

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Desain Penelitian**

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental laboratorium. Dalam penelitian ini mempunyai beberapa tahapan, yaitu: determinasi sampel, ekstraksi sampel dengan pelarut metanol, identifikasi kualitatif kandungan alkaloid dan flavonoid, kemudian ekstrak metanolik biji mahoni yang didapatkan dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Shigella flexneri*.

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

Penelitian dilaksanakan dari bulan Juli 2015 sampai September 2015, di laboratorium penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

#### **C. Variabel Penelitian**

##### 1. Uji aktivitas antibakteri

- a. Variabel bebas : Ekstrak kental metanolik biji mahoni dengan konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%.
- b. Variabel tergantung : Diameter zona hambat di sekitar kertas cakram pada media agar.

#### D. Variabel Operasional

Variabel operasional yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri ekstrak metanolik biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L) Jacq) terhadap bakteri *Shigella flexneri* adalah:

1. Variabel bebas adalah ekstrak yang didapatkan dari biji mahoni yang telah diekstraksi terlebih dahulu menggunakan metanol. Sampai didapatkan hasil ekstrak sesuai dengan jumlah yang diharapkan.
2. Variabel tergantung adalah efektivitas daya antibakteri yang telah diuji pada ekstrak metanolik biji mahoni terhadap bakteri *Shigella flexneri*.

#### E. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian pada penelitian ini meliputi bahan-bahan, diantaranya adalah biji mahoni sebagai simplisia yang didapatkan dari Herbaltama persada dan telah dideterminasikan di laboratorium Unit II bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada. Selain itu digunakan juga media cair BHI (*Brain Heart Infusion*), aquades (Bratachem<sup>®</sup>), suspensi *Shigella flexneri*, lempeng KLT silica gel 60 F<sub>254</sub>, etil asetat (Bratachem<sup>®</sup>), kloroform (Bratachem<sup>®</sup>), n-butanol (Bratachem<sup>®</sup>), asam asetat (Bratachem<sup>®</sup>). Bahan lain yang digunakan adalah metanol (Bratachem<sup>®</sup>) dan ciprofloksasin tablet (Novell<sup>®</sup>). Sedangkan alat yang digunakan yaitu pengaduk (Stainless steel<sup>®</sup>), corong pemisah (Pyrex<sup>®</sup>), kertas cakram, Erlenmeyer (Pyrex<sup>®</sup>), penggaris (Brand<sup>®</sup>), *incubator* (Memert<sup>®</sup>), oven (Shidmazu<sup>®</sup>), toples, timbangan analitik (Casbee<sup>®</sup>), *autoklaf* (All american<sup>®</sup>), propipet (Glasfirn<sup>®</sup>), *rotary evaporator* (IKA<sup>®</sup> RV 10), blender

(Philip<sup>®</sup>), *aluminium foil* (Brand), *Laminar air flow* (LAF) (Labconco<sup>®</sup>), vortex, kompor listrik (Cimarec<sup>®</sup>), kain flanel, lidi kapas steril, kertas perekat (Brand<sup>®</sup>), pipa kapiler, gelas beker (Pyrex<sup>®</sup>), tabung reaksi (Pyrex<sup>®</sup>) dan rak tabung reaksi.

## F. Cara Kerja

### 1. Pembuatan Simplisia

Biji dari buah tanaman mahoni yang telah didapatkan kemudian dicuci hingga bersih dengan air yang mengalir, lalu ditiriskan. Biji mahoni kemudian dikeringkan dengan cara dianginkan dan terhindar dari sinar matahari langsung. Biji mahoni yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender sehingga menjadi serbuk.

### 2. Pembuatan Ekstrak Metanolik

Biji mahoni yang telah dikeringkan dan dihaluskan dengan menggunakan blender sehingga menghasilkan serbuk kemudian diayak menggunakan ayakan 1mm. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol. Maserasi dilakukan dengan cara merendam 200 gr serbuk biji mahoni hasil ayakan ke dalam pelarut metanol sebanyak 1600 ml dalam botol berwarna gelap, kemudian dibiarkan selama 4 hari terlindung dari cahaya matahari langsung sambil diaduk secara periodik, kemudian disaring menggunakan kain flanel sehingga didapat maserat. Ampas hasil maserasi kemudian ditambahkan kembali dengan metanol 1600 ml dan direndam selama 2 hari. Kemudian dilakukan prosedur yang sama seperti hasil rendaman pertama. Semua maserat metanol digabungkan dan

diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada temperatur kurang lebih 40°C dan dilanjutkan menggunakan penangas air sampai diperoleh ekstrak metanolik kental. Ekstrak metanolik yang diperoleh dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *Shigella flexneri*.

### 3. Analisis Kandungan Kimia Metode KLT

Pengujian dengan metode KLT terhadap ekstrak metanolik biji mahoni pada penelitian ini dilakukan terhadap golongan senyawa alkaloid dan flavonoid yang diduga terkandung dalam ekstrak kental biji mahoni yang berperan aktif sebagai antibakteri. Pemeriksaan senyawa alkaloid dilakukan dengan cara ekstrak kental dilarutkan dalam metanol terlebih dahulu. Kemudian ekstrak aktif yang telah ditotolkan pada plat dimasukkan ke dalam bejana eluen yang telah jenuh dengan fase gerak yang telah sesuai. Kemudian didiamkan hingga fase gerak telah mampu melulusi ekstrak uji sampai jarak 8cm. Setelah fase gerak mencapai batas plat, plat dikeluarkan dari bejana dan kemudian pelarutnya dibuat mengering. Hasil diamati dengan melihat bercak pada plat pada sinar tampak, serta menggunakan sinar ultraviolet (254 nm dan 366 nm) dan  $R_f$  masing-masing bercak diukur, bercak pada plat dapat diperjelas dengan reaksi penyemprotan. Rumus untuk menghitung  $R_f$  adalah sebagai berikut :

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

Analisis kandungan senyawa dengan metode KLT terhadap biji mahoni dilakukan dengan ketentuan seperti berikut ini:

a. Untuk alkaloid

1. Fase diam : Silika gel 60 F<sub>254</sub>
2. Fase gerak : Etil asetat : Kloroform (6 : 1)
3. Deteksi : UV 254, UV 366, Dragendorff

b. Untuk Flavonoid

1. Fase diam : Silika gel 60 F<sub>254</sub>
2. Fase gerak : n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5)
3. Deteksi : UV 254, UV 366, Sitoborat

4. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi

Proses sterilisasi disesuaikan dengan alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian, dimana alat-alat gelas disterilkan dalam oven pada suhu 170°C selama 2 jam, jarum ose dan pinset disterilkan dengan menggunakan bunsen hingga memijar dan media disterilkan pada autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Lay dan Hastowo, 1992).

b. Pembuatan media agar

Sebanyak 11 gr serbuk media NA dilarutkan dengan 50 ml aquades dalam labu arlenmeyer kemudian dipanaskan. Media kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1atm selama 15 menit. Media NA kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 15 ml dan dibiarkan mengeras.

c. Pembuatan suspensi bakteri uji

Satu ose koloni bakteri diambil dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 ml NaCl 0,9% dan diinkubasi selama 2 sampai 4 jam. Larutan suspensi bakteri tersebut diambil 1 ml dan ditambahkan nutrien BHI sebanyak 9 ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Larutan ini dijadikan sebagai larutan stok untuk pengujian antibakteri ekstrak metanolik biji mahoni.

d. Pembuatan larutan uji

Pembuatan larutan uji pada penelitian ini dilakukan dengan membuat variasi kadar konsentrasi ekstrak 20%, 40%, 60%, dan 80% sebagai larutan uji. Pembuatan variasi konsentrasi larutan uji ekstrak kental metanolik biji mahoni dilakukan dengan cara menimbang 0,2 gr, 0,4 gr, 0,6 gr dan 0,8 gr ekstrak kental dan dilarutkan dengan aquades hingga volume 1 ml.

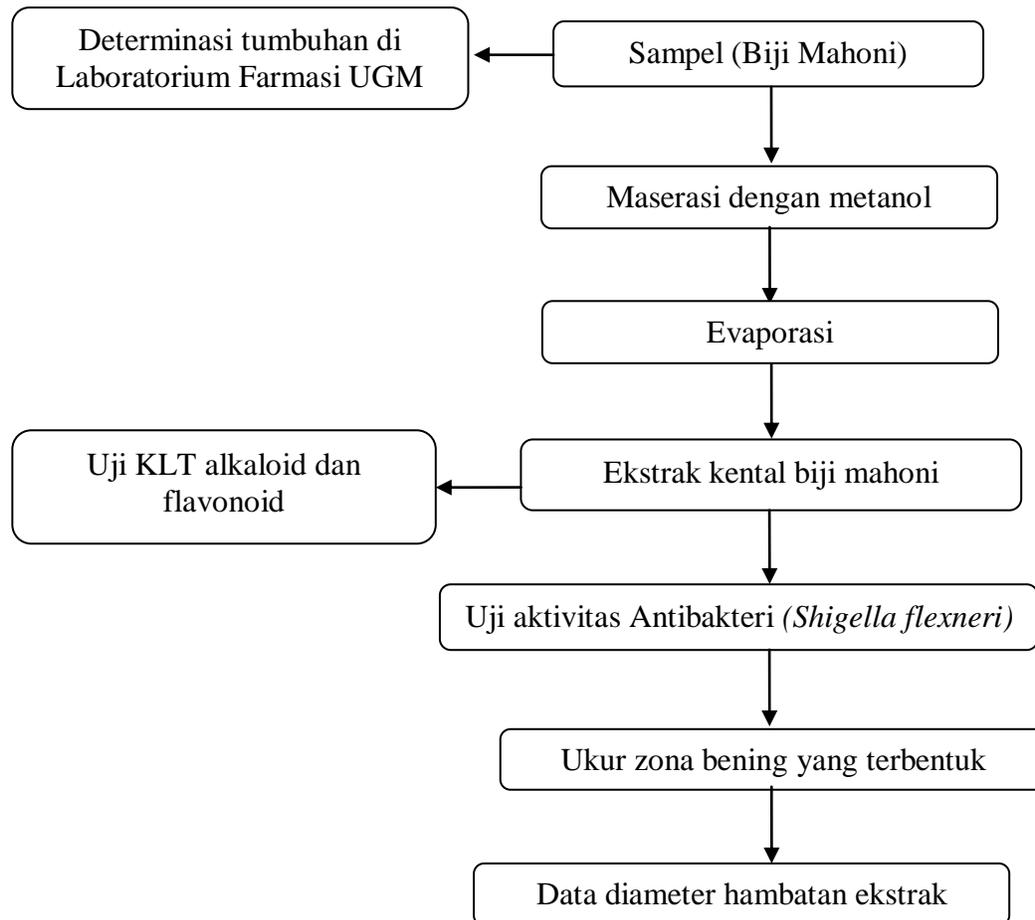
e. Pembuatan kontrol positif

Kontrol positif pada penelitian ini dibuat dari sediaan ciprofloksasin 500 mg. Untuk menghasilkan larutan uji dengan konsentrasi 0,612% (6,12 mg/ml), maka sebanyak 1 tablet sediaan ciprofloksasin 500 mg dengan berat total 940 mg digerus hingga halus kemudian ditimbang hingga diperoleh berat serbuk sebanyak 115 mg. Serbuk ciprofloksasin yang telah diperoleh kemudian dilarutkan dalam 10 ml aquades dan dijadikan sebagai larutan induk untuk pengujian kontrol positif.

f. Penentuan aktivitas antibakteri

Penentuan aktivitas antibakteri dari ekstrak metanolik biji mahoni dengan menggunakan kertas cakram. Bakteri uji yaitu *Shigella flexneri* diambil sebanyak 1 ml dan dinokulasikan ke dalam media NA yang sebelumnya telah dituangkan dalam cawan petri. Selanjutnya kertas cakram yang telah disterilisasi direndam dengan larutan uji dengan berbagai konsentrasi dan ciprofloksasin sebagai kontrol positif. Sebelum kertas cakram diletakan di atas permukaan agar, kertas cakram yang telah direndam pada larutan uji ekstrak metanolik didiamkan selama 2 jam untuk menguapkan metanol yang kemungkinan masih terkandung dalam ekstrak. Selanjutnya kertas cakram yang telah direndam diletakan di atas permukaan agar yang telah terdapat bakteri uji. Perlakuan ini dilakukan replikasi 3 kali. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diukur diameter hambatan yang terbentuk menggunakan penggaris.

### G. Skema Langkah Kerja



**Gambar 4.** Skema Langkah Kerja

### H. Analisis Data

Data pengaruh ekstrak metanolik biji mahoni terhadap pertumbuhan *Shigella flexneri* akan dimasukan ke dalam perangkat lunak SPSS lalu diuji melalui uji normalitas dengan metode Shapiro-Wilk untuk menilai distribusinya. Jika tidak terdistribusi normal, maka akan dilanjutkan dengan uji non parametrik dengan menggunakan metode Kruskal-Wallis. Selanjutnya untuk melihat rata-rata zona hambat tiap konsentrasi ekstrak metanolik maka diuji statistik lanjutan dengan menggunakan uji *one way ANOVA*.