

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Desain Penelitian**

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris.

### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

#### **1. Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian FKIK UMY dan Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY

#### **2. Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2016 – Oktober 2017.

### **C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

#### **1. Variable Penelitian**

Variabel Bebas : Variasi konsentrasi pada fraksi *n*-heksan ekstrak etanolik daun avokad (*Persea americana* Mill.).

Variabel tergantung : Diameter Zona hambat (DZI) pada fraksi *n*-heksan.

Variabel terkendali : Media pertumbuhan bakteri.

## 2. Definisi Operasional

- a) Konsentrasi fraksi daun avokad (*Persea americana* Mill.) adalah fraksi daun avokad yang diencerkan menggunakan DMSO dan dinyatakan dalam persen (%). Masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran. Konsentrasi yang dipakai pada penelitian ini adalah 12,5%, 25%, 50% dan 100%.
- b) Diameter Zona Hambat (DZI) adalah luas daerah bening pada biakan bakteri setelah tahap inkubasi. Diukur dengan menggunakan penggaris dalam satuan milimeter (mm) untuk mengetahui kekuatan daya hambat fraksi *n*-heksan ekstrak etanolik daun avokad terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*.

## D. Instrumen Penelitian

### 1. Alat Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan alat-alat yaitu bejana (*Stainless steel*), pisau (HB Stainless ®), blender, *rotary evaporator* (Heidolp ®), penangas (Akebonno ®), penggaris (Brand ®), oven (Shimadzu ®), inkubator (Memmert ®), propipet (Glasfirn ®), mikropipet (Gilson ®), timbangan analitik (Casbee ®), alat-alat gelas (Pyrex ®), kertas label (Brand ®), kain hitam, *centrifuge* (Digisystem Laboratory Instrument®), *Laminar Air Flow*, kapas lidi, ose steril, aluminium foil, pinset, dan seperangkat komputer (Lenovo).

## 2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang akan digunakan adalah daun avokad diambil di Kecamatan Gombang, Cawas – Kabupaten Klaten, Siprofloksasin, pelarut Dimetil Sulfoksida (DMSO) (Merck ®), etanol 70% (Brataco ®), etanol 96% (Brataco ®), etilasetat (Brataco ®), *n*-heksan (Brataco ®), koloni *Escherichia coli*, NaCl fisiologis, BHI, media agar Mac Conkey, aquades (Brataco ®), reagen dragendroff, FeCl, reagen sitroborat, FeCl<sub>3</sub> dan plat silika gel.

## E. Cara Kerja

### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi daun avokad (*Persea americana* Mill.) dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Gadjah Mada.

### 2. Fraksinasi Daun Avokad

Sejumlah 10 g ekstrak etanol kental dilarutkan sedikit demi sedikit kedalam 50 ml etanol 96% dalam beker gelas diaduk sampai homogen. Kemudian ditambahkan *n*-heksan perbandingan 1:1 dengan etanol 96% yaitu 50 ml, gojok pelan-pelan menggunakan corong pisah. Kemudian diamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas (fase *n*-heksan) dan lapisan bawah (fase etanol). Simpan fase *n*-heksan yang diperoleh. Fase etanol dimasukkan kembali kemudian ditambahkan *n*-heksan 50 ml untuk dilakukan partisi. Partisi dilakukan sebanyak tiga kali dengan

menambahkan 35 ml *n*-heksan pada setiap kali melakukan partisi. Masing-masing fase cair yang diperoleh yaitu fase *n*-heksan dan fase etanol. fase *n*-heksan kemudian dilakukan pemekatan menggunakan penangas air pada suhu 60°C hingga diperoleh fraksi *n*-heksan kental (fraksi non-polar).

### **3. Ekstraksi Daun Avokad**

Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi. Pertama adalah pengambilan daun avokad diambil pada bagian daun yang belum terlalu tua dan tidak terlalu muda. Bagian daun yang terpilih disortir dari pengotor dan ditimbang kemudian, dicuci dengan air mengalir, dan dijemur sampai kering dengan ditutup kain hitam.

Daun avokad yang sudah kering dipotong-potong hingga kecil dan dihaluskan hingga menjadi serbuk lalu ditimbang. Serbuk halus yang didapat direndam dalam bejana maserasi dengan alkohol 70% dengan perbandingan 1 : 7 selama 3 hari sambil diaduk setiap hari (Setiawan & Febriyanti, 2017). Ekstrak cair disaring dan residu di maserasi lagi dengan menggunakan alkohol 70% sampai mencapai perbandingan 1:10 selama 2 hari. Hasil rendaman yang sudah disaring kemudian, di evaporasikan dengan *rotary evaporator* dan dilakukan penguapan dengan pemanasan di bawah 60°C sampai didapatkan ekstrak kental. Hasil ekstraksi disimpan didalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

#### 4. Skrining Fitokimia

##### a. Kromatografi Lapis tipis

Analisis kualitatif terhadap fraksi *n*-heksan ekstrak etanolik daun avokad pada penelitian ini dilakukan terhadap golongan senyawa alkaloid yang berperan aktif sebagai agen antibakteri. Uji kromatografi lapis tipis pada penelitian ini menggunakan fase diam lempeng silika gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran 3 x 10 cm dan fase gerak *n*-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 1 : 2. Hasil diamati dengan dengan cara melihat warna bercak yang timbul dibawah sinar ultraviolet (UV) 254 nm dan 366 nm, bercak dapat diperjelas dengan rekasi penyemprotan. Kemudian dihitung Rf-nya dengan rumus sebagai berikut:

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh sampel}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Analisis kandungan senyawa dengan KLT terhadap fraksi etanol, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-heksan ekstrak etanolik daun avokad dilakukan dengan ketentuan seperti berikut ini:

##### a. Alkaloid

Fase diam : silika gel GF<sub>254</sub>

Fase gerak : *n*-heksan : etil asetat (1 : 2)

Deteksi : Sinar Tampak, UV 254, 366, *Dragondroff*

##### b. Tanin

Fase diam : silika gel GF<sub>254</sub>

Fase gerak : *n*-heksan : etil asetat (1 : 2)

Deteksi : Sinar Tampak, UV 254, 366, FeCl<sub>3</sub>

c. Flavonoid

Fase diam : silika gel GF<sub>254</sub>

Fase gerak : *n*-heksan : etil asetat (1 : 2)

Deteksi : Sinar Tampak, UV 254, 366, *Sitroborat*

**b. Analisis Senyawa Alkaloid**

Sebanyak 2 g sampel tumbuhan yang telah dihaluskan ditambahkan kloroform secukupnya lalu dihaluskan lagi. Kemudian ditambah 10 ml amoniak dan 10 ml kloroform. Larutan disaring ke dalam tabung reaksi, dan filtrat ditambahkan asam sulfat 2N sebanyak 10 tetes. Filtrat dikocok dengan teratur kemudian dibiarkan beberapa lama sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas dipindahkan ke dalam tiga tabung reaksi masing-masing 2,5 ml. Ketiga larutan ini dianalisis dengan pereaksi Dragendorff. Terbentuknya endapan jingga dengan pereaksi Dragendorff menunjukkan hasil positif.

**c. Analisis Senyawa Saponin**

Sebanyak 2 ml sampel tumbuhan yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah air suling sehingga seluruh cuplikan terendam, dididihkan selama 2-3 menit, dan selanjutnya

didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

## **5. Uji Antibakteri**

### **a. Sterilisasi Alat**

Alat dan bahan yang digunakan dilakukan sterilisasi terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan menggunakan oven dengan suhu 200°C selama 2 jam. Ose dan pinset disterilkan dengan menggunakan Bunsen. Sampel yang telah dibuat seri konsentrasi, semua alat, dan bahan kecuali suspensi bakteri sebelum dilakukan pengujian disterilisasi menggunakan lampu UV selama 30 menit.

### **b. Pembuatan Standard McFarland 0,5%**

McFarland adalah standart uji yang memungkinkan perbandingan visual dari kepadatan bakteri atau jamur. McFarland dibuat dengan mencampurkan 0,05 mL BaCl<sub>2</sub> 1,175% dengan 9,95 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%. Tutup dengan rapat menggunakan aluminium foil, kocok menggunakan vortex, lalu simpan pada suhu ruang di tempat gelap. Standart McFarland digunakan sebagai dasar perbandingan pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* dengan cara membandingkan kekeruhan secara visual.

**c. Pengembangbiakan Bakteri**

Bakteri uji diinokulasi pada medium Mac Conkey dengan cara menggoreskan bakteri menggunakan jarum ose pada permukaan agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

**d. Pembuatan Suspensi Bakteri**

Bakteri *Escherichia coli* dikembangkan dulu dengan cara mengambil beberapa koloni lalu dioleskan pada media SDA inkubasi selama 1 hari. Ambil 4 koloni *Escherichia coli* masukkan ke tabung yang sudah diisi dengan BHI 0,5 ml, lalu ditambahkan NaCl 0,9% hingga tingkat kekeruhan yang sama dengan standart McFarland yaitu 12 ml kemudian dibandingkan secara visual menggunakan latar belakang garis horizontal hitam putih. Inkubasi selama 4 jam suhu 37°C.

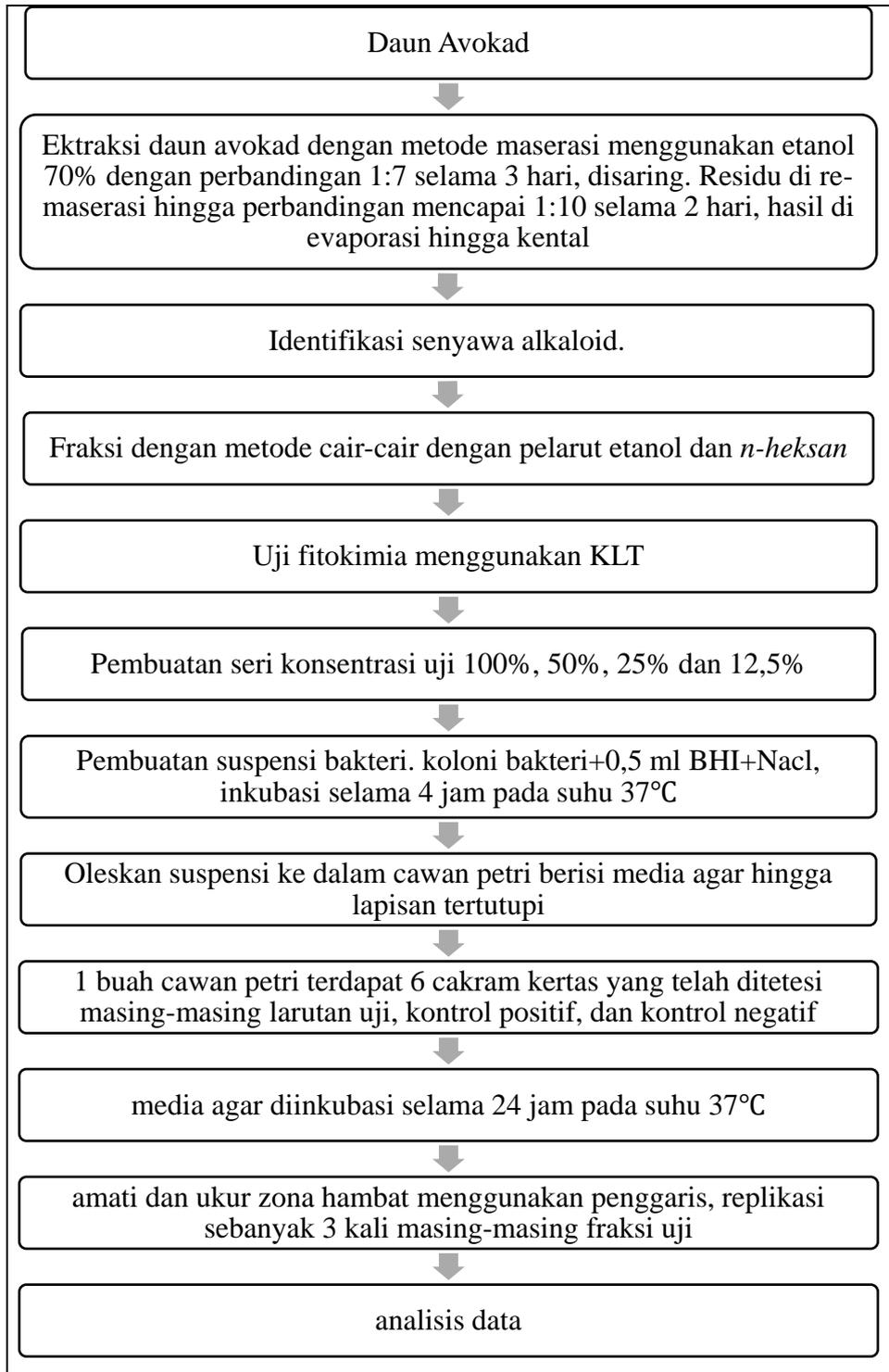
**e. Pembuatan Seri Konsentrasi**

Untuk pembuatan konsentrasi fraksi etanol dan fraksi *n*-heksan ekstrak etanolik daun avokad ditimbang sebanyak 2 gram larutkan dengan 2 ml aquades untuk fraksi etanolik dan 2 ml DMSO untuk melarutkan fraksi *n*-heksan, kemudian dari larutan 2 g/2ml bagi menjadi 2 bagian, bagian pertama sebagai seri konsentrasi 100 mg/ml dan bagian yang lain dibuat pengenceran 50 mg/ml, 25 mg/ml, dan 12,5 mg/ml.

**f. Uji Antibakteri *Escherichia coli***

Uji ini dilakukan untuk melihat diameter zona hambat minimum (DZI) dari setiap konsentrasi kadar fraksi yang dibuat. Suspensi *E.coli* dibuat dengan NaCl steril. Kemudian disiapkan beberapa cakram kertas untuk masing-masing larutan uji ke dalam cawan petri, 12 cakram kertas untuk masing-masing konsentrasi bahan uji 12,5%, 25%, 50%, dan 100% yang di replikasi sebanyak 3 kali, masing-masing 3 cakram kertas untuk DMSO sebagai kontrol negatif, 3 cakram kertas untuk siprofloksasin sebagai kontrol positif. Untuk uji aktivitas antibakteri dibutuhkan 6 buah cawan petri yang berisi media Mac Conkey. Selanjutnya dengan menggunakan *swab* steril, suspensi *E.coli* disebar pada permukaan medium Mac Conkey sampai permukaannya tertutupi. Cakram kertas yang telah mengandung bahan uji diletakkan diatas permukaan Mac Conkey yang telah diberi suspensi *E.coli* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Rotstein, Lifshitz, & Kashman, 1974). Pengujian ini dilakukan 3 kali replikasi untuk menjaga reliabilitas.

### A. Alur Penelitian



**Gambar 1.** Alur Penelitian

## **B. Analisis Hasil**

- a. Analisis kandungan senyawa alkaloid pada sampel dilakukan menggunakan metode KLT dengan cara membandingkan kesesuaian warna bercak yang dilakukan dibawah sinar UV 254 nm, UV 366 nm, dan sinar tampak dengan menggunakan pereaksi semprot.
- b. Analisis hasil uji antibakteri dilakukan dengan cara mengukur diameter zona hambat ( DZI ) yang dihasilkan oleh masing-masing konsentrasi fraksi uji menggunakan penggaris dan membandingkannya dengan ukuran diameter zona hambat siprofloksasin sebagai kontrol positif.