

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik secara *in vitro* pada bakteri, serta uji antioksidan dengan metode DPPH.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta serta Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada pada bulan Januari 2015 hingga bulan Maret 2016.

C. Subyek dan Sampel

Subyek dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 untuk uji aktivitas antibakteri. dan untuk uji aktivitas antioksidan menggunakan serbuk DPPH. Sedangkan sampel yang dipakai adalah biji *C. moschata* yang diperoleh dari daerah Salatiga. Biji *C. moschata* telah melalui proses sortir basah hingga pengeringan.

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a. Uji Aktivitas Antioksidan

- 1) Variabel Bebas : Seri konsentrasi fraksi kloroform biji *C. moschata*.
- 2) Variabel Tergantung : Persentase Inhibisi
- 3) Variabel Terkendali : Sistem spektrofotometri UV-VIS, suhu dan waktu inkubasi

b. Uji Aktivitas Antibakteri

- 1) Variabel Bebas : Konsentrasi fraksi kloroform biji *C. moschata*
- 2) Variabel Tergantung : Nilai DZI
- 3) Variabel Terkendali : Media pertumbuhan bakteri

2. Definisi Operasional

- a. Harga Rf adalah jarak yang ditempuh oleh senyawa uji pada plat KLT yang akan dibandingkan dengan Rf dari senyawa standar
- b. Nilai IC_{50} pada uji antioksidan adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* ($\mu\text{g/ml}$) yang mampu menghambat 50% oksidasi. Angka IC_{50} diperoleh dari kurva hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan persentase inhibisi.
- c. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditunjukkan melalui pengukuran DZI.
- d. Diameter Zona Inhibitor (DZI) adalah diameter yang menunjukkan hambatan suatu senyawa antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm)

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan untuk ekstraksi biji *C. moschata* adalah biji labu kuning (*Cucurbita moschata Duch Poir*), etanol 70% (Merck), aquades (General Labora), kloroform (Merck), toples kaca, *blender*, kain flanel, kertas saring (Whatman), timbangan analitik (Mettler Toledo AL204), alat-alat gelas (Pyrex), corong gelas,

corong pisah, seperangkat alat evaporator (IKA RV10), wajan, pengaduk dan aluminium foil (Brand).

Alat dan bahan untuk uji Kromatografi Lapis Tipis adalah plat silika gel 60 F₂₅₄ (Merck), plat selulosa (Merck), oven, butanol (Bratachem), asam asetat, air, kloroform (Merck), metanol, rutin, kuinin, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), alat penyemprot, pereaksi dragendroff dan FeCl₃, bejana kromatografi dan pipa kapiler.

Alat dan Bahan untuk uji aktivitas antibakteri dan antioksidan adalah alat-alat gelas (Pyrex), spektrofotometri UV-VIS (Shimadzu), *Laminar Air Flow* (LAF), ose, kertas saring (Whatman), autoklaf, bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata*, etanol 70% (merck), tetrasiklin HCL (Supertetra), NaCl 0,9% fisiologis, media *Trypticase Soy Agar* (TSA), *Brain Heart Infusion* (BHI), Aquades, serbuk DPPH (Allorich).

F. Prosedur Kerja

1. Determinasi Bahan Uji

Determinasi bahan uji dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

2. Pembuatan Bahan Uji

Biji *C. moschata* disortasi dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C kemudian dihaluskan dengan ditumbuk dan *diblender* untuk mendapatkan serbuk *C. moschata*. Sebanyak 500 gram biji *C. moschata* dimasukkan ke dalam toples kaca untuk dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% sampai volume 2,5 liter dan diaduk sampai benar-benar tercampur dan ditutup dengan aluminium foil.

Larutan didiamkan 3-5 malam kemudian dilakukan penyaringan dan diremaserasi. Maserat yang diperoleh difraksinasi menggunakan pelarut kloroform dalam corong pisah dengan perbandingan 1:1. Corong ditutup dan digoyang dengan kuat untuk membuat dua fase larutan tercampur. Corong dibalik dan keran dibuka untuk melepaskan tekanan uap yang berlebihan kemudian didiamkan agar pemisahan antara dua fase berlangsung. Penyumbat dan kran corong dibuka dan dua fase larutan dipisahkan dengan mengontrol kran corong. Terakhir didapatkan fraksi kloroform biji *C. moschata*. Fraksi kloroform biji *C. moschata* di evaporasi menggunakan evaporator dan diuji Kromatografi Lapis Tipis untuk identifikasi senyawa aktif di dalamnya.

3. Identifikasi Senyawa Aktif

Identifikasi senyawa aktif dalam fraksi kloroform biji *C. moschata* dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. Plat silika gel 60 F₂₅₄ dan plat selulosa disiapkan dengan ukuran panjang 10 cm dan lebar yang disesuaikan dengan jumlah fraksi yang akan ditotolkan. Pada bagian atas dan bawah diberi garis batas dengan jarak 1 cm dari ujung tepi lempeng tipis dengan menggunakan pensil. Sampel ditotolkan dengan pipa kapiler pada garis batas bagian bawah. Untuk identifikasi senyawa alkaloid dan flavonoid *chamber* diisi dengan eluen butanol : asam asetat : air dengan perbandingan 4 : 1 : 5 untuk mengelusi lempeng tipis kemudian dibiarkan beberapa saat dengan kondisi tertutup hingga *chamber* tersebut jenuh dengan uap eluen (Anggraini, 2008). Lempeng tipis dimasukkan ke dalam *chamber* hingga bagian bawahnya tercelup ke dalam eluen. Lempeng tipis diletakkan tegak bersandar pada dinding *chamber*. Eluen dibiarkan naik hingga

mencapai garis batas bagian atas. Lempeng diangkat dengan menggunakan pinset lalu dibiarkan kering di udara terbuka. Noda pada lempeng tipis diamati di bawah sinar UV, dan apabila tidak terlihat maka dilakukan penyemprotan dengan pereaksi dragendorff dan FeCl_3 .

4. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM

Sebanyak 15,77 mg serbuk DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam metanol hingga 100 mL. Larutan dijaga pada suhu ruang dan terlindungi dari cahaya. (Sumarny *et al.*, 2014)

b. Pembuatan larutan induk

Sebanyak 40 mg fraksi kloroform biji *C. moschata* dilarutkan dalam metanol hingga 40 mL sehingga didapatkan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Larutan ekstrak dibuat dalam beberapa seri konsentrasi yaitu 100 $\mu\text{g/mL}$; 200 $\mu\text{g/mL}$; 300 $\mu\text{g/mL}$ dan 400 $\mu\text{g/mL}$.

c. Penentuan panjang gelombang maksimal

Sebanyak 1 mL larutan DPPH dicampurkan dalam 5 mL metanol kemudian digojog. Tiga ml larutan dimasukkan ke dalam kuvet dan disiapkan kuvet berisi metanol sebagai blanko. Pembacaan panjang gelombang dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 200-800 nm. (Musfiroh dan Syarief, 2009)

d. Pengujian antiradikal bebas dengan DPPH

Sebanyak 5 mL larutan sampel dalam metanol dengan variasi konsentrasi 100, 200,300 dan 400 $\mu\text{g/mL}$ dicampurkan dengan 1 mL larutan DPPH, kemudian

campuran *divortex* dan didiamkan selama 30 menit. Absorbansinya diukur pada λ maks 515 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS.

Kekuatan inhibisinya dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Kekuatan Inhibisi} = \frac{\text{Abskontrol} - \text{AbsSampel}}{\text{Abskontrol}} \times 100\%$$

Data hasil penelitian yang diperoleh dibuat kurva hubungan antara konsentrasi larutan uji dengan % inhibisi dan ditentukan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menyatakan aktivitas antioksidan suatu bahan uji dengan metode peredaman radikal bebas DPPH. Nilai IC_{50} dihitung dari persentase penghambatan serapan larutan ekstrak dengan menggunakan persamaan yang diperoleh dari kurva regresi linier. (Molyneux, 2004)

5. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Proses sterilisasi disesuaikan dengan alat yang digunakan. Alat-alat gelas (pyrex) disterilkan dengan dimasukkan ke dalam oven pada suhu 170°C selama 2 jam, ose dan pinset dipanaskan dengan bunsen hingga memijar. Medium agar TSA disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Aquades disterilkan dengan cara dimasukkan ke dalam bejana yang berisi air di atas penangas air hingga mendidih selama 15 menit. Selain itu, LAF juga disterilisasi dengan sinar UV selama 30 menit.

b. Pembuatan stok bakteri

Bakteri uji diinokulasi pada medium *Nutrient Agar* (NA) dengan cara menggosokkan bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 menggunakan jarum ose

pada permukaan agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. (Wulandari, 2011)

c. Pembuatan media pertumbuhan

Media yang digunakan adalah TSA, dibuat dengan cara 46,7 gram serbuk TSA dimasukkan ke dalam tabung dan dilarutkan dengan 1 liter aquades steril sampai homogen, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL kemudian dibiarkan hingga memadat. (Hudzicki, 2013)

d. Pembuatan suspensi bakteri

Dua koloni bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 diambil kemudian dimasukkan ke dalam larutan NaCl 0,9% fisiologis steril sebanyak 1 mL. Suspensi didiamkan selama 2-3 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, bakteri yang telah diinkubasi diambil 1 mL kemudian dimasukkan dalam 9 mL *Brain Heart Infusion* (BHI) cair. Suspensi sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10^8 CFU/mL. (Sutton, 2011)

e. Pembuatan kontrol positif

Kontrol positif pada penelitian ini dibuat dari sediaan tetrasiklin 250 mg. Untuk menghasilkan larutan uji dengan konsentrasi 0,2 mg/mL maka sebanyak 1 kapsul sediaan tetrasiklin 250 mg dilarutkan dengan 100 mL aquades steril. Kemudian dibuat konsentrasi 0,02 % (0,2 mg/mL) dengan melarutkan 0,4 ml tetrasiklin ad aquades sampai 5 mL. (Mulyani dan Sarjono, 2007)

f. Pembuatan kontrol negatif

Kontrol negatif yang digunakan adalah larutan DMSO.

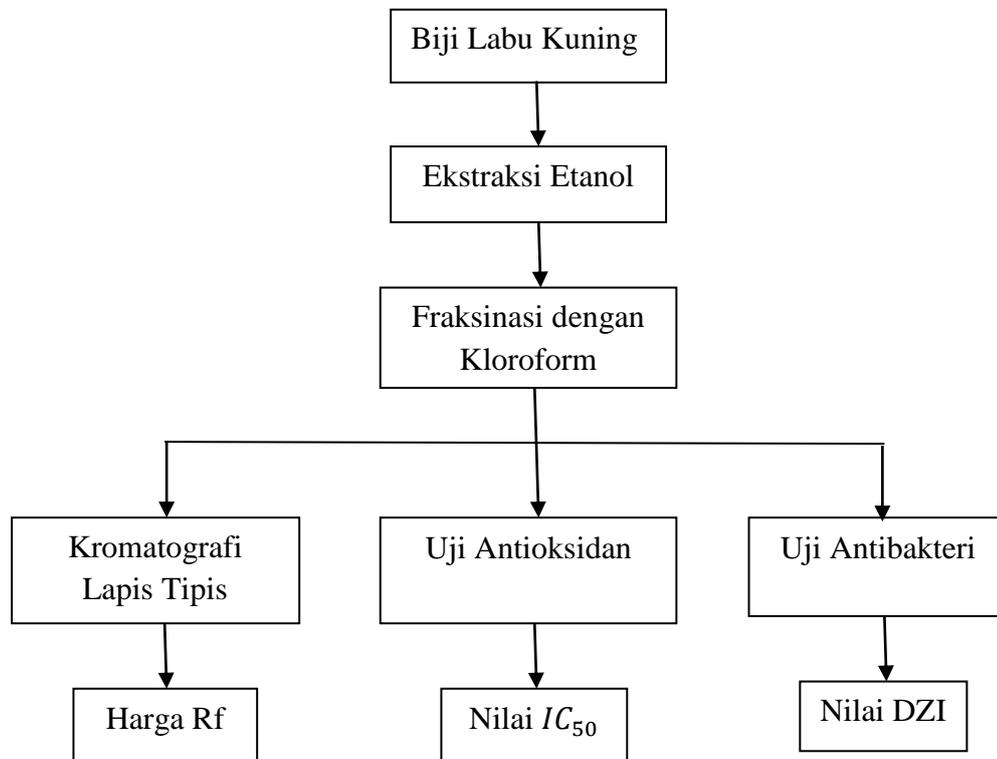
g. Pengujian aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram dengan cara membuat larutan induk dengan konsentrasi 50% (0,5 g ekstrak + 1 mL DMSO) kemudian dilakukan pengenceran menjadi beberapa seri konsentrasi. Tujuh tabung reaksi disiapkan yang masing-masing berisi konsentrasi fraksi kloroform biji labu kuning yang berbeda, antara lain:

1. Tabung I berisi 5% (0,5 mL konsentrasi 10% + 0,5 mL DMSO)
2. Tabung II berisi 10% (0,5 mL konsentrasi 25% + 0,75 mL DMSO)
3. Tabung III berisi 25% (0,5 mL konsentrasi 50% + 0,5 mL DMSO)
4. Tabung IV berisi 50% (0,5 g ekstrak + 1 mL DMSO)
5. Tabung V kontrol positif
6. Tabung VI kontrol negatif
7. Tabung VII berisi suspensi bakteri yang akan diusapkan ke medium TSA.

Paper disc direndam ke dalam tabung I – VI selama 15 menit. Dengan menggunakan kapas lidi, suspensi bakteri diusap ke permukaan media secara merata. *Paper disc* yang telah direndam diletakkan di atas media pertumbuhan bakteri yang telah diberi tanda pada masing-masing konsentrasi dan pada kontrol, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan penggaris.

G. Skema Langkah Kerja



Gambar 4. Skema langkah kerja

H. Analisis Data

a. Identifikasi Senyawa dengan KLT

Hasil KLT diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Noda yang terbentuk kemudian dihitung nilai Rf nya.

b. Uji Aktivitas Antioksidan

Nilai IC_{50} dihitung berdasarkan kekuatan inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing- masing konsentrasi ekstrak dengan persamaan :

$$\text{Kekuatan Inhibisi} = \frac{\text{Abskontrol} - \text{AbsSampel}}{\text{Abskontrol}} \times 100\%$$

Setelah diperoleh persentase inhibisi masing-masing konsentrasi, dibuat sebuah kurva regresi linier antara konsentrasi ekstrak dan kekuatan inhibisi (%) sehingga diperoleh persamaan $y = bx + a$ dimana x adalah konsentrasi ekstrak ($\mu\text{g/ml}$) dan y adalah kekuatan inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibitor Concentration* (IC_{50}) yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x dengan $y=50$ (Molyneux, 2004).

Tabel 1. Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH (Ariyanto, 2006)

Intensitas	Nilai IC_{50}
Sangat kuat	$< 50\mu\text{g/ml}$
Kuat	50-100 $\mu\text{g/ml}$
Sedang	101-150 $\mu\text{g/ml}$
Lemah	$> 150 \mu\text{g/ml}$

c. Uji Aktivitas Antibakteri

Nilai DZI dihitung dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata*. Hasil kemudian dibandingkan dengan kontrol positif yaitu tetrasiklin.

Menurut Davis dan Stout (1971), kriteria kekuatan daya antibakteri sebagai berikut:

Tabel 2. Tingkat kekuatan daya antibakteri menurut Davis dan Stout (1971)

Kekuatan	Diameter Hambat
Lemah	≤ 5 mm
Sedang	5-10 mm
Kuat	10-20 mm
Sangat kuat	> 20 mm

