

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk jenis penelitian eksperimental laboratorium. Dalam penelitian ini mempunyai beberapa tahapan, yaitu: ekstraksi sampel dengan metode infundasi, metode perkolasi, identifikasi kualitatif kandungan flavonoid, alkaloid dan saponin, ekstrak air dan etanol biji mahoni dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Shigella sp.*

B. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2017 sampai Juni 2017, di Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

C. Variabel Penelitian

1. Uji aktivitas antibakteri infus biji mahoni
 - a. Variabel bebas: ekstrak air biji mahoni dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.
 - b. Variabel tergantung: zona bening disekitar kertas cakram pada media agar.
2. Uji aktivitas antibakteri ekstrak air biji mahoni dengan metode perkolasi
 - a. Variabel bebas: ekstrak air biji mahoni dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%.

- b. Variabel tergantung: zona bening disekitar kertas cakram pada media agar.
3. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji mahoni dengan metode perkolasi
 - b. Variabel bebas: ekstrak etanol biji mahoni dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75%, 100%.
 - c. Variabel tergantung: zona bening disekitar kertas cakram pada media agar.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri ekstrak biji mahoni terhadap bakteri *Shigella sp.* yaitu:

1. Variabel bebas adalah ekstrak yang didapatkan dari biji mahoni yang telah diekstraksi terlebih dahulu menggunakan air dan etanol. Sampai didapatkan hasil ekstrak sesuai yang diharapkan.
2. Variabel tergantung adalah efektivitas kemampuan antibakteri yang telah diuji pada ekstrak air dan etanol biji mahoni terhadap bakteri *Shigella sp.*

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan

Instrumen penelitian yang digunakan pada penelitian ini meliputi bahan-bahan, yaitu biji mahoni sebagai simplisia yang didapatkan dari Kota Kuningan, Jawa Barat. Bahan-bahan yang digunakan selain biji mahoni yaitu BHI (*Brain Heart Infusion*), media agar TSA, NaCl 0,9%, suspensi

Shigella sp., air, aquadest steril, infus ciprofloxacin, reagen FeCl_3 1%, HCl 2N dan *Dragendroff*.

2. Alat

Alat yang digunakan yaitu panci infusa, erlenmeyer, kertas saring, penggaris, propipet, pipet volume, timbangan analitik, blender, toples, kompor listrik, kain flanel, ose steril, oven, autoklaf, cawan petri, gelas beker, pinset, bunsen, cakram kertas, tabung perkolator, corong pisah dan tabung reaksi.

3. Cara Kerja

a. Pembuatan Simplisia

Biji mahoni yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender sehingga menjadi serbuk. Dan disimpan di dalam wadah tertutup.

b. Pembuatan Ekstrak Infusa

Dibuat ekstrak infus biji mahoni dilakukan dengan metode infundasi. Menurut Farmakope edisi III cara ekstraksinya yaitu biji mahoni yang telah dihaluskan, ditimbang sebanyak 100 gram, kemudian dimasukkan ke dalam panci infusa dan ditambahkan 100 ml air dan ditambah air sebanyak 2 kali berat simplisia sehingga ditambahkan lagi 200 ml air, jadi total air yang digunakan untuk infundasi ekstrak 100 gram yaitu 300 ml sehingga total air yang digunakan 3 kali bobot simplisia karena biji mahoni menyerap air. Kemudian dilakukan pemanasan pada suhu 90°C selama 15 menit. Setelah 15 menit ekstrak

infusa disaring selagi panas menggunakan kain flanel, sehingga didapatkan konsentrasi infusa biji mahoni 100%. Selanjutnya dibuat pengenceran dengan berbagai konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% dengan menambahkan air steril yang telah dipanaskan (Azizah, 2014).

c. Pembuatan Ekstrak dengan Metode Perkolasi

1). Pembuatan Ekstrak Air

Dibuat ekstrak air biji mahoni dengan metode perkolasi. Ditimbang sebanyak 50 gram serbuk simplisia dan dimasukkan ke dalam tabung perkolator. Teteskan cairan penyari sebanyak 50 ml dari corong pisah sebagai pembasahan ke dalam serbuk dengan kecepatan 1ml/menit dengan mengatur tetesan sekitar 20 tetes penyari tiap 1 menit sampai didapat penyari setinggi 1 cm di atas permukaan serbuk. Didiamkan selama 24 jam, setelah itu tempatkan cairan penyari aquadest 50 ml di dalam corong pisah dan biarkan penyari dan filtrat menetes dengan kecepatan yang sama 1ml/menit sampai pelarut habis (Perwita, 2011). Dari filtrat tersebut dibuat pengenceran dengan berbagai konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, dan 50% dengan menambahkan aquadest steril.

2). Pembuatan Ekstrak Etanol

Dibuat ekstrak etanol biji mahoni dengan metode perkolasi. Ditimbang sebanyak 50 gram. Serbuk simplisia dan dimasukkan ke

dalam tabung perkolator. Kemudian kertas saring ditempatkan di atas permukaan serbuk. Teteskan cairan penyari sebanyak 50 ml dari corong pisah kedalam serbuk sebagai pembasahan dengan kecepatan 1ml/menit sampai didapat penyari setinggi 1 cm di atas permukaan serbuk. Didiamkan selama 24 jam, setelah itu tempatkan cairan penyari etanol 50 ml di dalam corong pisah dan biarkan penyari dan filtrat menetes dengan kecepatan yang sama 1ml/menit sampai pelarut habis (Perwita, 2011). Setelah filtrat didapat, dipanaskan di atas *waterbath* hingga mengental dan dibuat konsentrasi awal 100% dengan mengencerkan 1 gram ekstrak kental dengan 1 ml pelarut DMSO (Fatkhurrohman dan Medawati, 2013). Dan dibuat seri kadar 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75% dan 100% dengan menambahkan DMSO.

d. Pembuatan larutan uji

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan membuat variasi kadar konsentrasi ekstrak 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% sebagai larutan untuk uji aktivitas antibakteri. Pembuatan variasi ekstrak air biji mahoni dilakukan dengan mengambil 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml dan 100 ml ekstrak air dan dilarutkan dengan aquadest steril hingga volumenya mencapai 100 ml (Azizah, 2014).

Untuk membuat seri kadar ekstrak air dari perkolasi, filtrat hasil perkolasi dihitung dengan perbandingan rumus kadar filtrat dengan konsentrasi ekstrak yang dibuat yaitu :

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2 \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan :

M_1 = kadar yang diperoleh dari ekstrak

V_1 = volume pengenceran yang diinginkan

M_2 = konsentrasi ekstrak yang akan dibuat

V_2 = volume yang akan diambil

4. Analisis kandungan flavonoid

Uji kandungan senyawa kimia pada biji mahoni menggunakan uji analisis fitokimia untuk mengetahui ada/tidaknya senyawa flavonoid yang diduga terkandung dalam ekstrak air biji mahoni sebagai senyawa antibakteri. Langkah kerja yang dilakukan yaitu 1 ml ekstrak air biji mahoni dimasukkan kedalam tabung reaksi, setelah itu ditambahkan reagen FeCl_3 1%. Diamati perubahan warna yang terjadi, jika berubah menjadi warna merah jingga ekstrak tersebut terbukti mengandung senyawa flavonoid (Christien *et al.*, 2014).

5. Analisis kandungan saponin

Untuk uji kualitatif kandungan senyawa saponin dilakukan dengan cara 1 ml ekstrak air biji mahoni dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan 2 ml aquadest dan dikocok hingga homogen. Kemudian dipanaskan selama 2-3 menit, didinginkan dan kocok dengan kuat. Jika

terdapat busa stabil selama 30 detik menunjukkan ekstrak mengandung senyawa saponin (Harborne, 1996).

6. Analisis kandungan alkaloid

Uji kualitatif kandungan alkaloid dilakukan dengan cara diambil 9 ml ekstrak air dan 1 ml HCl 2N. Dicampurkan dan dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit. Setelah itu, 10 tetes filtrat dipindahkan dan ditambahkan 2 tetes reagen *Dragendroff*. Amati perubahan yang terjadi jika terbentuk endapan warna merah menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung alkaloid (Azizah, 2014).

7. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi

Proses sterilisasi disesuaikan dengan alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian. Untuk alat-alat gelas disterilkan dalam oven pada suhu 170⁰C selama 2 jam, jarum ose dan pinset disterilkan dengan menggunakan bunsen hingga memijar dan media disterilkan pada autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit (Prasetyo, 2015).

b. Pembuatan media agar TSA (*Tryptic Soy Agar*)

Sebanyak 2,3 gram serbuk media TSA dilarutkan dengan 100 ml aquades dalam labu erlenmeyer kemudian dipanaskan dan diaduk hingga larut. Setelah itu, dimasukkan ke dalam cawan petri, didiamkan hingga dingin, dan disimpan di dalam lemari es.

c. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan mengambil satu ose koloni bakteri dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 ml NaCl 0,9%, setelah itu diinkubasikan selama 2 sampai 4 jam pada suhu 37⁰C. Larutan suspensi bakteri tersebut diambil 1 ml dan ditambahkan nutrien BHI sebanyak 9 ml. Larutan tersebut dijadikan sebagai larutan stok bakteri untuk pengujian antibakteri ekstrak biji mahoni (Fuad, 2015).

d. Pembuatan kontrol positif

Kontrol positif yang digunakan yaitu ciprofloxacin. Sediaan ciprofloxacin infus dengan dosis 2 mg/ ml.

e. Uji aktivitas antibakteri

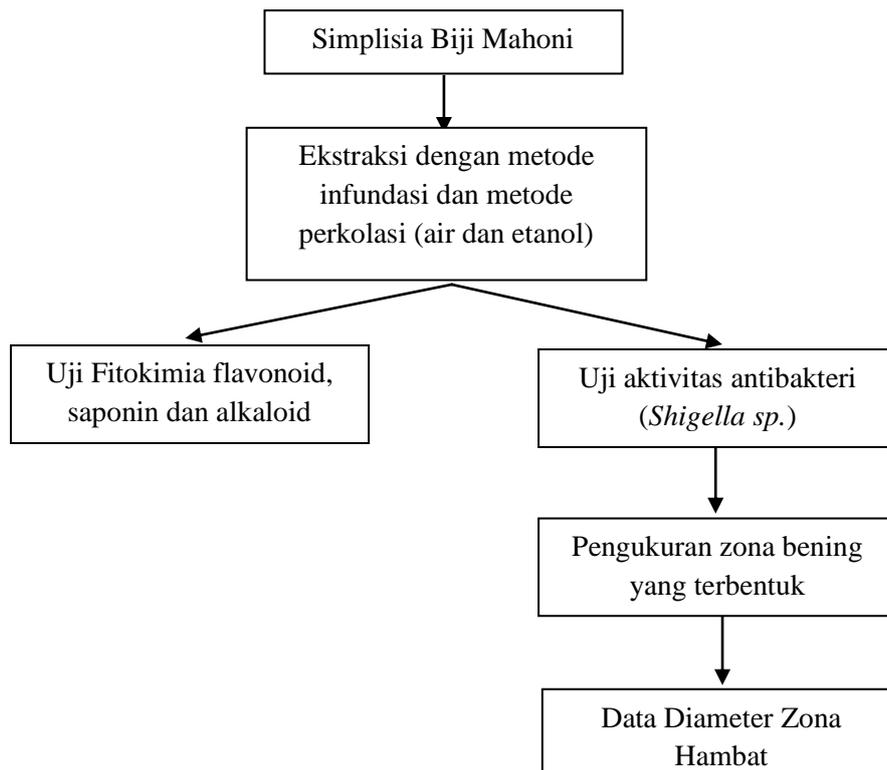
Pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak air dan ekstrak etanol biji mahoni menggunakan kertas cakram dan bakteri uji yang digunakan yaitu *Shigella sp.* Disiapkan cawan petri yang telah berisi media agar TSA, digoreskan suspensi bakteri dalam tabung reaksi dengan menggunakan kapas lidi ke cawan petri dengan rapat dan perlahan agar media tidak rusak. Kertas cakram direndam pada larutan uji dari berbagai konsentrasi ekstrak biji mahoni dan pada ciprofloxacin sebagai kontrol positif, setelah itu kertas cakram diletakkan pada media agar yang sudah tercampur bakteri. Dan diberi tanda pada setiap kertas cakram, lalu diinkubasikan cawan petri tersebut selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Zona bening yang terbentuk disekitar kertas

cakram menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri dan diukur menggunakan penggaris (Niswah, 2014). Pada Tabel 2 berikut adalah klasifikasi zona hambat menurut Devi *et al.*, (2007) yang dikutip dari Megawati tahun 2013 :

Tabel 2. Klasifikasi Zona Hambat (Devi *et al.*, 2007)

Diameter Zona Hambat	Aktivitas Antibakteri
< 6 mm	resisten
6-9 mm	lemah
9-12 mm	sedang
>12 mm	kuat

F. Skema langkah kerja



Gambar 4. Skema langkah kerja

G. Analisis data

Data hasil penelitian mengenai pengaruh konsentrasi ekstrak biji mahoni terhadap diameter zona hambat dimasukkan ke dalam perangkat lunak SPSS. Uji normalitas data menggunakan metode analitik *Shapiro-Wilk* untuk menilai distribusi data normal atau tidak. Jika data tidak terdistribusi normal maka lakukan uji non-parametrik dengan metode *Kruskall-Wallis*. Selanjutnya menggunakan uji *One Way ANOVA* untuk melihat rata-rata zona hambat setiap konsentrasi ekstrak biji mahoni (Fuad, 2015).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Ekstraksi Biji Mahoni

Biji mahoni yang telah dikupas kulitnya sebanyak 2 kg dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, lalu dikeringkan dalam oven selama 2 minggu pada suhu 50⁰C. Menurut Hartati (2013), biji mahoni dikeringkan dengan suhu 50⁰C selama seminggu, karena dalam fasilitas laboratorium oven tidak boleh digunakan hingga malam maka waktu pengeringannya ditambah menjadi 2 minggu. Biji mahoni yang telah kering dihaluskan dengan menggunakan blender hingga menjadi serbuk dan diayak dengan mesh 20 untuk menyamakan ukuran dari serbuk tersebut. Hasil dari proses ini diperoleh serbuk simplisia sebanyak 1800 gram, terjadi penyusutan sekitar 200 gram karena dalam proses pengeringan biji yang tadinya basah menjadi kering. Berikut adalah perhitungan rendemen susut pengeringan :

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{berat simplisia kering}}{\text{berat simplisia basah}} \times 100 \% \dots\dots (2)$$

Dari proses pengeringan didapat 1800 gram serbuk kering dengan rendemen 90%.

Proses ekstraksi untuk menarik senyawa yang terkandung dalam biji mahoni dilakukan dengan cara infundasi dan perkolasi dengan pelarut air dan etanol. Pelarut aquadest untuk infundasi 750 ml dengan berat serbuk