliputi cawan petri, jarum ose, autoklaf, inkubator, oven, pipet ukur, lampu spiritus.

### 2. Bahan Penelitian

#### a. Bahan Uji

Pada penelitian ini bahan yang akan digunakan adalah buah labu kuning (*Cucurbita maxima D*) dan bakteri *Staphylococcus aureus*.

#### b. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain etanol 96%, aquades, asam stearat, cera alba, daging labu kuning (*Curcubita maxima D*), gliserin, metil paraben, Nutrient Agar (NA), triethanolamin, propil paraben, paraffin liq.

### 3. Prosedur Penelitian

#### a. Pengumpulan Bahan

Buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) yang digunakan pada penelitian ini diambil dari Kopeng Salatiga.

#### b. Determinasi Tanaman

Determinasi buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen

Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Hasil determinasi ini digunakan untuk menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan untuk menjamin kebenaran jenis atau spesies tanaman.

c. Penyiapan Bahan

Buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan sortasi untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji, kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu diangin-anginkan hingga tidak terdapat sisa air. Kemudian dihaluskan dengan blender, dan setelah diblender diayak menggunakan ayakan nomor 80 sehingga didapatkan serbuk halus kemudian dilakukan ekstraksi.

d. Pembuatan Ekstrak

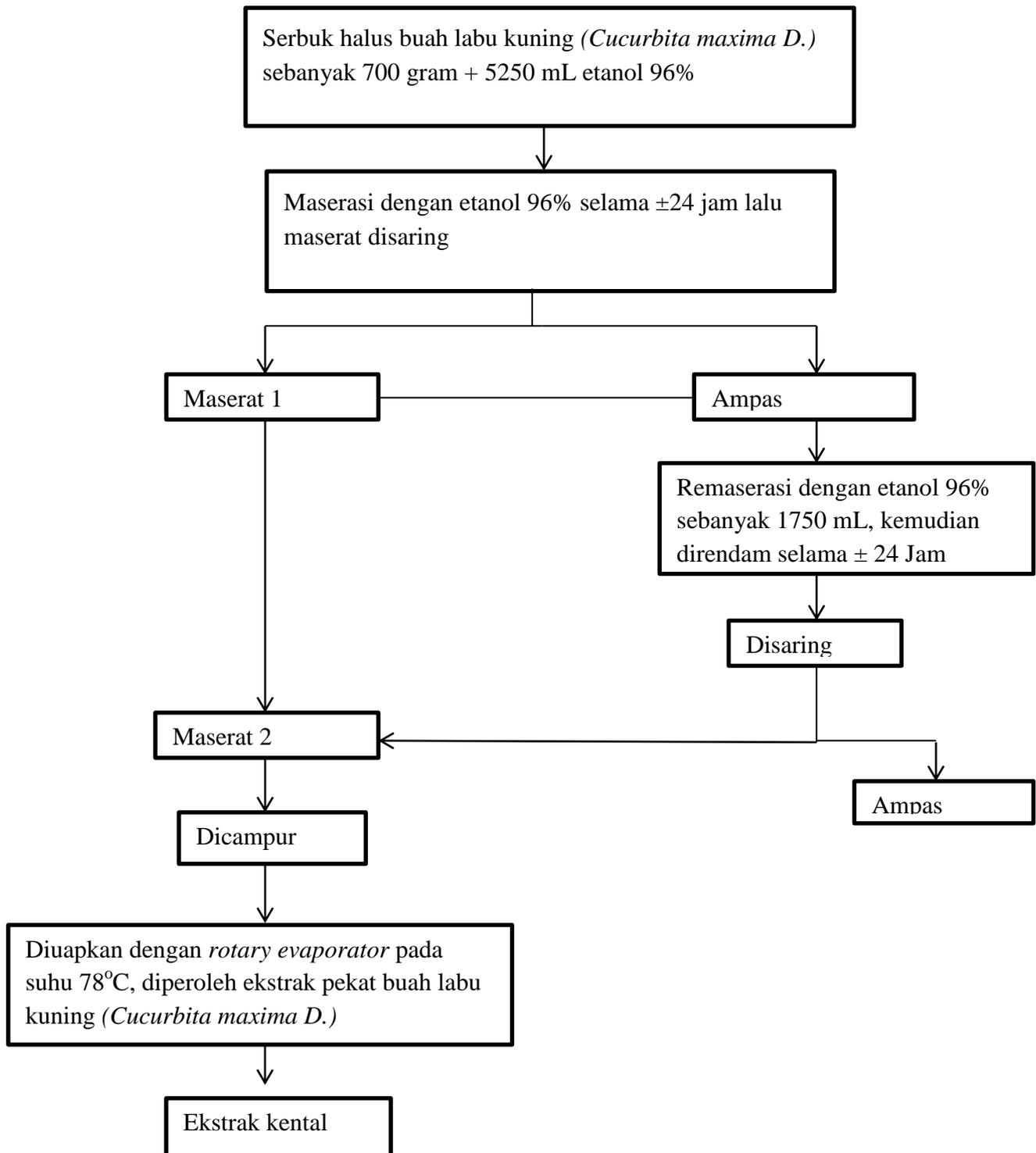
Pembuatan ekstrak buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Serbuk buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) sebanyak 700 gram yang telah diblender dan diayak, dilarutkan dalam etanol 96%. Pelarut yang digunakan sebanyak 7 L (1 : 10). Maserasi dilakukan selama 1 hari dengan pelarut yang digunakan 5250 mL (1 : 7,5) dan dilanjutkan remaserasi selama 2 hari dengan pelarut sebanyak 1750 mL (1: 2,5) dalam ruangan yang terlindungi cahaya matahari dan dilakukan pengadukan tiap 1 x 24 jam. Kemudian ekstrak yang diperoleh dari

maserat pertama disaring menggunakan kertas saring. Setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dilakukan remaserasi. Maserat pertama dan maserat kedua yang telah dikumpulkan, selanjutnya diuapkan menggunakan penangas air (rotary evaporator) dengan suhu 78°C hingga diperoleh ekstrak kental dan hitung randemennya. 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 penyarian pertama selesai, ampas diperas dan ditambahkan dari cairan penyari.

Randemen ekstrak dihitung dengan rumus :

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak Pekat (g)}}{\text{Bobot Bahan Sampel (g)}} \times 100\%$$

**Bagan Skema pembuatan ekstrak buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*)**



**Gambar 3.1 Skema pembuatan ekstrak buah labu kuning *Cucurbita maxima D.*)**

e. Pengujian ekstrak terhadap bakteri

1) Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit, semua alat dan bahan sebelum disterilisasi dibungkus terlebih dahulu dengan aluminium foil. Untuk bahan yang terbuat dari karet seperti karet pipet tetes disterilisasi dengan cara direbus. Untuk larutan uji/ medium sterilkan dengan cara memasukkan larutan uji/medium ke dalam wadah yang sesuai yaitu tabung reaksi atau erlenmeyer, kemudian sumbat wadah tersebut dengan sumbat yang sesuai atau dengan kapas, kemudian disterilisasi di autoklaf.

2) Pembuatan media pertumbuhan bakteri

Pada pembiakan bakteri menggunakan media digunakan Nutrient agar (NA). Serbuk NA sebanyak 23 gram dilarutkan dalam 1 liter aquadest dan dipanaskan hingga semuanya larut. Lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

3) Inokulasi bakteri pada media agar

Bakteri uji (*Staphylococcus aureus*) diambil dengan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media agar dengan cara menggoreskan. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### 4) Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 mL larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *McFarland 0,5*, kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Cara untuk membandingkannya adalah dengan cara memegang tabung secara berdampingan, satu tabung standar dan satu tabung suspensi bakteri. Kekeruhan dilihat dan dibandingkan dengan latar belakang kertas putih yang diberi garis tebal dengan spidol berwarna. Jika kurang keruh, suspensi ditambah koloni sedangkan jika lebih keruh ditambah NaCl 0,9%.

#### 5) Pengecatan Gram

Identifikasi bakteri dilakukan dengan pengecatan gram, dari bahan pemeriksaan akan dibuat sediaan dari bahan kaca object glass, kemudian diwarnai dengan prinsip pewarnaan Gram, dan diamati dibawah mikroskop. Bakteri gram positif terlihat dengan warna ungu sedangkan bakteri gram negatif terlihat berwarna merah muda, langsung ke bakteri *staphylococcus aureus*.

#### f. Pembuatan formula krim ekstrak etanol buah labu kuning

Proses pembuatan diawali dengan penimbangan bahan-bahan yang akan digunakan dalam pembuatan sediaan krim ekstrak etanol buah labu kuning. Bahan yang digunakan terdiri dari fase minyak dan

fase air. Bahan yang termasuk dalam fase air yaitu trietanolamin, metil paraben, propil paraben, gliserin, dan aquades dipanaskan hingga suhu 70° C. Bahan yang termasuk dalam fase minyak yaitu asam stearat dan setil alkohol dileburkan diatas penangas air hingga suhu 70° C. Fase minyak ditambahkan sedikit demi sedikit kedalam fase air kemudian dilakukan proses pengadukan dengan *homogenizer* hingga terbentuk basis krim. Setelah itu ditambahkan ekstrak buah labu kuning dan diaduk hingga homogen. kemudian di adjust pH dengan asam sitrat dan dihomogenkan. (Erwati dkk, 2016).

**Tabel 3.1 formulasi krim ekstrak buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*)**

<b>Bahan</b>	Formula 1 (10%)	Formula 2 (15%)	Formula 3 (20%)
Ekstrak labu kuning	5 mg	10 mg	20 mg
Asam stearat	5,50	5,50	5,50
Setil alkohol	2,00	4,00	6,00
Gliserin	10,00	10,00	10,00
Metil paraben	0,18	0,18	0,18
Propil paraben	0,02	0,02	0,02
Trietanolamin	1,50	1,50	1,50
Asam sitrat	Qs	Qs	Qs
Aquades	ad 100	ad 100	ad 100

g. Pengujian aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak buah labu kuning (*Cucurbita maxima D.*) dilakukan dengan metode difusi cakram. Kertas cakram yang digunakan memiliki diameter lingkaran 6 mm. Sebanyak 0,5 mL suspensi bakteri dimasukkan ke dalam cawan petri steril, kemudian ditambahkan 10 mL *Nutrient agar* cair. Diambil satu sengkeli bakteri dari biakan *Staphyococcus aureus* disenteriae

dengan menggunakan ujung ose steril. Lalu goreskan secara zig-zag pada seluruh media nutrient agar miring, oleskan secara merata. Pembuatan media dilakukan didekat api. Setelah agar memadat, setiap cawan petri dibuat diagram 5 bagian. Kertas cakram steril dengan diameter 5 mm dan ketebalan yang sama diletakan dipermukaan agar dengan jarak yang sama dengan yang lainnya. Berdasarkan penelitian (septiani *et al*, 2017) sebelum diletakkan ke permukaan media pada kertas cakram tersebut diinjeksikan 500 $\mu$ L sampel krim ekstrak dengan konsentrasi 10%, 15% dan 20%, kontrol positif dan kontrol negatif kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji antibakteri dilakukan pengulangan 3 kali. Area jernih disekeliling cakram menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri yang kemudian diukur menggunakan jangka sorong.

h. Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri

Perlakuan yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* sebagai berikut :

- 1) Kontrol media : 10 mL media NA
- 2) Kontrol pertumbuhan : 10 mL media NA ditambahkan 50  $\mu$ L suspensi bakteri
- 3) Kontrol negatif : 10 mL media NA ditambahkan 50  $\mu$ L suspensi bakteri ditambahkan 50  $\mu$ L aqua pro injeksi
- 4) Kontrol positif : 10 mL media NA ditambahkan 50  $\mu$ L suspensi bakteri ditambahkan 50  $\mu$ L Clindamycin 2 $\mu$ g

- 5) Perlakuan 1 : 10 mL media NA ditambahkan 50  $\mu$ L suspensi bakteri ditambahkan 50  $\mu$ L krim ekstrak labu kuning 10%
- 6) Perlakuan 2 : 10 mL media NA ditambahkan 50  $\mu$ L suspensi bakteri ditambahkan 50  $\mu$ L ekstrak labu kuning 15%
- 7) Perlakuan 3 : 10 mL media NA ditambahkan 50  $\mu$ L suspensi bakteri ditambahkan 50  $\mu$ L ekstrak labu kuning 20%
- 8) Perlakuan 3 : 10 mL media NA ditambahkan 50  $\mu$ L suspensi bakteri ditambahkan 50  $\mu$ L ekstrak labu kuning 25%

i. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Prosedur tersebut dapat dilihat nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) ekstrak buah labu kuning. Penentuan KHM dilakukan terhadap ekstrak yang masih memiliki aktivitas zona hambat pada pengujian diameter daerah zona hambat sebelumnya dengan menggunakan metode difusi cakram. Ekstrak sampel uji kemudian dibuat dalam konsentrasi 10%, 15% dan 20% kemudian dilakukan uji aktivitas seperti prosedur diatas. Penentuan KHM ditentukan berdasarkan konsentrasi terendah dari larutan ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dimana pada konsentrasi tersebut sudah tidak ada lagi pertumbuhan bakteri. Pengamatan berdasarkan pada ada tidaknya daerah bening yang terbentuk disekeliling kertas cakram. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi kertas cakram. Kertas saring dengan diameter 0,5 cm diambil secara aseptis menggunakan pinset yang telah disterilisasi. Kertas

saring tersebut dicelupkan selama 1 jam dalam salah satu variasi konsentrasi ekstrak buah labu kuning, kemudian diletakkan pada media yang berisi bakteri uji. Masing-masing perlakuan variasi konsentrasi ekstrak buah labu kuning yaitu 10%, 15%, 20% dibuat pengulangan sebanyak 3 kali serta aqua pro injeksi sebagai kontrol negatif dan Clindamycin sebagai kontrol positif. Media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Efektivitas ekstrak buah labu kuning dilihat dari zona hambat yang didapatkan. Zona hambat terlihat lebih bening daripada 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 buah labu kuning terhadap *Staphylococcus aureus* adalah menggunakan rumus berikut :

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

Keterangan:

R : diameter zona penghambatan (mm)

p : diameter zona penghambatan terpanjang (mm), dan

q : diameter zona penghambat terpendek (mm)

j. Analisis Data

Dalam penelitian ini dilakukan analisis deskriptif uji fisik yaitu uji organoleptis. Uji aktivitas antibakteri formulasi krim ekstrak etanol buah labu kuning data yang diperoleh dengan menggunakan metode difusi cakram yaitu besarnya diameter zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* berupa zona bening pada media.

Analisis data diameter zona hambat dilakukan dengan perangkat lunak SPSS 16.0. 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%. Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji LSD (Least Significant Different).

