

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Pengujian dilakukan secara *in vitro* dengan metode yang digunakan adalah metode difusi cakram.

4.2. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Sintesis, Laboratorium Sediaan Formulasi, dan Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang. Penelitian ini dilaksanakan terhitung mulai dari bulan juli 2017 sampai dengan bulan juli 2018.

4.3. Instrumen Penelitian

4.3.1. Pembuatan Serbuk Simplisia

1. Mesin penggiling (Blender)
2. Pengayak mesh 20 dan 40
3. Timbangan analitik balance *Scout Pro 400 g*
4. Oven BINDER

4.3.2. Proses Ekstraksi

- | | |
|---|---|
| 1. Timbangan analitik balance
<i>Scout Pro 400 g</i> | 7. Batang pengaduk |
| 2. Gelas ukur | 8. Oven BINDER |
| 3. Gelas piala 1000 ml <i>Pyrex</i>
<i>Iwaki TE_32</i> | 9. Pipet tetes |
| 4. Desikator | 10. Sudip besi 20 cm |
| 5. Cawan Porselen Ø 10 cm | 11. Erlenmeyer 1000 ml |
| 6. Penyaring Buchner 100 mm | 12. <i>Rotary evaporator vacuum</i>
<i>Buchi R-215</i> |

4.3.3. Pengujian Difusi Cakram

- | | |
|--------------|---------------------|
| 1. Inkubator | 3. Micro pipet |
| 2. Autoklaf | 4. Laminar Air Flow |

- | | |
|------------------|-----------------|
| 5. Tabung reaksi | 10. Erlenmeyer |
| 6. Hot plate | 11. Penjepit |
| 7. Bunsen | 12. Cawan petri |
| 8. Pipet volume | 13. Kawat os |
| 9. Kertas saring | |

4.3.4. Identifikasi Senyawa dengan Teknik KLT

- | | |
|--------------------|---|
| 1. Cawan porselen | 7. Pipa kapiler 5 μ l |
| 2. Chamber | 8. Sinar UV |
| 3. Lempeng KLT | 9. Timbangan analitik balance
<i>Scout Pro 400 g</i> |
| 4. Lempeng panas | |
| 5. Penyemprot noda | |
| 6. Pinset | |

4.4. Bahan Penelitian

4.4.1. Bahan Uji

Bahan tanaman uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr yang didapatkan dari daerah kota Palangka Raya dan telah diserbukkan oleh UPT. Balai Materia Medika, Dinas Kesehatan, Jawa Timur. Penelitian ini mengambil sampel umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr dengan warna merah keunguan dan ukuran panjang 5 cm dan diameter 3 cm. Mikroba uji adalah *Propionibacterium acnes* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Parasitologi Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4.2. Proses Fraksinasi

Proses penelitian kali ini dilakukan dengan fraksinasi bertingkat, yang dimulai dari pelarut non-polar (n-heksan), semi polar (etil asetat), dan polar (etanol 96%) teknis. Timbang serbuk halus umbi *Eleutherine palmifolia* sebanyak 2 kilogram, masukkan kedalam sebuah bejana bermulut besar. Tambahkan pelarut n-heksan sebanyak 20 L (perbandingan 1:10), rendam selama 24 jam dan saring dengan corong *Buchner*, didapatkan filtrat dan residu n-heksan. Filtrat kemudian di rotary evaporator dengan suhu 45°C hingga menguap, sedangkan residu di remaserasi kembali dengan n-heksan sebanyak 10 L (perbandingan 1:5), replikasi 3x. Hasil replikasi rotary evaporator didapatkan ekstrak kental n-heksan dan disimpan dalam lemari pendingin. Hasil residu n-heksan di rendam dengan etil asetat sebanyak 20 L (perbandingan 1:10), rendam selama 24 jam dan saring dengan corong *Buchner*, didapatkan filtrat dan residu etil asetat. Filtrat kemudian di rotav hingga menguap, sedangkan residu di remaserasi kembali dengan etil asetat sebanyak 10 L (perbandingan 1:5), replikasi 3x Hasil

replikasi rotary evaporator didapatkan ekstrak kental etil asetat dan disimpan dalam lemari pendingin. Hasil residu etil asetat di rendam dengan etanol sebanyak 20 L (per perbandingan 1:10), rendam selama 24 jam dan saring dengan corong Buchner dan didapatkan filtrat dan residu etanol. Filtrat kemudian di rotary evaporator hingga menguap, sedangkan residu di remaserasi kembali dengan etanol sebanyak 10 L (perbandingan 1:5), replikasi 3x. Hasil replikasi rotary evaporator didapatkan ekstrak kental etanol dan disimpan dalam lemari pendingin.

4.4.3. Pengujian Difusi Cakram

1. Fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr
2. *Mueller Hinton Agar* (MHA)
3. Aquades steril
4. Clindamycin 2 μ g/disc

4.4.4. Identifikasi Senyawa dengan KLT

- | | |
|-----------------------------|------------------------------------|
| 1. N-Heksan teknis | 8. Reagen anisaldehyda-asam sulfat |
| 2. Etil asetat pro analisis | |
| 3. Asam sulfat 10% | 9. Lempeng KLT silika gel 60 F254 |
| 4. Larutan KOH 10% | |
| 5. FeCl ₃ 1% | |
| 6. NaCl 10% | |
| 7. Reagen Dragendorff | |

4.5. Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi uji mulai 20 mg/ml, 40 mg/ml, dan 60 mg/ml.

4.5.2. Variabel Terikat

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ukuran zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

4.6. Sterilisasi

Semua alat yang digunakan, terlebih dahulu disterilkan melalui proses sterilisasi, yaitu cara sterilisasi kering dan cara sterilisasi basah.

4.6.1. Sterilisasi Kering

Sterilisasi kering meliputi cara sterilisasi dengan api langsung dan cara sterilisasi dengan oven pemanas.

1. Sterilisasi dengan api langsung

Sterilisasi ini dilakukan terhadap peralatan seperti jarum Oase, pinset, spatel, mulut tabung biakan dan batang pengaduk.

2. Sterilisasi dengan oven pemanas

Oven pemanas digunakan untuk sterilisasi peralatan gelas yang tidak berskala, seperti cawan petri, tabung reaksi dan pipet. Alat-alat yang disterilkan dimasukkan kedalam oven setelah suhu mencapai 160°C selama 1-2 jam

4.6.2. Sterilisasi Basah

Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf. Peralatan yang disterilkan dengan sterilisasi basah diantaranya gelas ukur, Erlenmeyer dan pipet tetes. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 121°C selama 15-20 menit. Sterilisasi medium uji dilakukan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

4.7. Metode Penelitian

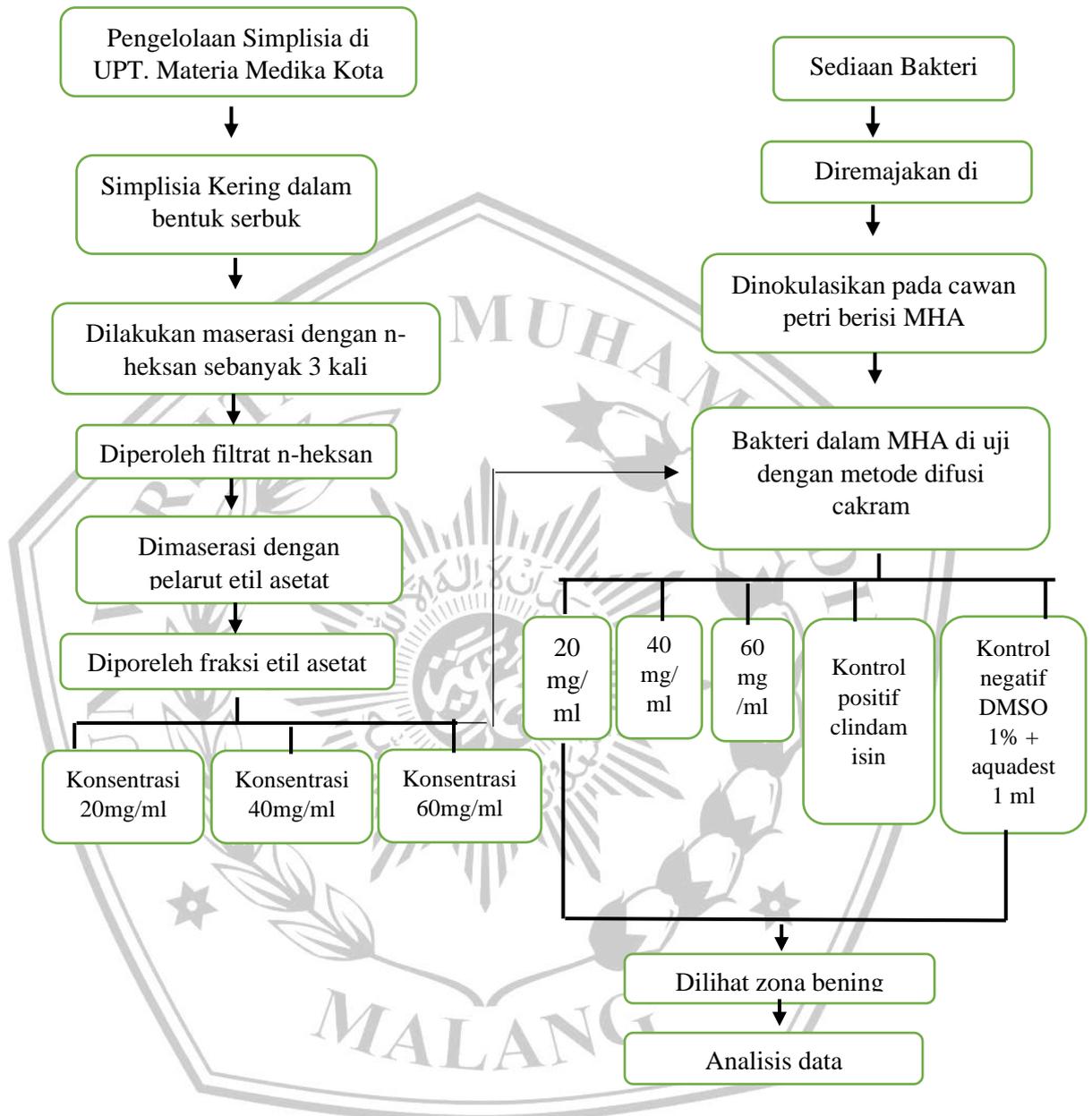
4.7.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mendapatkan data diameter daya hambat senyawa dalam fraksi etanol umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* serta mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol daun umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr secara *in vitro* dengan metode difusi cakram. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan dua perlakuan yakni kelompok uji yaitu ekstrak etanol dan kelompok kontrol yaitu clyndamicin.

Penelitian ini melalui beberapa tahapan, yaitu:

1. Persiapan simplisia
2. Penarikan komponen senyawa/Ekstraksi
3. Pemisahan komponen senyawa dengan metode KLT
4. Pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram

4.7.2. Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Skema Kerangka Operasional

4.8. Prosedur Kerja

4.8.1. Pengelolaan Simplisia

Sampel yang diteliti adalah umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr. Umbi dibersihkan, ditiriskan, diiris tipis-tipis dan ditimbang, kemudian dikeringkan.

Pengeringan pada suhu ruang dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari langsung. Setelah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggilingan, sehingga diperoleh serbuk halus. Selanjutnya diayak menggunakan *Shieve Shaker* dengan derajat kehalusan tertentu (Farmakope Herbal Indonesia, 2009). Kemudian dilakukan pengukuran MC untuk mengetahui kadar air yang masih terdapat dalam ekstrak dengan memasukkan 2 gram ekstrak kering ke dalam alat MC, tekan *enter* pada alat hingga alat berbunyi.(replikasi 3 kali).

4.8.2. Pembuatan Ekstrak Bahan Uji

Pembuatan ekstrak bahan uji diadopsi dari penelitian yang dilakukan Puspadewi (2013) dan Amanda (2014) yang kemudian dikembangkan. Pada proses ekstraksi yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah dengan metode maserasi bertingkat dengan menggunakan 3 macam pelarut yaitu pelarut nheksan, etil asetat dan etanol 96%. Adapun prosedur kerjanya sebagai berikut :

Dalam pembuatan ekstraknya digunakan serbuk umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr sebanyak 2 kilogram dan diekstraksi dengan menggunakan maserasi perendaman 24 jam sebagai berikut : Konsentrasi yang digunakan untuk penelitian ini adalah 20% ; 40% ; 60% aktivitas antibakteri umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr pada konsentrasi tersebut cukup baik.

4.8.3. Pemisahan Senyawa dengan KLT

Fraksi etanol umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr ditimbang sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 1 ml n-heksan pada wadah tertutup rapat. Totolkan sebanyak 5 µl pada lempeng KLT, kemudian di eluasi dengan berbagai macam fase gerak. Eluen yang memiliki kemampuan terbaik dalam memisahkan komponen senyawa, akan digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram (Farmakope Herbal Indonesia, 2008). Fase diam :

1. Silika Gel TLC 60 F254
2. Fase gerak : n-heksana : etil asetat= 8 : 2
3. Satu tetes asam formiat

4.8.4. Identifikasi Komponen Senyawa

Terhadap komponen senyawa yang telah dipisahkan dengan metode KLT, dilakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi etil asetat dengan penampak noda sebagai berikut:

- a. Alkaloid : dragendorff (noda berwarna jingga)
- b. Terpenoid : anisaldehyda-asam sulfat. Panaskan lempeng pada suhu 100o C selama 5-10 menit (noda berwarna ungu)
- c. Flavonoid : uap amonia atau asam sulfat 10% (noda berwarna kuning intensif)
- d. Polifenol : besi (III) klorida 1% (noda berwarna hitam)
- e. Antrakuinon : larutan kalium hidroksida 10% dalam etanol (noda berwarna jingga atau merah)

4.8.5. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

Pembuatan variasi konsentrasi larutan uji dibuat sebagai berikut:

- a) Ditimbang bawang dayak 60 mg kemudian ditambahkan DMSO 1% dengan melarutkan 0,01 ml DMSO dalam pelarut aquades sampai 1 ml, sehingga diperoleh larutan uji konsentrasi 1 dari bawang dayak 60 mg/ml.
- b) Ditimbang bawang dayak 40 mg kemudian ditambahkan DMSO 1% dengan melarutkan 0,01 ml DMSO dalam pelarut aquades sampai 1 ml, sehingga diperoleh larutan uji konsentrasi 1 dari bawang dayak 40 mg/ml.
- c) Ditimbang bawang dayak 20 mg kemudian ditambahkan DMSO 1% dengan melarutkan 0,01 ml DMSO dalam pelarut aquades sampai 1 ml, sehingga diperoleh larutan uji konsentrasi 1 dari bawang dayak 20 mg/ml.

4.8.6. Pembuatan Media

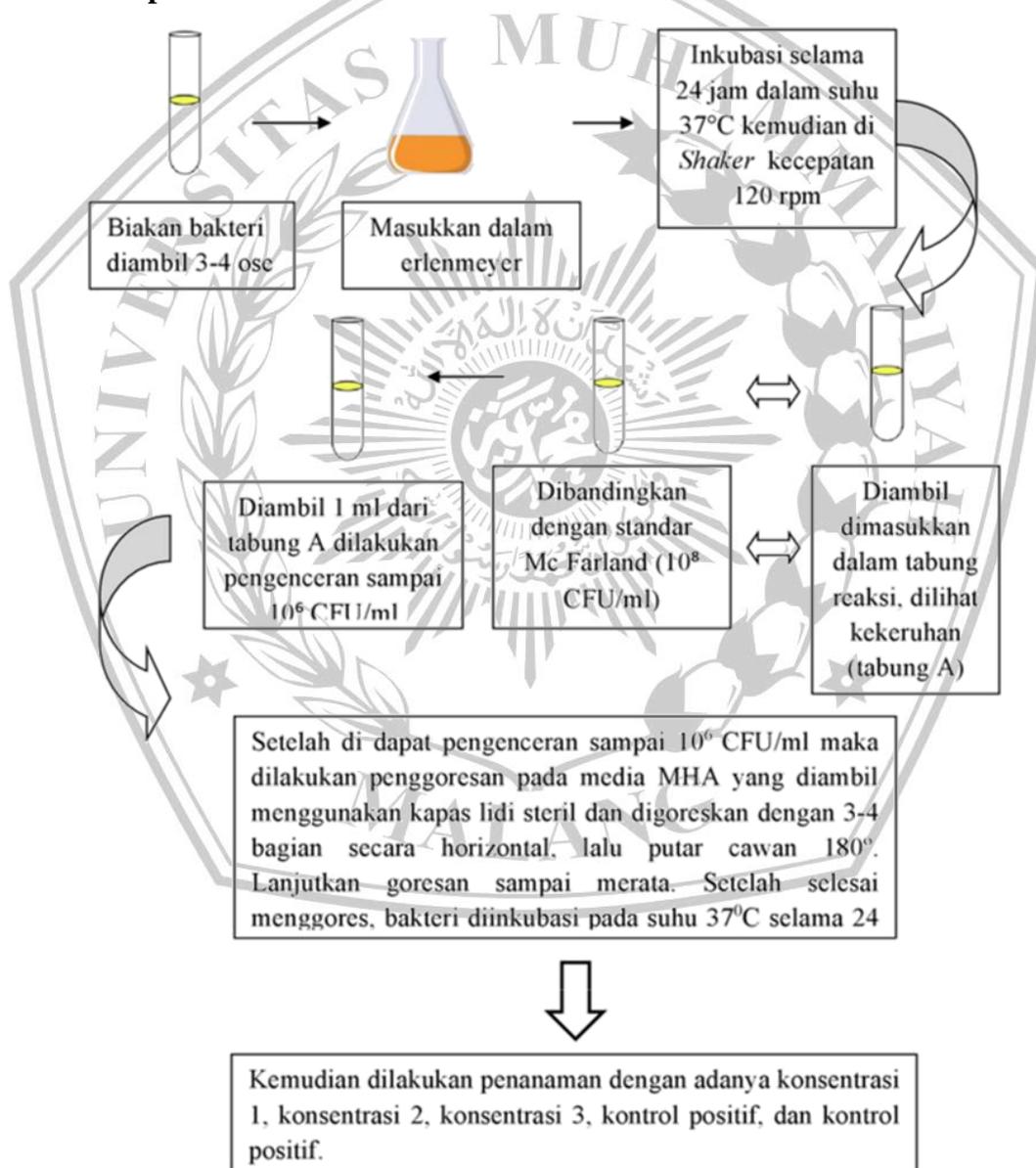
Dalam penelitian ini digunakan satu media yakni *Mueller Hinton Agar* (MHA) dalam pembuatan suspensi bakteri menggunakan aquadest steril dengan meremajakan bakteri sehari sebelum penggunaan. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan melarutkan bahan sebanyak 38 gram (dengan komposisi : *Beef dehydrate infusion* 300 g, *Casein hydrolysate* 17.5 g, *Starch* 1.5 g dan *Agar* 15 g) ke dalam 1 L aquadest pada erlenmeyer dengan kapasitas 1 L. Erlenmeyer diletakkan diatas hot plate kemudian masukkan *magnetic stirrer* untuk mempercepat pelarutan sampai didapatkan larutan media menjadi berwarna kuning jernih. Setelah itu erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil kemudian

disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121o C. Dituang media steril ke cawan petri steril secara aseptis di dalam LAF.

4.8.7. Pembuatan Standar Mc Farland

Diambil aquadest kira-kira setengah dari tabung reaksi. Kemudian tambahkan H₂SO₄ 1% sebanyak 9950 µL dan BaCl₂ 1% sebanyak 50µL. Campur kedua larutan dalam tabung tersebut, dikocok sampai homogen dan terbentuk larutan keruh. Larutan tersebut ini dipakai sebagai pembanding suspensi bakteri dengan tingkat kekeruhan 10⁸ CFU/ml.

4.8.8. Preparasi Bakteri



Gambar 4.2Preparasi Bakteri

4.8.9. Perwarnaan Bakteri Uji

Perwarnaan bakteri uji yang dilakukan adalah pewarnaan Gram. Perwarnaan bakteri dilakukan untuk identifikasi dan untuk memastikan tidak ada kontaminan pada kultur kerja. Objek kaca yang digunakan dibersihkan dengan alkohol 96% dan dikeringkan. Kemudian tambahkan aquadest 1 tetes di atas objek kaca, dan ambil biakan bakteri yang akan dilakukan pewarnaan dengan ose steril (biakan bakteri yang diambil 1 koloni), kemudian ratakan biakan bakteri di permukaan objek kaca yang telah berisi aquadest. Kemudian difiksasi dengan api bunsen (lewatkan di atas api 2-3 kali). Setelah kering, pertama ditetesi dengan pewarna *Crystal Violet* kemudian tunggu 1 menit lalu bilas dengan aquadest. Kedua, ditetesi dengan *Lugol* dan tunggu 1 menit lalu bilas dengan aquadest. Ketiga, bilas dengan alkohol 96% lalu bilas dengan aquadest. Keempat, ditetesi pewarna *Safranin* dan tunggu 1 menit lalu bilas dengan aquadest kemudian keringkan dengan tisu. Periksa dengan mikroskop (perbesaran 100 x 10), bakteri yang tetap berwarna ungu digolongkan kedalam bakteri Gram positif. Sedangkan bakteri Gram negatif juga berwarna ungu tetapi penggunaan *Safranin* akan mewarnai sel Gram negatif menjadi berwarna merah, sedangkan Gram positif tidak terpengaruh (Hafsan et al., 2015; Back, 2001).

4.8.10. Tahap Pengujian

4.8.10.1. Pengujian Penghambatan Pertumbuhan Bakteri Dengan Difusi Cakram

Prosedur pengujian bakteri *P.acnes* secara difusi cakram dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) sebagai berikut:

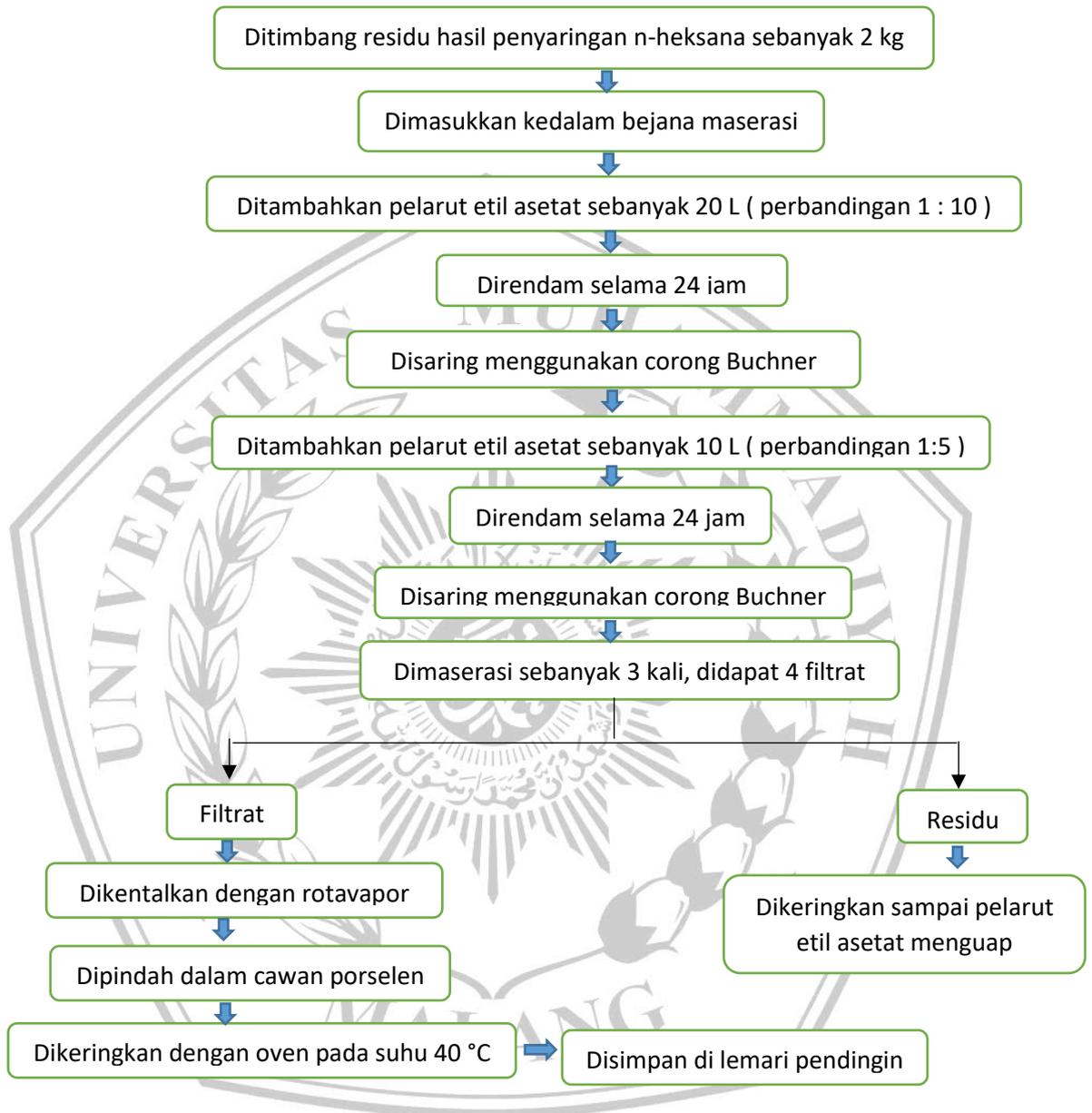
1. Disiapkan larutan uji masing-masing yang telah dimasukkan ke dalam eppendrop dengan konsentrasi yaitu 60 mg/ml (konsentrasi 1); 40 mg/ml (konsentrasi 2); dan 20 mg/ml (konsentrasi 3), kontrol positif (Clindamycin 2 µg) dan kontrol negatif (DMSO 1 %)
2. Dilakukan peremajaan bakteri dan preparasi media sehari sebelumnya.
3. Disiapkan larutan uji di pipet 10 µl dengan konsentrasi yang telah ditentukan (konsentrasi 1,2, dan 3) kemudian kertas cakram kosong diletakkan di atas kaca arloji yang telah berisi kombinasi larutan uji

kemudian direndam selama 20 menit dengan pengulangan 6 kali dan dikeringkan dengan oven suhu 37°C selama 5 menit tiap setelah perendaman (sampai rendaman ke-5). Selesai perendaman ke-6 tidak dikeringkan dalam oven tetapi hanya diangin-aginkan di dalam LAF sehingga kertas cakram tidak terlalu kering. Sedangkan untuk kontrol negatif menggunakan DMSO 10% dengan perlakuan sama dengan larutan uji dan di oven suhu 37°C selama 10 menit.

4. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.
5. Hasil peremajaan bakteri dilakukan cek pewarnaan Gram. Kemudian bakteri yang telah di preparasi diambil dengan cara mencelupkan kapas lidi steril satu kali, lalu diletakkan pada tepi tabung reaksi, kemudian kapas lidi steril tersebut diputar agar bakteri yang akan dioleskan tidak terlalu banyak. Setelah itu dioleskan pada *Mueller Hinton Agar* (MHA) di cawan petri kemudian diratakan.
6. Kertas cakram yang telah berisi dosis larutan uji diletakkan diatas permukaan *Mueller Hinton Agar* (MHA). Agar diperoleh kontak yang baik, kertas cakram dapat ditekan dengan lembut menggunakan pinset pada permukaannya. Jarak satu kertas cakram dengan kertas cakram yang lainnya diatur sedemikian rupa sehingga berjauhan.
7. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
8. Pengujian senyawa antibakteri dilakukan dengan pengamatan yang dilakukan setiap 24 jam dengan melihat adanya diameter zona (area) bening disekitar kertas cakram. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan jangka sorong dalam satuan militer (mm).

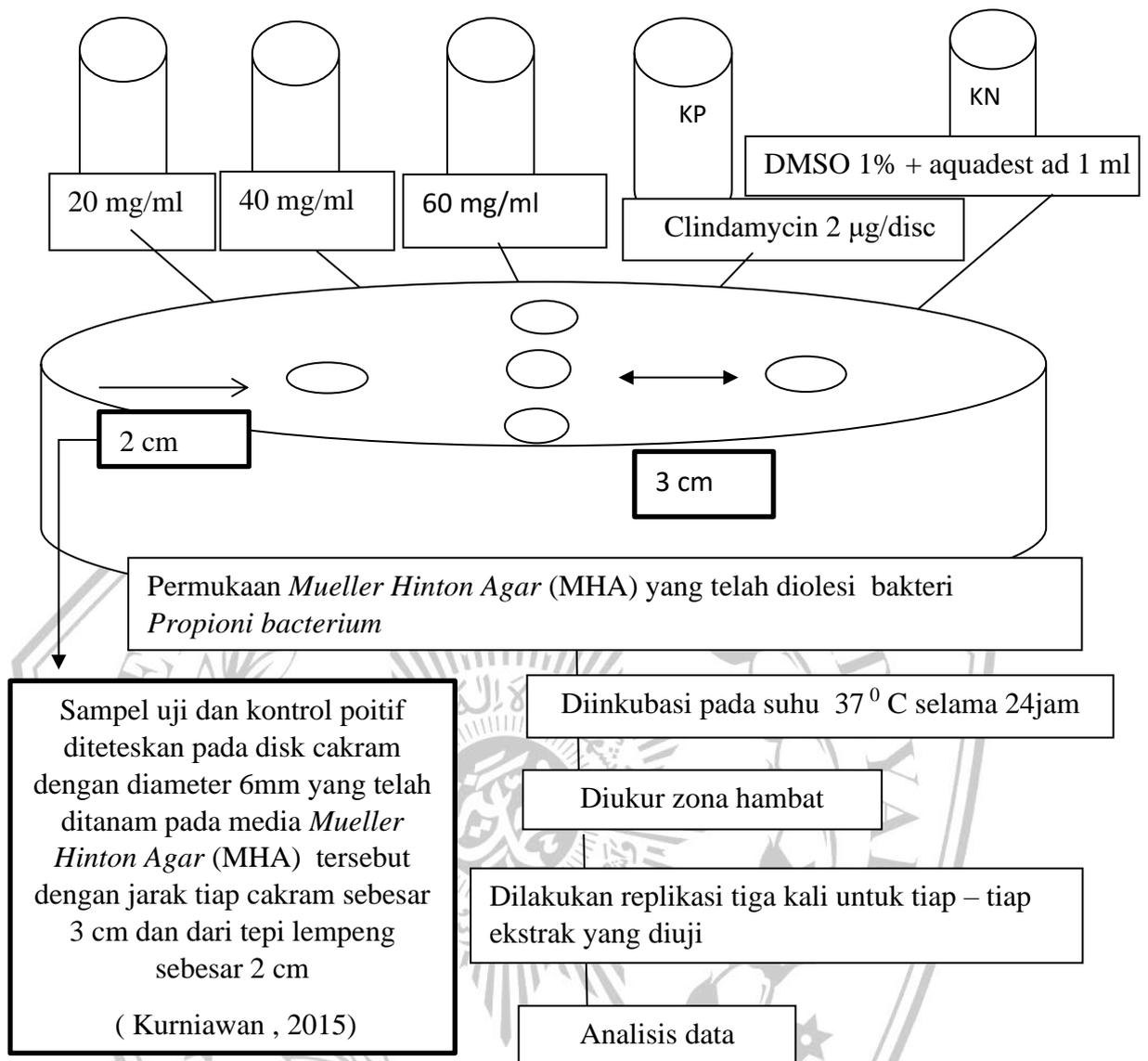
4.9 Bagan Alir Penelitian

a) Proses pembuatan Fraksi Etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* L.



Gambar 4.3 Bagan Alir proses pembuatan fraksi Etil asetat

b) Proses pengujian antijamur dengan metode difusi cakram



Gambar 4.4 Bagan Prosedur Pengujian Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram.

4.10. Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan melakukan pengamatan terhadap pengukuran diameter zona hambat daerah berwarna bening dari masing masing konsentrasi ekstrak umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr terhadap bakteri *P.acnes*.