

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah penelitian Eksperimental laboratoris.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada yang dimulai pada 30 Maret 2015 hingga 19 Juli 2016.

C. Identifikasi variabel penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Uji efektivitas antioksidan
 - i. Variable bebas : Konsetrasi ekstrak etanolik biji labu kuning
 - ii. Variable tergantung : Persen inhibisi
 - iii. Variable terkendali : Sistem spektrofotometri UV-VIS.
- b. Uji efektivitas antibakteri
 - i. Variable bebas : Konsentrasi ekstrak etanolik biji labu kuning
 - ii. Variable tergantung : Nilai Diameter Zona Inhibisi (DZI)
 - iii. Variable terkendali : Media pertumbuhan bakteri

2. Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanolik biji *C. moschata* adalah hasil ekstraksi biji *C. moschata* dengan metode maserasi yang diperoleh dari Salatiga, Jawa Tengah menggunakan etanol 70% sebagai pelarut yang kemudian dipekatkan dengan penguapan (evaporasi).
- b. Nilai IC_{50} pada uji antioksidan adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak etanolik biji labu kuning ($\mu\text{g/ml}$) yang mampu menghambat 50% oksidasi yang diperoleh dengan metode DPPH.
- c. Diameter Zona Inhibisi (DZI) adalah diameter yang menunjukkan hambatan suatu senyawa antibakteri dengan metode difusi cakram terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan pada media TSA yang diuji dan dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

D. Instrumen Penelitian

1. Alat:

Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, bejana, blender (Philips), *waterbath*, timbangan analitik (metler Toledo), alat gelas (pyrex), tabung reaksi (pyrex), pengaduk, aluminium foil (Brand), kertas saring (Whatman), evaporator (IKA RV10), *waterbath*, plat silika 60 GF₂₅₄ (Merck), plat selulosa (Merck), TLC *reagent spray*, pipa kapiler, cawan petri, spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu), *Laminar Air Flow* (LAF), lampu bunsen, ose, oven.

2. Bahan:

Bahan utama yang digunakan antara lain biji labu kuning (*C. moschata*), etanol 70% (Merck), aquadest (General Labora), butanol (Bratachem), asam asetat

(Bratachem), kuinin (General Labora), kuersetin (General Labora), dragendorf (General Labora), amoniak (General Labora), metanol (General Labora), bakteri *Staphylococcus aureus*, tetrasiklin, NaCl 0,9% fisiologis, media *Tryptic Soy Agar* (TSA), *Brain Heart Infusion* (BHI), serbuk DPPH (Alloric).

E. Cara Kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Unit II Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

2. Ekstraksi

Langkah pertama yang dilakukan pada tahap ini adalah sortasi basah yaitu memilah biji *C. moschata* untuk dipisahkan dari biji yang buruk. Biji *C. moschata* yang telah disortir, dicuci bersih kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C. Setelah biji kering, dilakukan sortasi ulang untuk mendapatkan biji *C. moschata* yang berkualitas baik. Langkah selanjutnya adalah pembuatan serbuk dengan cara ditumbuk dan diblender. Serbuk biji *C. moschata* kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk halus.

Serbuk *Cucurbita moschata* yang telah diayak direndam dalam etanol 70% hingga serbuk terendam sepenuhnya dan dilakukan pengadukan secara berkala selama lima hari. Setelah lima hari, dilakukan penyarian dengan menyaring larutan tersebut dengan kain flanel untuk memisahkan senyawa dari maseratnya. Dilakukan maserasi ulang (remaserasi) selama dua hari serta dilakukan pengadukan berkala. Setelah dua hari dilakukan penyarian kembali, dan hasil sarinya disatukan dengan hasil sari maserasi pertama. Langkah terakhir pada tahap

ini dilakukan penyarian kembali menggunakan kertas saring untuk mendapatkan hasil yang lebih jernih.

Dilakukan penguapan pada hasil ekstraksi dengan menggunakan evaporator untuk memisahkan pelarut dari zat aktif yang terkandung (flavonoid dan alkaloid), kemudian dilakukan penguapan kembali menggunakan *waterbath* agar mendapatkan ekstrak kental.

3. Identifikasi Senyawa

Identifikasi senyawa dilakukan dengan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fase gerak yang digunakan pada proses KLT ini adalah larutan BAW (n-butanol : asam asetat : *water*) dengan perbandingan 4 : 1 : 5, fase atas.

- a. Flavonoid : Selulosa sebagai fase diam, kuersetin sebagai baku pembanding, dan larutan amoniak sebagai pereaksi.
- b. Alkaloid : silica gel GF 254 sebagai fase diam, kuinin sebagai senyawa baku pembanding, dan dragendorff sebagai larutan pereaksi.

Dimulai dengan menyiapkan fase diam dan kemudian diberi tanda untuk batas bawah dan batas atas pada plat fase diam. Selanjutnya dilakukan penotolan ekstrak etanolik *C. moschata* dan senyawa baku pembanding pada batas bawah plat KLT secara sejajar. Totolan dibiarkan mengering dan selanjutnya dimasukkan ke dalam bejana yang sebelumnya telah dilakukan penjenuhan dengan fase gerak. Ditunggu hingga pelarut merambat sampai batas atas yang telah ditandai. Setelah itu, angin anginkan plat KLT agar fase gerak menguap dan kemudian amati plat KLT di bawah cahaya ultraviolet. Untuk memperjelas bercak pada plat KLT

dilakukan penyemprotan dengan masing-masing larutan pereaksi (Christinawati, 2007).

4. Uji Aktifitas Antioksidan

a. Pembuatan larutan DPPH

DPPH Kristal ditimbang 15,77 mg dan dilarutkan dengan 100 ml metanol sehingga mendapat kadar 0,4 mM untuk segera digunakan. Larutan dijaga pada suhu ruang dan terlindungi dari cahaya.

b. Penetapan panjang gelombang maksimal

Sebagai kontrol negatif adalah 5 ml metanol dan 1 ml larutan DPPH 0,4 mM yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan divortex hingga tercampur. Metanol sebagai larutan blanko dimasukkan sebanyak 3 ml ke dalam kuvet, dan dibaca absorbansinya pada spektrofotometri UV-VIS. Dimasukkan kontrol negatif sebanyak 3 ml. Kemudian ditentukan panjang gelombang maksimum DPPH dan kemudian dibaca absorbansinya.

c. Uji daya antioksidan

Ekstrak etanolik biji *C. moschata* yang diperoleh dibuat seri kadar 25µg/ml, 50µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 125 µg/ml, 150 µg/ml sebanyak 5 ml ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM dalam metanol. Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit (*operating time*).

Selanjutnya seri kadar biji *C. moschata* diukur dan dilakukan pengamatan absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang

didapatkan. Pengujian dilakukan dengan 3 kali replikasi. Besarnya aktifitas antioksidan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi sampel})}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100\%$$

d. Perhitungan IC₅₀

Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier menggunakan persamaan $Y = A + BX$, dimana X adalah konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) dan Y adalah persentase inhibisi (%). Aktifitas antioksidan dinyatakan dengan harga IC₅₀ yaitu konsentrasi sampel dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai harga IC₅₀ didapatkan dari nilai X setelah mengganti Y dengan 50 (Molyneux, 2004).

5. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Pembuatan media pertumbuhan

Media yang digunakan adalah TSA (*Tryptic Soy Agar*), dibuat dengan cara: 45,7 g serbuk TSA dituangkan ke dalam 1 L aquades mendidih pada labu Erlenmeyer, kemudian diaduk menggunakan *stirer* di atas *hotplate* hingga larut homogen.

b. Sterilisasi alat dan bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu. Untuk alat-alat gelas (pyrex) disterilkan dengan cara dimasukkan kedalam oven pada suhu 170°C selama 2 jam, ose dan pinset dipanaskan dengan Bunsen. Untuk bahan-bahan yang akan digunakan seperti medium agar TSA disterilkan didalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Setelah disterilisasi, semua alat dan bahan disimpan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang sebelumnya sudah disterilisasi dengan lampu UV selama 30 menit dan dibersihkan dengan alkohol 70%.

c. Pembuatan stok bakteri

Bakteri uji diinokulasi pada media agar miring dengan menggoreskan bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan jarum ose pada permukaan agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

d. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri yang telah diinkubasi diambil menggunakan jarum ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9% fisiologis steril sebanyak 1 ml. Kemudian didiamkan selama 2 - 4 jam, selanjutnya ditambahkan dalam 9 ml BHI dan dihomogenkan dengan *vortex*.

e. Pembuatan kontrol positif

Kontrol positif yang digunakan adalah tetrasiklin 0,02% dan ciprofloksasin 0,0005%.

f. Pembuatan kontrol negatif

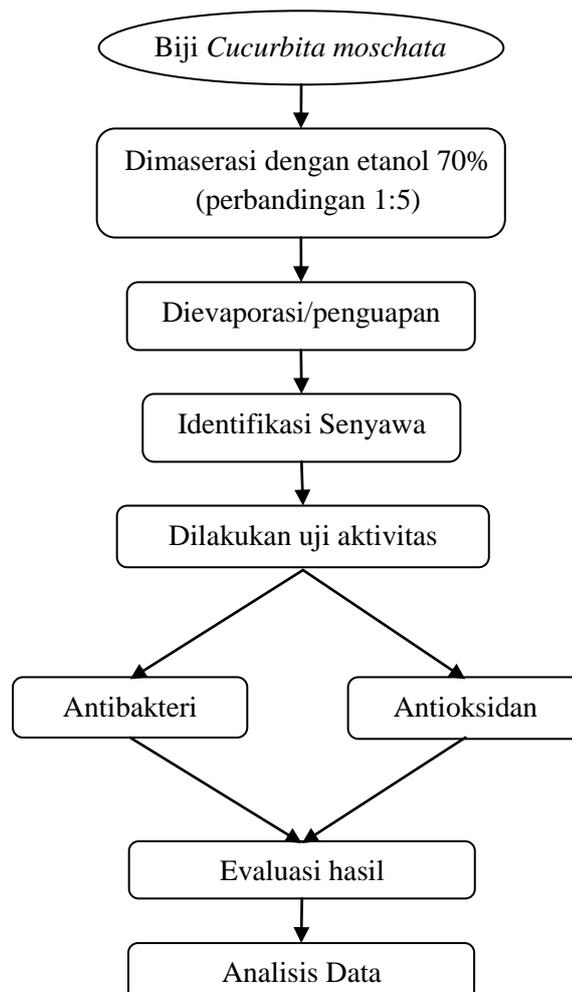
Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO.

g. Pengujian aktivitas antibakteri

Pengujian aktifitas antibakteri, dilakukan dengan membuat seri kadar ekstrak 5%, 10%, 25% dan 50% yang dilarutkan dalam DMSO. Kertas cakram yang telah disterilkan sebelumnya, dimasukkan ke masing - masing seri kadar ekstrak etanolik biji *C. moschata*, kontrol positif dan kontrol negatif selama 15 menit. Suspensi bakteri yang telah dibuat

diusapkan ke permukaan agar TSA dengan menggunakan kapas lidi yang telah disterilkan sebelumnya. Cawan petri yang telah diberi perlakuan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah proses inkubasi kemudian zona diameter hambat pada media TSA diukur menggunakan mistar. Nilai DZI yang telah didapatkan, kemudian dibandingkan dengan kontrol positif (tetrasielin dan ciprofloksasin) serta standar nilai uji antibakteri.

F. Skema Langkah kerja



Gambar 6. Skema langkah kerja

G. Analisis Data

a. Antioksidan

Data persen inhibisi yang diperoleh dituangkan dalam kurva hubungan antara % inhibisi dan konsentrasi sehingga didapatkan persamaan regresi linear $y = ax \pm b$. Persamaan tersebut digunakan untuk didapatkan nilai IC_{50} .

Tabel 1. Standar nilai aktivitas antioksidan (Molyneux, 2004)

Aktivitas Antioksidan	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Sangat kuat	< 50
Kuat	50 – 100
Sedang	100 – 150
Lemah	> 150

b. Antibakteri

Dengan pengukuran diameter zona hambat terhadap bakteri *S. aureus*. Nilai DZI yang telah didapatkan dibandingkan dengan kontrol positif dan standar nilai aktivitas antibakteri.

Tabel 2. Standar nilai aktivitas antibakteri (Davis dan Stout, 1971)

Aktivitas Antibakteri	DZI (mm)
Lemah	< 5
Sedang	5 – 10
Kuat	10 – 20
Sangat kuat	> 20