

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian FKIK UMY dan Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY. Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2016-Oktober 2017.

C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : Variasi konsentrasi pada fraksi etanol ekstrak etanolik daun alpukat (*Persea americana* Mill.).
- b. Variabel tergantung : Diameter Zona Inhibisi (DZI) dari tiap seri kadar.
- c. Variabel terkontrol : Media pertumbuhan bakteri dan Jumlah koloni bakteri.

2. Definisi Operasional

- a. Konsentrasi fraksi daun alpukat (*Persea americana* Mill.) adalah fraksi daun alpukat yang diencerkan menggunakan aquades 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 Inhibisi (DZI) adalah diameter yang berupa zona bening yang menunjukkan daya hambat fraksi etanol ekstrak etanolik daun alpukat terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang diukur dengan menggunakan penggaris dalam satuan milimeter (mm).
- c. Ekstrak daun alpukat adalah sediaan pekat yang didapat dengan mengekstraksi zat aktif dari daun alpukat dengan menggunakan pelarut etanol 70%.
- d. Jumlah koloni *Shigella dysenteriae* adalah jumlah *Shigella dysenteriae* yang sesuai dengan 10^8 CFU/ml diperoleh dengan membuat kekeruhan bakteri yang setara dengan 0,5 McFarland yang dilihat dengan visual.
- e. Fraksi etanol ekstrak etanolik adalah fraksi yang didapat dari ekstrak alpukat kental yang dilarutkan dalam pelarut etanol 96%.

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 (Glasfirt ®), mikropipet (Gilson ®), timbangan analitik (Casbee ®), alat-alat gelas

(Pyrex ®), kertas label (Brand ®), kain hitam, centrifuge (Digisystem Laboratory Instrument®), *Laminal Air Flow*, kapas lidi, ose steril, aluminium foil, pinset, dan seperangkat computer (Acer).

2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang akan digunakan adalah daun alpukat diambil di Desa Gombang Kecamatan Cawas – Kabupaten Klaten, Siprofloksasin, etanol 70% (Brataco ®), etanol 96% (Brataco ®), etilasetat (Brataco ®), *n*-heksan (Brataco ®), koloni *Shigella sp*, NaCl fisiologis, BHI, media agar TSA dan aquades (Brataco ®).

E. Cara Kerja

1. Determinasi

Determinasi daun alpukat dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

2. Ekstraksi Daun Alpukat

Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi. Pertama adalah daun alpukat 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 hingga kering dengan ditutup kain berwarna hitam.

Daun alpukat yang sudah kering dipotong kecil-kecil dan dihaluskan menjadi serbuk menggunakan blender lalu ditimbang. Serbuk halus yang didapat direndam dalam bejana maserasi dengan alkohol 70% dengan perbandingan 1:7 selama 3 hari sambil diaduk setiap hari. Ekstrak

cair disaring dan residu dimaserasi lagi dengan menggunakan alkohol 70% hingga mencapai perbandingan 1:10 selama 2 hari. Hasil rendaman yang sudah disaring kemudian dievaporasi 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.

3. Fraksinasi Daun Alpukat

Sejumlah 10 g ekstrak etanol kental dilarutkan sedikit demi sedikit ke dalam 50 ml etanol 96% dalam gelas beker dan diaduk sampai homogen. Kemudian ditambahkan *n*-heksan dan etanol dengan perbandingan 1:1 yaitu 50 ml, digojog pelan-pelan menggunakan corong pisah. Kemudian didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas (fase *n*-heksan) dan lapisan bawah (fase etanol). Fase *n*-heksan yang telah diperoleh disimpan. 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 etanol kemudian dilakukan pemekatan menggunakan penangas air pada suhu 60°C hingga diperoleh fraksi etanol kental (fraksi polar).

4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis kualitatif terhadap fraksi etanol ekstrak etanolik daun alpukat pada penelitian ini dilakukan terhadap golongan senyawa

alkaloid yang berperan aktif sebagai antibakteri. Uji kromatografi lapis tipis pada penelitian ini menggunakan fase diam lempeng silika gel GF₂₅₄ dengan ukuran 3x10 cm dan fase gerak *n*-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 1:2. Hasil diamati dengan cara melihat warna bercak yang timbul dibawah sinar ultraviolet (UV) 254 nm dan 366 nm, bercak dapat diperjelas dengan reaksi 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 ekstrak etanolik daun alpukat dilakukan dengan ketentuan seperti berikut ini:

a. Alkaloid

Fase diam : silika gel GF₂₅₄

Fase gerak : *n*-heksan : etilasetat (1 : 2)

Deteksi : Sinar UV 254, 366, Dragendorff

b. Tanin

Fase diam : silika gel GF₂₅₄

Fase gerak : *n*-heksan : etilasetat (1 : 2)

Deteksi : Sinar UV 254, 366, FeCl₃

c. Flavonoid

Fase diam : silika gel GF₂₅₄

Fase gerak : *n*-heksan : etilasetat (1 : 2)

Deteksi : Sinar UV 254, 366, Sitroborat

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 Standart McFarland 0,5%

McFarland adalah standart uji yang memungkinkan perbandingan visual dari kepadatan bakteri atau jamur. McFarland dibuat dengan mencampurkan 0,05 mL BaCl₂ 1,175% dengan 9,95 ml H₂SO₄ 1%. Ditutup dengan rapat menggunakan aluminium foil, dikocok menggunakan vortex, lalu disimpan pada suhu ruang di tempat gelap. Standart McFarland digunakan sebagai dasar perbandingan pembuatan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* dengan cara membandingkan kekeruhan secara visual.

c. Pengembangbiakan Bakteri

Bakteri uji diinokulasi pada media TSA dengan cara menggoreskan bakteri menggunakan ose pada permukaan agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Shigella dysenteriae* dikembangkan dulu dengan cara berapa koloni lalu dioleskan pada media TSA diinkubasi selama 1

hari. Mengambil 4 koloni bakteri *Shigella dysenteriae* dimasukkan ke dalam 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. Kemudian diinkubasi selama 2 jam suhu 37°C.

e. Pembuatan Seri Konsentrasi

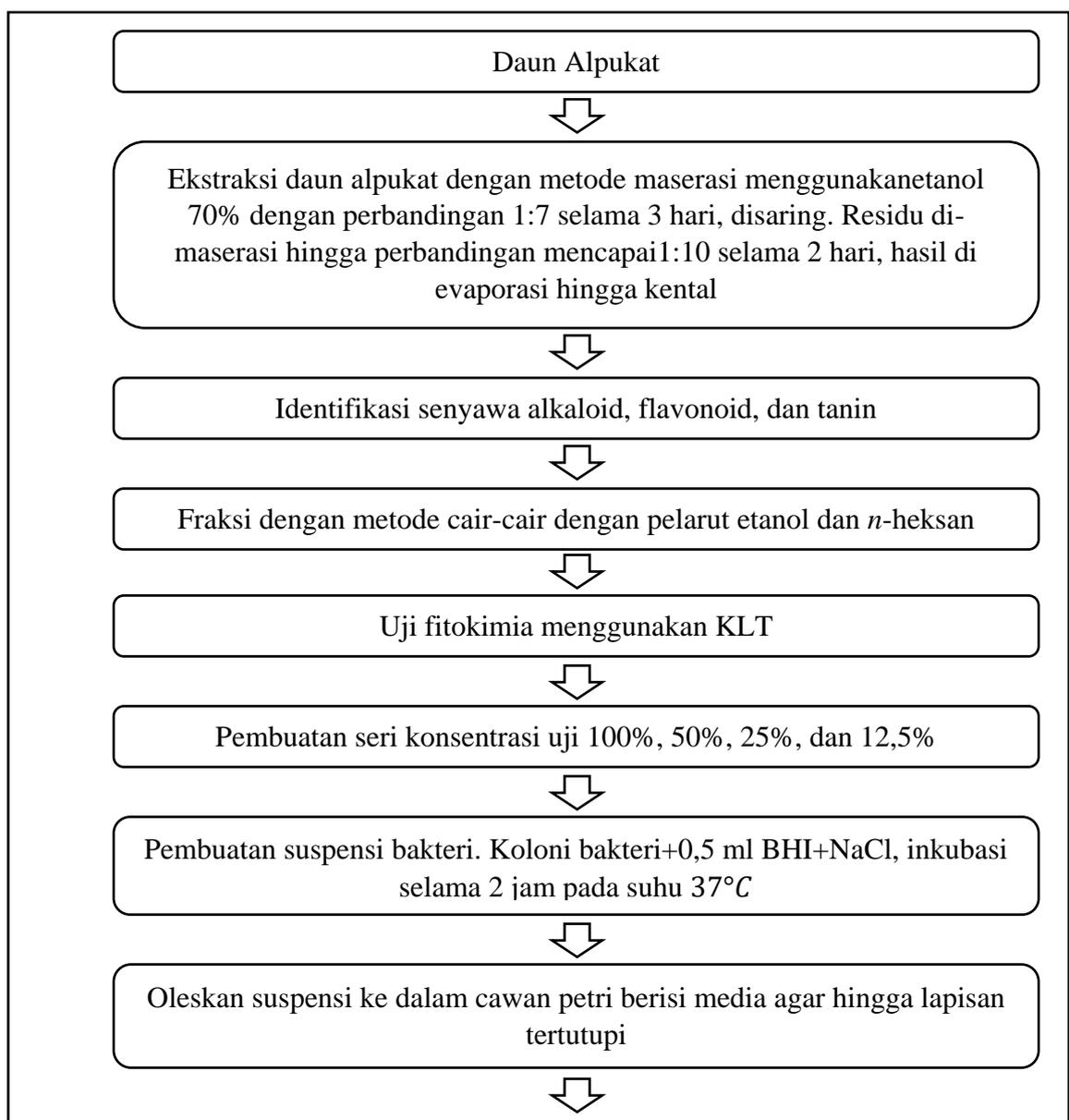
Fraksi etanol dibuat kadar seri konsentrasi dengan berbagai variasi yaitu 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Masing-masing konsentrasi ekstrak etanolik tersebut dilakukan replikasi pengujian antibakteri sebanyak 3x.

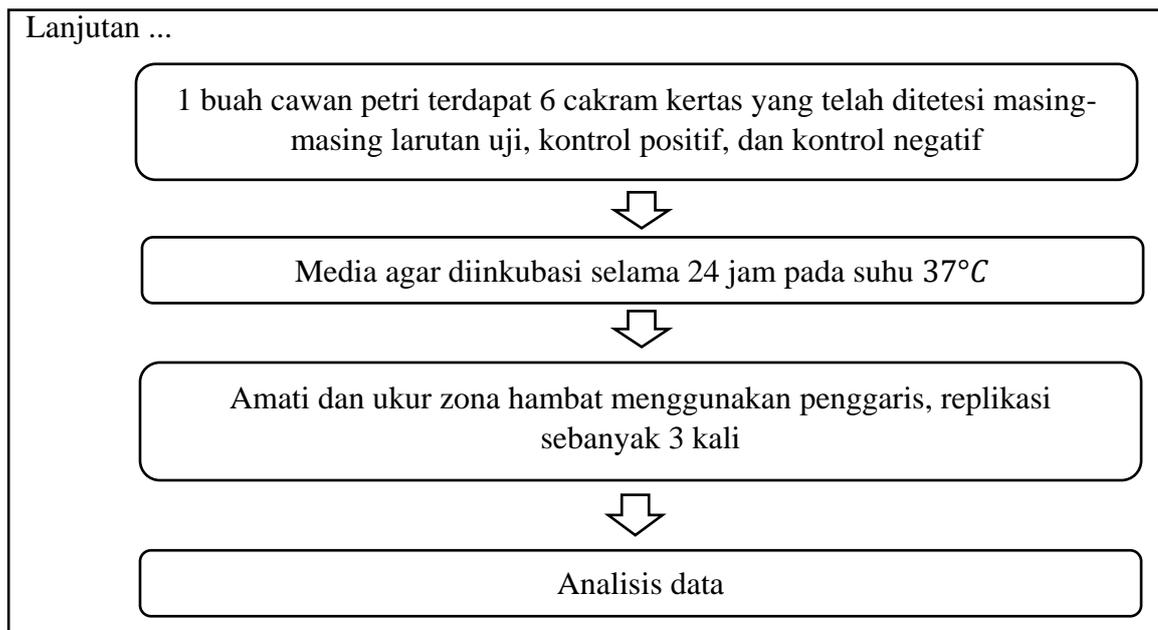
f. Uji Antibakteri *Shigella dysenteriae*

Uji ini dilakukan untuk melihat Diameter Zona Inhibisi (DZI) dari setiap konsentrasi kadar fraksi yang dibuat. Suspensi *Shigella dysenteriae* 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 aquadest steril sebagai kontrol negatif, 3 cakram kertas untuk siprofloksasin sebagai kontrol positif. Untuk uji aktivitas antibakteri dibutuhkan 3 cawan petri yang berisi media TSA. Selanjutnya dengan menggunakan *swab* steril, suspensi *Shigella dysenteriae* disebar pada permukaan medium TSA

sampai permukaannya tertutupi. Cakram kertas yang telah direndam bahan uji diletakkan diatas permukaan TSA yang telah diberi suspensi *Shigella dysenteriae* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengujian ini dilakukan 3 kali replikasi untuk menjaga reliabilitas.

F. Alur Penelitian





Gambar 1. Alur Penelitian

G. Analisis Data

- a. Analisis kandungan senyawa alkaloid, tanin, dan flavonoid pada sampel dilakukan menggunakan metode KLT dengan cara membandingkan kesesuaian wana 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.