

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Proses ekstraksi biji *C. moschata* dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY, determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM, uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi FKIK UMY dan uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY. Penelitian dilakukan selama lima bulan dari bulan Januari hingga bulan Mei 2016.

C. Variabel Penelitian

1. Uji aktivitas antioksidan
 - a. Variable bebas : Konsentrasi ekstrak etil asetat biji labu kuning.
 - b. Variable tergantung : Nilai persen inhibisi.
 - c. Variable terkendali : Sistem spektrofotometri UV-VIS.
2. Uji aktivitas antibakteri
 - a. Variable bebas : Konsentrasi ekstrak etil asetat biji labu kuning.
 - b. Variable tergantung : Nilai DZI masing-masing konsentrasi ekstrak etil asetat biji labu kuning.
 - c. Variable terkendali : Media pertumbuhan bakteri.

D. Defenisi Operasional

1. IC₅₀

Nilai IC₅₀ pada uji aktivitas antioksidan adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak etil asetat biji labu kuning ($\mu\text{g/ml}$) yang mampu menghambat 50% oksidasi yang didapatkan dengan menghitung nilai persen inhibisi ekstrak etil asetat biji labu kuning. Ekstrak etil asetat biji *C. moschata* menunjukkan aktivitas antioksidan sangat kuat apabila IC₅₀ yang dihasilkan kurang dari 50 $\mu\text{g/ml}$ dan memiliki aktivitas yang lemah apabila IC₅₀ yang dihasilkan lebih dari 150 $\mu\text{g/ml}$.

2. KHM

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimum ekstrak etil asetat biji *C. moschata* yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 yang ditunjukkan melalui pengukuran DZI.

3. DZI

Diameter Zona Inhibisi (DZI) adalah diameter yang menunjukkan hambatan suatu senyawa antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 dan dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

E. Instrumen Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4 dan Table 5.

Tabel 4. Alat-alat yang digunakan

No	Nama Alat	Sumber/Merek dan Tipe
1	Bejana	Stainless steel
2	Blender	HB Stainless®
3	<i>Rotary evaporator</i>	Heidolph®
4	Penangas	Akebonno®
5	Penggaris	<i>Brand</i> ®
6	Oven	Shimadzu®
7	Inkubator	Memmert®
8	Autoklaf	All American®
9	Propipet	Glasfirn®
10	Mikropipet	Gilson®
11	Timbangan analitik	Casbee®
12	Alat-alat gelas	Pyrex®
13	Kertas label	<i>Brand</i> ®
14	<i>Centrifuge</i>	Digisystem Laboratory instrument®
15	<i>Laminar Air Flow</i>	Mascotte®
16	Spektrofotometri UV-VIS	Hitachi® U-2810 Model : 122-000
17	Kapas lidi	-
18	Ose steril	-
19	<i>Paper disc</i>	-
20	Pinset	-

Tabel 5. Bahan-bahan yang digunakan

No	Nama Bahan	Sumber/Merek Tipe
1	Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	FNCC 0047
2	Etanol <i>Pro Analisis</i>	Merck
3	Etanol Teknis 70%	Bratachem
4	NaCl 0.9%	Merck
5	Etil asetat	Merck
6	Media <i>Nutrient Agar</i>	Merck
7	<i>Brain Heart Infus</i>	Merck
8	Aquades	Bratachem
9	Serbuk DPPH	Universitas Ahmad Dahlan
10	Kloroform	Merck
11	Asam sulfat	Bratachem
12	Asam klorida	Bratachem
13	Tetrasiklin	Kapsul 250 mg
14	Biji Labu kuning	Salatiga Jawa Tengah
15	Pereaksi dragendorff	Mediss
16	Pereaksi mayer	Mediss

F. Langkah Kerja

1. Pembuatan Ekstrak

Biji *C. moschata* ditumbuk terlebih dahulu untuk memperkecil ukuran simplisia, kemudian diserbuk halus menggunakan *blender*. Serbuk yang telah diperoleh sebanyak 100 gram kemudian dimaserasi selama 5 hari menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 750 ml. Maserat kemudian disaring menggunakan kain flanel dan kertas saring hingga benar-benar jernih. Ampasnya diremaserasi selama 2 hari menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 250 ml. Sesekali maserat diaduk agar homogen dan tersari sempurna. Ekstrak cair yang telah diperoleh kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 90 rpm (Depkes RI, 1986).

2. Skrining Fitokimia

a. Senyawa Alkaloid

Sebanyak 3 tetes asam sulfat 2 N diteteskan ke dalam sejumlah sampel pada tabung reaksi 1 dan tabung reaksi 2. Kedua tabung kemudian ditambahkan pereaksi dragendorff sebanyak 3 tetes pada tabung reaksi 1 dan pereaksi mayer sebanyak 3 tetes pada tabung reaksi 2. Terbentuknya endapan jingga pada tabung reaksi 1 dan endapan putih kekuningan pada tabung reaksi 2 menunjukkan ekstrak etil asetat biji labu kuning positif mengandung senyawa alkaloid (Nurjanah, dkk., 2011).

b. Senyawa Steroid/Triterpenoid

Sebanyak 0,5 gram sampel dilarutkan dalam dua ml kloroform pada tabung reaksi. Larutan sampel kemudian ditambahkan 10 tetes anhidrida asetat dan tiga tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna merah setelah didiamkan beberapa saat menunjukkan positif mengandung senyawa triterpenoid dan larutan berubah warna menjadi hijau atau biru menunjukkan positif mengandung senyawa steroid (Nurjanah, dkk., 2011).

c. Senyawa Saponin

Sebanyak 0,5 gram sampel dilarutkan dengan 5 ml aquades kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok secara vertikal. Terbentuknya busa pada tabung reaksi dan busa tidak hilang setelah penambahan HCl 2 N menunjukkan ekstrak etil asetat biji labu kuning positif mengandung senyawa saponin (Harbourne, 1987).

d. Senyawa Fenol Hidrokuinon

Sebanyak 1 gram sampel diekstrak dengan 20 ml etanol 70%. Ekstrak yang diperoleh diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan FeCl_3 5% sebanyak 3 tetes. Hasil positif mengandung senyawa fenol hidrokuinon apabila terjadi perubahan warna hijau pada larutan sampel (Nurjanah dkk., 2011).

3. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH 0,4 mM
 - a. Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

Sebanyak 3,9 mg serbuk DPPH ditimbang menggunakan timbangan analitik (Sartorius) dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda.
 - b. Pembuatan Larutan Induk Sampel

Sebanyak 25 mg ekstrak etil asetat biji *C. moschata* ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml. Sampel kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda sehingga didapatkan konsentrasi 1 mg/ml.
 - c. Pembuatan Seri Konsentrasi

Seri konsentrasi ekstrak etil asetat biji *C. moschata* (100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml) dibuat dengan sistem pengenceran yaitu dari larutan induk konsentrasi 1 mg/ml diambil 5 ml, 7,5 ml, 10 ml dan 12,5 ml, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml. Larutan sampel dalam labu ukur 25 ml kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda.
 - d. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Sebanyak 5 ml etanol p.a ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0,4 mM.
 - e. Pembuatan Larutan Blanko

Sebagai blanko digunakan larutan sampel masing-masing konsentrasi
 - f. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum

Sebelum penetapan panjang gelombang maksimum, spektrofotometri UV-VIS dikalibrasi terlebih dahulu. Sebanyak 3 ml larutan kontrol negatif dibaca panjang gelombang maksimum pada spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 200 sampai 800 nm.

- g. Larutan sampel dibaca absorbansinya pada spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan (515 nm) (Sumarny, dkk., 2014).

4. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram

a. Pembuatan Media

Serbuk *Nutrient Agar* (NA) ditimbang sebanyak 2,8 gram kemudian dicampur dengan 100 ml aquades di dalam Erlenmeyer. Serbuk media NA yang telah dicampur kemudian diaduk menggunakan stirer di atas *hotplate* hingga larut. Perlakuan yang sama juga dilakukan untuk media BHI yaitu dengan ditimbang 0,8 gram BHI kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquades. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Pelczar, 2005).

b. Pembuatan Kertas Cakram

Potongan kertas cakram dibuat 6 mm menggunakan kertas saring *Whatman. Paper disc* diletakan dalam cawan petri kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. *Paper disc* yang telah steril kemudian direndam dengan larutan sampel, tetrasiklin 0,2 mg/ml, aquades dan campuran aquades-tween 80 2,5% selama 3 menit.

c. Optimasi Emulgator

Sebanyak 250 mg ekstrak ditimbang kemudian ditambahkan emulgator (tween 80 2,5%, span 80 2,5%, PEG 400 2,5%, campuran tween dan span 80 2,5%) kemudian ditambah dengan 5 ml aquades. Larutan yang telah dicampur dihomogenkan kemudian ditunggu beberapa saat. Emulgator yang paling baik dalam mencampurkan ekstrak etil asetat biji labu kuning dan aquades akan dipilih untuk pengujian aktivitas antibakteri (Maryati, dkk., 2007).

d. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum dilakukan uji antibakteri, alat dan bahan disterilisasi terlebih dahulu. Alat-alat gelas dicuci dan dimasukkan ke dalam oven selama 2 jam pada suhu 170°C. Ose dan pinset dipanaskan dengan bunsen saat penggunaan. Media NA dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C, aquades disterilkan dengan penangas hingga mendidih selama 15 menit. Bahan-bahan yang telah dibuat diletakan pada *Laminar Air Flow* (LAF) horizontal untuk menghindari kontak dengan bakteri di dalam laboratorium.

e. Pembuatan Larutan Uji

Sebanyak 2 g ekstrak dilarutkan dalam 10 ml aquades (larutan induk konsentrasi 20%). Seri konsentrasi (2%, 5%, 10% dan 20%) dibuat dengan sistem pengenceran yaitu diambil 2 ml dari larutan induk kemudian ditambahkan aquades steril sebanyak 20 ml (2%), 8 ml (5%) dan 4 ml (10%).

Kontrol positif yang digunakan adalah tetrasiklin 0,2 mg/ml dibuat dengan melarutkan 250 mg tetrasiklin dalam 250 ml aquades (1 mg/ml) kemudian

diambil 2 ml dari konsentrasi 1 mg/ml ditambahkan dengan aquades sampai 10 ml. Kontrol negatif yang digunakan adalah campuran tween 80 2,5% - aquades dan aquades. Pembuatan kontrol negatif yaitu sebanyak 200 mg tween 80 ditimbang kemudian ditambah 8 ml aquades.

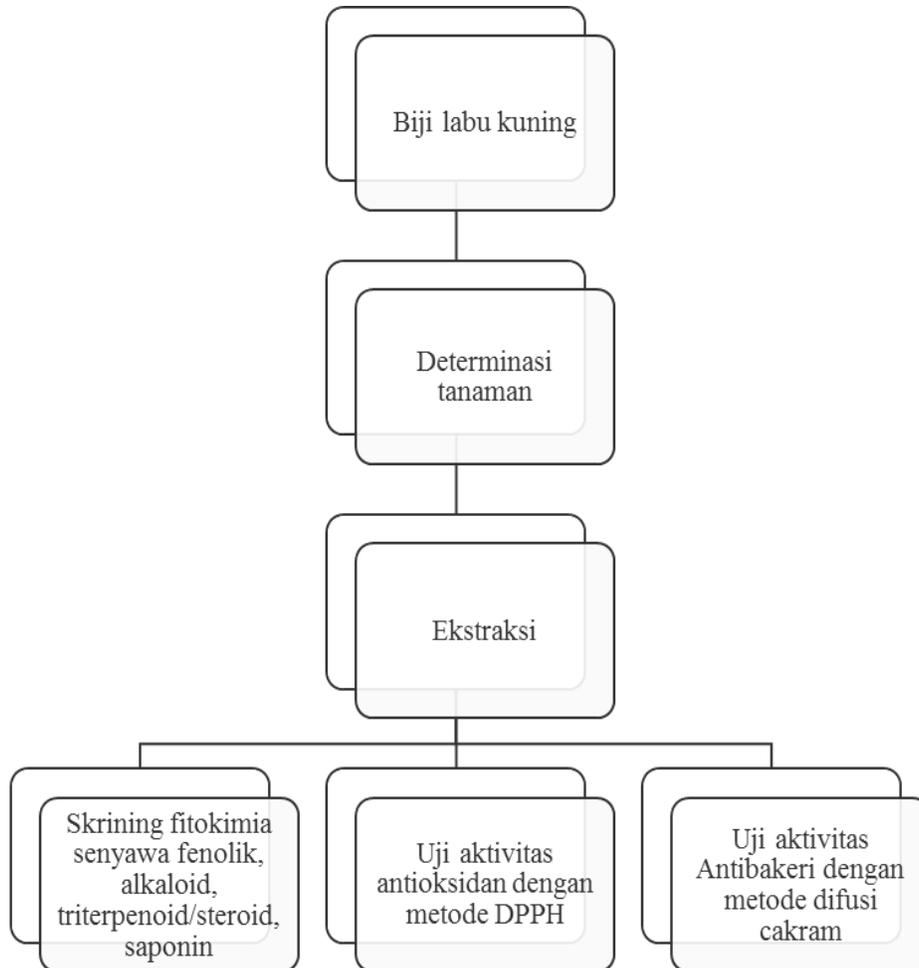
f. Pembuatan Suspensi Bakteri

Sebanyak satu ose koloni bakteri diinokulasikan ke dalam media BHI kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 30°C selama dua sampai empat jam. Suspensi bakteri kemudian diencerkan menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan sel 10^6 yaitu dengan mengambil sebanyak 1 ml suspensi bakteri 10^8 sel/ml dimasukan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml BHI kemudian divortex dan dihasilkan suspensi bakteri 10^7 sel/ml. Kemudian 1 ml dari suspensi bakteri 10^7 diambil dimasukan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml BHI. Tabung reaksi divortex dan dihasilkan suspensi bakteri 10^6 sel/ml (Lopez, 2003).

g. Uji Daya Antibakteri

Kertas cakram yang telah direndam larutan sampel dengan berbagai konsentrasi diletakan diatas media NA dalam cawan petri yang telah diolesi bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. Cawan petri yang telah berisi bahan uji diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C dan dilakukan pengamatan zona bening yang terbentuk pada cawan petri. Zona bening diukur lebar daerah inhibisi menggunakan penggaris dengan satuan milimeter (mm).

G. Skema Langkah Kerja



Gambar 11. Skema langkah kerja penelitian

H. Analisis Data

1. Persen rendemen ekstrak etil asetat biji *C. moschata* dihitung menggunakan persamaan 1:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \quad (1)$$

2. Persen inhibisi dihitung menggunakan persamaan 2

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100 \quad (2)$$

Kemudian dibuat regresi linier untuk mendapatkan nilai IC_{50} menggunakan persamaan 3:

$$Y = Bx + A \quad (3)$$

Keterangan:

$Y = 50$, $B = \text{Slope}$, $X = \text{Nilai } IC_{50}$, $A = \text{intersep}$

3. DZI dihitung menggunakan persamaan 4:

$$DZI = (\text{Diameter zona bening} - \text{diameter } \textit{paper disc}) \quad (4)$$

Rata-rata DZI dihitung menggunakan persamaan 5

$$\frac{DZI \text{ replikasi 1} + DZI \text{ replikasi 2} + DZI \text{ replikasi 3}}{3} \quad (5)$$

4. Uji antibakteri dianalisis menggunakan uji *One way* ANOVA, dilanjutkan uji Tukey.

