

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi jurusan Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Universitas Cenderawasih Jayapura, waktu penelitian berlangsung dari Januari 2024 – Maret 2024.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan yaitu blender, timbangan analitik, toples kaca, batang pengaduk, spatula, corong, gelas ukur, gelas beaker, cawan porselen, Erlenmeyer, hot plate, *stirrer*, labu ukur, jarum ose, mikropipet, pembakar bunsen, ayakan mesh 60, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pinset, cawan petri, inkubator, vial, kamera, *colony counter*, autoklaf, *vortex mixer*, *water bath*, dan *laminar air flow*.

3.2.2 Bahan

Populasi dalam penelitian ini adalah biji buah keben yang terdapat di Pantai Bukisi, dengan sampel adalah biji buah keben yang dibuat simplisia. Bahan yang digunakan yaitu bakteri *Staphylococcus aureus*, bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, aquadest, kertas saring, aluminium foil, etil asetat, n-heksana, etanol 96%, *dimethyl sulfoxide* (DMSO) 10%, asam sulfat, asam asetat, kalium dikromat, pereaksi mayer, pereaksi dragendroff, serbuk magnesium, asam klorida, kloroform, natrium klorida, besi (III) klorida, media *nutrient agar* (NA), *Ciprofloxacin* (Kertas difusi) µg.

3.3 Preparasi Sampel

Sampel biji buah keben diambil dari Pantai Bukisi, Jayapura, Papua. Bagian tanaman yang digunakan sebagai sampel adalah biji dari buah keben. Sampel kemudian dipisahkan dari buahnya dan dibersihkan dengan air yang mengalir lalu dipotong-potong menjadi bagian lebih kecil. Sampel kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan atau dioven. Proses ini bertujuan agar kadar air pada simplisia biji buah keben berkurang sehingga mencegah tumbuhnya jamur serta dapat bertahan lama pada saat penyimpanan.

Simplisia yang sudah kering dihaluskan kemudian diayak dengan mesh nomor 60 dan simpan di wadah tertutup.

3.4 Ekstraksi dan Fraksinasi

Pembuatan ekstrak dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Pertama simplisia biji keben ditimbang sebanyak 500 g kemudian direndam dengan pelarut etanol 96% 1,5 L (1:3). Proses maserasi dilakukan selama 3 hari dengan pengadukan secara berkala. Kemudian filtrat yang diperoleh di evaporasi dengan *rotary evaporator* dan dilanjutkan dengan penguapan dengan *water bath* dengan suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental. Hasil rendemen yang didapat kemudian ditimbang dan dihitung presentase yang diperoleh.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Ekstrak yang dihasilkan}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%.$$

Ekstrak yang sudah didapatkan, kemudian dilakukan pemisahan senyawa berdasarkan kepolaran yang biasa disebut fraksinasi. Metode fraksinasi yang dilakukan yaitu ekstraksi cair-cair (ECC) menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Fraksinasi dilakukan sebagai berikut : ekstrak etanol dilarutkan dalam etanol dan air dengan perbandingan 1:1 sebanyak 100 ml. Selanjutnya dimasukkan kedalam corong pisah, lalu ditambahkan 100 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 dengan proses yang sama pada n-heksana. Fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol-air diuapkan dengan *water bath*. Hasil fraksi dihitung persen rendemen terhadap sampel ekstrak yang difraksinasi.

3.5 Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui masih ada atau tidaknya etanol yang terkandung dalam ekstrak. Uji bebas etanol dapat dilakukan dengan melihat perubahan warna pada ekstrak atau disebut uji kualitatif. Uji kualitatif etanol dilakukan dengan menambahkan 2 tetes asam sulfat (H_2SO_4 pekat) dan 1 ml kalium dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Adanya etanol pada ekstrak

ditunjukkan dengan perubahan warna awal dari jingga menjadi biru kehijauan (Depkes RI, 1995).

3.6 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap simplisia ekstrak dan fraksi meliputi pemeriksaan terhadap golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan triterpenoid/steroid.

1. Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak yang diperoleh dibagi menjadi 2 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan pereaksi Dregendroff sebanyak 3 tetes, tabung kedua ditambahkan pereaksi mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung pertama dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung kedua menunjukkan adanya alkaloid (Jones & Kinghorn, 2006).

2. Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia dalam 100 ml air panas dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan juga untuk penepisan senyawa golongan saponin dan tanin. Ke dalam 5 ml larutan tersebut ditambahkan serbuk magnesium dan 2 ml asam klorida-etanol (1:1), kemudian dikocok dengan 10 ml amil alkohol. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga, kuning atau merah yang tertarik pada lapisan amil alkohol (Farnsworth, 1966).

3. Uji Saponin

Sebanyak 10 ml larutan dalam tabung reaksi dikocok selama 10 detik secara vertikal. Terbentuknya busa yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm yang tidak hilang dengan penambahan HCl, menunjukkan adanya saponin (Farnsworth, 1966).

4. Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 5 ml larutan direaksikan dengan larutan FeCl_3 1%. Jika terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin dan polifenol (Farnsworth, 1966).

5. Pemeriksaan Triterpenoid

Sebanyak 0,5 gram sampel dilarutkan dalam 10 ml kloroform kemudian disaring. Filtrat yang didapatkan direaksikan dengan 2-3 tetes H_2SO_4 pekat

(atau minimal konsentrasi 2 N) pada tabung reaksi. Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan terjadinya warna kecoklatan atau violet, sedangkan adanya steroid ditunjukkan dengan adanya warna biru kehijauan (A'yun dan Laily, 2015).

3.7 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA) ditimbang dengan menggunakan neraca analitik sebanyak 5 g, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 250 ml kedalam labu erlenmeyer. Panaskan labu erlenmeyer diatas hotplate hingga *Nutrient Agar* larut dengan air menggunakan stirer. Kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 3 jam. Setelah disterilkan, media disimpan dalam kulkas. Ketika akan digunakan, media dipanaskan kembali hingga mendidih lalu dituangkan kembali pada cawan petri dan ditunggu hingga dingin.

3.8 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri dicuci bersih terlebih dahulu alat yang akan digunakan, kemudian dikeringkan dengan menggunakan tisu, setelah itu disterilisasikan untuk digunakan. Media pertumbuhan akan disterilkan menggunakan alat autoklaf pada suhu 121°C selama 3 jam dan alat-alat gelas yang akan digunakan seperti cawan petri dibungkus menggunakan kertas, tabung reaksi dan erlenmeyer ditutup mulutnya dengan menggunakan kapas lalu dibungkus menggunakan kertas, setelah itu disterilkan menggunakan oven dengan suhu 160-170°C selama 1-2 jam. Jarum ose, pinset, batang L direndam menggunakan alkohol 70% kemudian dipanaskan di api busen. *Laminar Air Flow* disterilkan dengan menyalakan lampu uv selama 1 jam, dibersihkan dari debu, disemprot dengan menggunakan etanol 70% selama 15 menit.

3.9 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri menggunakan jarum ose yang telah disterilkan, lalu ditanamkan pada media agar dengan cara menggores secara zig zag. Kemudian medium dibungkus pada media plastik untuk menjaga suhu agar tetap stabil di dalam. Setelah itu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Perlakuan yang

sama dilakukan pada setiap bakteri yang akan diuji.

3.10 Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil satu ujung jarum ose koloni bakteri dari media subkultur, disuspensikan dalam 1 mL larutan NaCl pada tabung reaksi, ditambahkan akuades 9 mL, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex hingga kekeruhannya sama dengan standar *Mc. Farland* (10^8 CFU/mL). Standar kekeruhan dari *Mc. Farland* dibuat dengan cara 0,5 mL larutan BaCl_2 1% ditambahkan dengan 9,5 mL H_2SO_4 1%. Suspensi bakteri dalam standar *Mc. Farland* yaitu 3×10^8 .

3.11 Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

Larutan uji disiapkan dengan enam macam konsentrasi larutan uji yaitu 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, dan 1000 ppm. Dibuat larutan stok 1000 ppm dengan cara melarutkan masing-masing sampel, yaitu ekstrak etanol, fraksi etanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana. Sampel dilarutkan dengan menggunakan larutan aquades dan tambahkan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) 10% sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Uji kadar hambat minimum (KHM) dengan variasi konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm dan 1000 ppm. Pembuatan larutan pada konsentrasi tersebut dilakukan dengan pengenceran bertingkat. Kontrol positif yang digunakan adalah *ciprofloxacin* dan kontrol negatif digunakan aquades.

3.12 Pengujian Aktivitas Antibakteri

3.12.1 Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol biji buah keben (*Barringtonia asiatica* L. Kurz) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan dengan metode difusi cakram dengan berbagai konsentrasi yaitu 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, dan 1000 ppm. *Nutrient Agar* (NA) yang masih berbentuk cairan dituang ke dalam cawan petri steril ± 20 mL dan dibiarkan hingga memadat. Setelah agar memadat teteskan suspensi bakteri sebanyak 3 tetes menggunakan mikropipet pada permukaan *Nutrient Agar* (NA) kemudian diratakan menggunakan batang L. Kertas cakram steril kemudian ditetesi dengan larutan uji sebanyak 1-3 tetes, kemudian didiamkan beberapa menit.

Setelah itu diletakan diatas permukaan media *Nutrient Agar* (NA) dengan menggunakan pinset steril. Untuk kontrol negatif digunakan aquades dan kontrol positif menggunakan *ciprofloxacin*. Masing-masing cawan petri kemudian diinkubasi dalam keadaan posisi terbalik pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Aktivitas antibakteri diamati berdasarkan pengukuran diameter daerah hambat atau daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

Tabel 3.1 Kriteria Kekuatan Daya Antibakteri

No	Zona Hambat Bakteri (mm)	Kekuatan
1	<5 mm	Lemah
2	5 mm-10 mm	Sedang
3	10 mm-20 mm	Kuat
4	>20 mm	Sangat Kuat

Sumber : (Davis dan Stout, 1997).

3.12.2 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap, penelitian ini terdiri dari 6 konsentrasi perlakuan, setiap perlakuan konsentrasi diulang 3 kali. Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Analisa akan diawali dengan pengujian normalitas dan homogenitas, kemudian dilanjutkan dengan menggunakan analisis ragam *One Way Analysis Of Variance* (ANOVA) dengan derajat kepercayaan 95% ($p \leq 0,05$). Data ANOVA yang diperoleh menunjukkan konsentrasi perlakuan yang diteliti berbeda nyata, maka analisis dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) guna membandingkan kekuatan daya hambat setiap konsentrasi perlakuan.