

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian yang dilakukan menggunakan metode eksperimental laboratorium, mengenai uji potensi antibakteri ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* terhadap *Shigella flexneri* ATCC 12022.

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

1. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Waktu yang digunakan untuk penelitian ini adalah dimulai September 2015 sampai bulan Juni 2016.

#### **C. Populasi dan Sampel Penelitian**

1. Subyek penelitian ini adalah biakan murni bakteri *Shigella flexneri* ATCC 12022
2. Bahan Uji yang digunakan adalah daun *J. curcas* yang berasal dari Wirosari, Grobogan, Jawa Tengah.

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

##### **1. Variabel Penelitian**

- a. Analisis Kandungan Kimia Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Variabel Bebas : Ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas*

Variabel Tergantung : Nilai Rf pada plat KLT

Variabel Terkendali : Waktu eluen mencapai batas plat

b. Uji Aktivitas Antibakteri

Variabel Bebas : Konsentrasi ekstrak daun *J. curcas* pada variasi pelarut.

Variabel Tergantung : Nilai DZI masing-masing ekstrak daun *J. curcas*

Variabel Terkendali : Media pertumbuhan bakteri

c. Variabel Pengganggu : Kontaminasi mikroba lain

Ketelitian pada pengamatan

## 2. Definisi Operasional

- a. Rf atau faktor retardasi adalah jarak yang ditempuh sampel dengan jarak yang ditempuh fase gerak. Nilai Rf ini kemudian dibandingkan dengan nilai Rf senyawa.
- b. DZI adalah diameter yang menunjukkan hambatan suatu senyawa antibakteri terhadap bakteri yang diuji dan dinyatakan dalam satuan mm.

## E. Instrumen Penelitian

### 1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain oven (Memmert<sup>®</sup>), *blender* (Cosmos<sup>®</sup>), bejana maserasi, erlenmeyer 1000 mL (Pyrex<sup>®</sup>), corong kaca (Pyrex<sup>®</sup>), batang pengaduk, *vacuum rotary evaporator* (Yamato<sup>®</sup>), cawan penguap (Pyrex<sup>®</sup>), *water bath* (Memmert<sup>®</sup>), timbangan

analitik (Mettler Toledo<sup>®</sup>), tabung reaksi (Pyrex<sup>®</sup>), penjepit dan rak tabung reaksi, cawan porselen, labu takar (Pyrex<sup>®</sup>), gelas ukur 100 mL (Pyrex<sup>®</sup>), gelas beker 100 mL dan 250 mL (Pyrex<sup>®</sup>), pipet tetes, pipet ukur (Pyrex<sup>®</sup>) jarum ose, bunsen, *Hot Plate*, autoklaf (ALP<sup>®</sup>), tip dan mikropipet (Transferpette<sup>®</sup>), cawan petri (Pyrex<sup>®</sup>), *Biological Safety Cabinet (BSC)* (Biobase<sup>®</sup>), lemari pendingin (LG<sup>®</sup>), jangka sorong (Mitutoyo<sup>®</sup>), dan spektrofotometri (Genesys 6<sup>®</sup>).

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain daun *J. curcas*, air suling (Brataco<sup>®</sup>), aluminium foil, span 80 (Brataco<sup>®</sup>), kertas cakram steril, aseton (Brataco<sup>®</sup>), Siprofloksasin 2mg/ml (Oxoid<sup>®</sup>), tween 80, kertas saring, etilasetat (Brataco<sup>®</sup>), *n*-heksan (Brataco<sup>®</sup>), pereaksi Mayer (Merck<sup>®</sup>), pereaksi Dragendorff (Merck<sup>®</sup>), asam klorida (HCl) pekat (Merck<sup>®</sup>), (FeCl<sub>3</sub>) (Merck<sup>®</sup>), Anhidrida asetat (Merck<sup>®</sup>), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat (Merck<sup>®</sup>), *Media Mac Conkey* (Pronadisa<sup>®</sup>), (NaCl) 0,9%.

## F. Cara Kerja

### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi daun *J. curcas* dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

### 2. Penyiapan Bahan

Daun *J. curcas* yang sudah diperoleh dibersihkan, disortir, selanjutnya dicuci dan dikeringkan dengan dijemur dibawah sinar matahari yang ditutup kain hitam pada bagian atasnya sampai simplisia kering.

### 3. Ekstraksi

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi. Simplisia daun *J. curcas* yang sudah kering dihaluskan hingga memenuhi derajat halus yang sesuai. Serbuk halus 350 gram diekstraksi menggunakan etilasetat dan 250 gram serbuk diekstraksi menggunakan *n*-heksan dalam bejana dengan perbandingan antara serbuk simplisia dan pelarut adalah 1:7 b/v. Proses maserasi dilakukan selama 4 hari dan dilanjutkan remaserasi selama 2 hari. Sari dikerai dan ampas diperas menggunakan kain flanel dan kertas saring. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga terbentuk ekstrak kental.

### 4. Analisis Kandungan Kimia Metode KLT

Ekstrak kental yang diperoleh dari maserasi diencerkan dengan masing-masing pelarut, yaitu etilasetat dan *n*-heksan. Selanjutnya plat KLT diberikan 2 penotolan, yaitu ekstrak etilasetat dan *n*-heksan. Plat KLT yang telah diberi perlakuan tersebut kemudian dimasukkan secara vertikal ke dalam bejana yang telah jenuh dengan fase gerak. Setelah fase gerak mencapai batas atas yang telah ditentukan pada plat KLT, selanjutnya plat dikeluarkan dari bejana dan dibiarkan mengering. Deteksi bercak hasil pemisahan dapat dilihat menggunakan lampu UV 254. Bercak pada larutan ekstrak yang telah terpisah kemudian dibandingkan dengan bercak pada larutan pembanding melalui perhitungan nilai R<sub>f</sub>. Fase gerak dan fase diam yang digunakan pada pengujian ini adalah sebagai berikut :

Fase Gerak : *n*-heksan : etilasetat (7:3)

Fase Diam : Silika gel 60 F 254

## 5. Uji Aktivitas Antibakteri

### a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan menggunakan oven dengan suhu 170°C selama 2 jam, media *Mac Conkey* disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sedangkan ose dan pinset disterilkan dengan menggunakan bunsen. Pengerjaan uji mikrobiologi dilakukan secara aseptis di dalam LAF yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol 70%, lalu lampu UV dinyalakan selama 15 menit.

### b. Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin. Siprofloksasin yang digunakan untuk pengujian adalah 5 µg/ml dengan konsentrasi 5 µg/ml untuk satu cakram kertas. Untuk memperoleh larutan uji tersebut, maka sebanyak 1 ml sediaan siprofloksasin 2 mg/ml dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml, kemudian ditambahkan air suling hingga volume mencapai 10 ml. Selanjutnya diambil 1 ml dan dimasukkan pada labu takar dan ditambahkan air suling hingga volume 10 ml. Diambil lagi 1 ml dan dimasukkan pada gelas ukur dan ditambahkan air suling hingga volume 4 ml.

### c. Pembuatan Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan, yaitu campuran air suling dan tween 80.

**d. Pembuatan Larutan Uji**

Larutan uji dibuat variasi konsentrasi 5%, 10%, 25%, 50%, dan 75% v/v. Sebelumnya masing-masing ekstrak ditambahkan tween 80 10% b/v. Ekstrak etilasetat dan *n*-heksan daun *J. curcas* dibuat larutan induk dengan konsentrasi 75% dengan cara melarutkan 7,5 gram masing-masing ekstrak dengan air suling hingga volume 10 ml. Untuk membuat konsentrasi 50%, diambil 6,7 ml dari konsentrasi 75% dan ditambahkan air suling sampai 10 ml. Konsentrasi 25%, diambil dari 5 ml konsentrasi 50% yang ditambahkan air suling sampai 10 ml. Konsentrasi 15% , diambil dari 6 ml konsentrasi 25% yang ditambahkan air suling sampai 10 ml. Konsentrasi 5%, diambil dari 3,3 ml konsentrasi 15% yang ditambahkan air suling sampai 10 ml.

**e. Pembuatan Media Agar**

Media agar yang digunakan berasal dari *Mac Conkey* yang dilarutkan dalam air suling. Sebanyak 20 gram serbuk agar *Mac Conkey* dilarutkan dalam 385 ml air suling. Selanjutnya dimasukkan ke dalam alat gelas dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Kemudian media *Mac Conkey* tersebut dituangkan pada cawan petri dalam kondisi aseptik dalam *Laminar Air Flow* dan ditunggu hingga mengeras.

**f. Preparasi Bakteri**

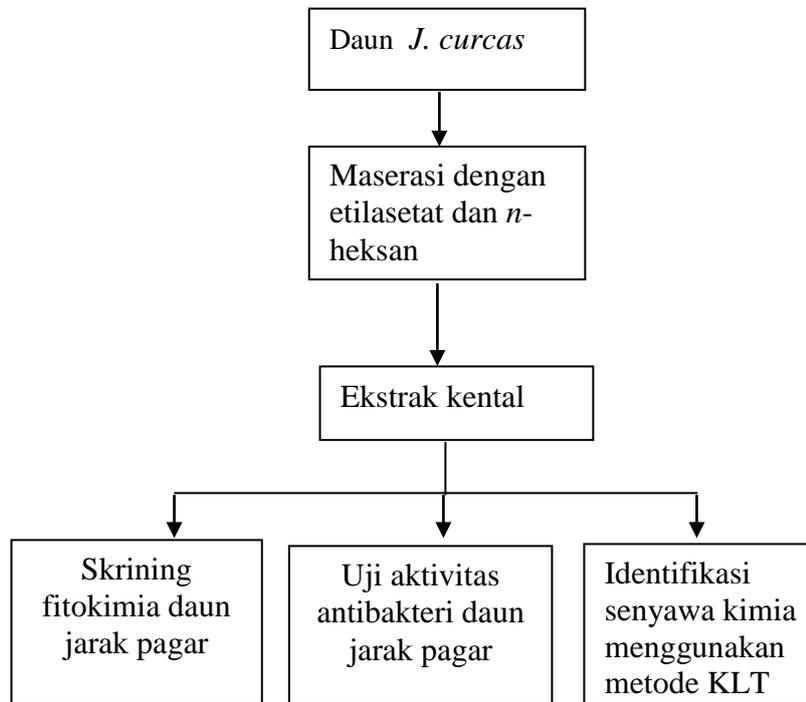
Bakteri *Shigella flexneri* diambil dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 mL larutan NaCl steril

0,9%. Kekeruhan yang diperoleh kemudian disetarakan dengan standar *Mc Farland* 0,5 dengan bantuan spektrofotometer dengan absorbansi 0,08-0,1 yaitu setara dengan jumlah pertumbuhan  $1,5 \times 10^8$  sel bakteri/mL. Setelah itu larutan suspensi bakteri tersebut diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan dengan menggunakan nutrisi BHI dengan perbandingan 1 : 9 sambil dihomogenkan dengan vortek.

**g. Uji Daya Antibakteri**

Suspensi bakteri yang terbentuk kemudian diusap secara merata pada cawan petri yang telah berisi media padat *Mac Conkey*. Selanjutnya cakram kertas berdiameter 6 mm yang steril direndam selama 10-15 di dalam masing-masing ekstrak dengan konsentrasi 75%, 50%, 25%, 15% dan 5%. Sebagai kontrol positif digunakan siprofloksasin 5µg/disk, kontrol negatif yang digunakan adalah air suling, tween 80, dan campuran air suling dan tween 80 10% ditempelkan pada permukaan media agar. Perlakuan ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Selanjutnya diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Hasilnya dapat dilihat dengan terbentuknya diameter hambatan (DZI) di sekitar cakram kertas dan diukur menggunakan jangka sorong. Selanjutnya diameter hambatan dari masing-masing ekstrak dengan variasi konsentrasi tersebut dibandingkan dengan diameter hambatan yang terbentuk pada kontrol positif dan kontrol negatif.

## G. Skema Langkah Kerja



**Gambar 1.** Skema penelitian

## H. Analisis Data

### 1. Analisis Kandungan Kimia Metode KLT

Analisis kandungan senyawa aktif dari ekstrak daun *J. curcas* dilakukan dengan cara membandingkan kesesuaian warna bercak dan harga Rf antara ekstrak daun *J. curcas* dan senyawa yang timbul setelah dilakukan elusi pada plat KLT.

### 2. Analisis Data Uji antibakteri

Penentuan aktivitas daya hambat antimikroba mengacu pada tabel kategori kekuatan aktivitas antibakteri. Data hasil pengukuran diameter zona hambat dibandingkan dengan Tabel 1.

**Tabel 1.** Klasifikasi Respon Zona Hambat Bakteri.

<b>Diameter zona hambat</b>	<b>Respon hambatan pertumbuhan</b>
> 20 mm	Kuat
16 - 20 mm	Sedang
< 15 mm	Lemah

(Greenwood, *et al.*, 2003)