

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan selama 6 bulan mulai dari bulan Agustus 2023 – Januari 2024 di Laboratorium Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Cenderawasih.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan yaitu: *Autoclave*, batang pengaduk, cawan petri, corong pisah, corong, desikator, erlenmeyer, gelas ukur, gelas beaker, hot plate, inkubator, jarum ose dan tip, jangka sorong, kaca arloji, labu ukur, *laminar air flow*, mikropipet, pembakar bunsen, pinset, pipet tetes, plat tetes, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, *rotary vaccum evaporator*, spatula, spuit, stirer, tabung reaksi, timbangan analitik, vial, *water bath*, blender dan oven.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu serbuk simplisia kulit batang Jabon, Bakteri yang digunakan penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. kontrol positif ciprofloxacin, akuades, kertas saring, kertas cakram, pelarut n-heksan, etil asetat, etanol, tisu, aluminium foil, kertas label, aquades steril, *handscoon*, masker, BaCl_2 1%, H_2SO_4 1%, NaCl 0,9%, media NA.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Pembuatan Simplisia

Sampel kulit batang Jabon yang diperoleh dari Koya Koso. Selanjutnya disortasi basah, dirajang kemudian dicuci untuk menghilangkan kotoran. Kulit batang Jabon dikeringkan menggunakan oven. Setelah kulit batang Jabon kering, kulit batang Jabon dilakukan proses penghancuran dengan alat

penggiling dan serbuk dimasukkan ke dalam plastik kering untuk dilakukan proses ekstraksi.

3.3.2 Ekstraksi

Simplisia ditimbang sebanyak 500 gram kemudian ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 3 sebanyak 2.500 ml. Maserasi dilakukan selama 3×24 jam dengan tiga kali pengulangan. Setiap pengulangan dilakukan penyaringan untuk memisahkan ekstrak etanol dari residunya. Selanjutnya filtrat dan ampasnya dipisahkan, filtrat yang diperoleh dikentalkan/diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Tujuannya adalah agar semua pelarut etanol dapat menguap (Wardani & Rachmania, 2017) dan tersisa senyawa berkhasiat. Setelah pelarutnya menguap dihasilkan ekstrak kental yang dapat berbentuk padatan (solid) atau cairan (liquid) (Nugroho *et al.*, 1999; Suleman, 2019). Ekstrak kental yang dihasilkan kemudian dihitung persentase rendemen terhadap bobot simplisia.

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Ekstrak yang dihasilkan(g)}}{\text{Bobot simplisia (g)}} \times 100\%$$

3.3.3 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan pemisahan senyawa dari ekstrak yang didapat yang dilakukan berdasarkan tingkat kepolaran. Metode fraksinasi yang dilakukan yaitu Ekstraksi Cair-Cair (ECC) dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan air secara sinambung dengan sifat kepolaran pelarut yang berbeda-beda. Fraksinasi dilakukan dengan cara ekstrak kental 15 gram dilarutkan dalam etanol dan air (perbandingan etanol dan air, 1:1) sebanyak 30 ml. Selanjutnya dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu ditambahkan 30 ml n-heksana dan dikocok secara perlahan-lahan. Setelah didiamkan terjadi pemisahan antara fraksi n-heksana dan air. Fraksi n-heksana dipisahkan, dan mengulangi beberapa kali sampai larutan berwarna bening. Fraksinasi dilanjutkan menggunakan etil asetat sebanyak 30 ml dengan proses yang sama pada n-heksana. Fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air

diuapkan. Hasil fraksi dihitung persentase rendemennya terhadap sampel ekstrak yang difraksinasi dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Payung, 2021).

$$\% \text{ Rendemen fraksi} = \frac{\text{Fraksi yang dihasilkan (g)}}{\text{Bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

3.3.4 Uji Bebas Etanol

Ekstrak kulit batang jabon diuji bebas etanol 96% dengan menggunakan uji kualitatif yaitu ekstrak ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat, adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan terjadinya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan (Harborne, 1987).

3.3.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap ekstrak kulit batang jabon dengan menggunakan reagen pendeteksi golongan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan terpenoid. (Putri dkk. 2013).

1. Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak ditimbang 0,5 gram dan ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml akuades, dipanaskan untuk uji alkaloida dan dibagi menjadi 2 tabung reaksi, masing-masing ditambahkan pereaksi Dragendorff dan Mayer. Reaksi positif alkaloid pada penambahan pereaksi Dragendorff ditandai dengan terbentuknya endapan merah bata dan pada pereaksi Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih (Sapri dkk., 2014).

2. Pemeriksaan Flavonoid

Ekstrak ditimbang 0,5 gram dan dilarutkan dengan 10 ml metanol panas, kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk Magnesium dan 5 tetes HCL pekat. Reaksi positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga, merah muda atau merah tua yang tidak hilang dalam waktu 3 menit (Sulistyoningdyah & Ramayani, 2017).

3. Pemeriksaan Saponin

Ekstrak ditimbang 0,5 gram dan ditambahkan 10 ml air panas, kemudian dikocok selama 10 detik. Terbentuknya busa setinggi 1 cm

yang tidak kurang dari 10 menit dengan penambahan asam klorida 2 N menunjukkan adanya reaksi positif saponin (Sulistyoningdyah & Ramayani, 2017).

4. Pemeriksaan Tanin

Ekstrak ditimbang 0,5 gram dan dilarutkan dengan 10 ml aquadest lalu disaring. Hasil filtrat diencerkan dengan aquadest sampai tidak berwarna. Kemudian larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan dengan 1-2 tetes pereaksi FeCl_3 1%. Reaksi positif tannin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehitaman atau hijau kehitaman (Sulistyoni ngdyah & Ramayani, 2017).

5. Pemeriksaan Triterpenoid

Ekstrak ditimbang 0,5 gram dan ditambahkan 20 ml etanol, 2 ml kloroform dan 3 ml H_2SO_4 pekat. Reaksi positif triterpenoid ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah (Sulistyoningdyah & Ramayani, 2017).

3.4 Pengujian Aktivitas Antibakteri

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan. Media pertumbuhan disterilkan di autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan peralatan gelas disterilkan menggunakan oven pada suhu $160-170^\circ\text{C}$ selama 1-2 jam. Sterilisasi dilakukan dengan pembakaran pada nyala bunsen (Simaremare, Ruban and Runtuboi, 2017).

3.4.2 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

Nutrient agar ditimbang sebanyak 28 g kemudian dicampur dengan aquades sebanyak 1000 ml (1 L) dalam gelas ukur. Campuran dipanaskan sampai NA larut dengan air, selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. NA sebanyak 15-20 mL dituang ke dalam cawan petri, dibiarkan sampai memadat, dan siap digunakan (Simaremare, Ruban and Runtuboi, 2017).

3.4.3 Peremajaan Bakteri

Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media agar dengan cara menggores. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji. Koloni bakteri dari media subkultur diambil satu ujung ose, disuspensikan di dalam 5 ml air garam NaCl 0,9% pada tabung reaksi sampai kekeruhannya sama dengan standard *McFarland* (10^8 CFU/ml). Standar kekeruhan *McFarland* dibuat dengan cara 0,5 mL larutan BaCl₂ 1% ditambah dengan 9,5 mL H₂SO₄ 1% (Hastari, 2012).

3.4.4 Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak etanol dibuat dalam tujuh seri konsentrasi yaitu 50, 100, 250, 500, 750, dan 1000 ppm.

3.4.5 Pengujian Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit batang jabon, kontrol negatif, dan kontrol positif menggunakan metode *Disc Diffusion Kirby-Bauer* secara *in vitro* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Media yang digunakan yaitu media NA. Kertas cakram dicelupkan dalam ekstrak dan fraksi kulit batang jabon kemudian ditempatkan di atas permukaan media yang telah ditumbuhkan bakteri. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diamati zona hambat yang terbentuk. Kontrol negatif yang digunakan adalah akuades sedangkan kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik ciprofloksasin (Dwi *et al.*, 2018).

3.5 Analisis Data

Data hasil pengujian antibakteri ekstrak dan fraksi kulit batang Jabon (*Anthocephalus Cadamba* (Roxb) Miq.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dianalisis data menggunakan SPSS statistik. Jika data hasil persamaan antibakteri terdistribusi normal dan homogen maka analisis dilanjutkan menggunakan metode RAL yaitu dengan uji analisis varians (ANOVA). Analisis dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur).