

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah Ekperimental. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan untuk mengetahui akibat yang ditimbulkan dari suatu perlakuan yang diberikan secara sengaja oleh peneliti (Hadi, 1985 dalam Fitriana, 2018 ).

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

1. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakognosi D3 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Mataram dan Laboratorium Kesehatan Pengujian Kalibrasi Dan Penunjang Medis.
2. Penelitian ini akan dilaksanakan dari bulan Mei /Agustus 2019.

#### **3.3 Variabel Penelitian**

- a. Variable bebas adalah ekstrak etanol daging biji buah kadara dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.
- b. Variabel terikat adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

#### **3.4 Definisi Operasional**

##### **3.4.1 Definisi Operasional**

- a. Ekstrak daging biji buah kadara adalah sediaan pekat yang didapat dengan mengekstraksi zat aktif dari daging biji buah kadara dengan menggunakan pelarut etanol 70%.

- b. Bakteri *Staphylococcus aureus* adalah bakteri gram-positif yang di dapatkan di Laboratorium Kesehatan Pengujian Kalibrasi Dan Penunjang Medis, berwarna putih yang berbentuk kokus menyerupai bola dengan garis tengah  $\pm 1 \mu\text{m}$  (menyerupai buah anggur).
- c. Metode sumuran serupa dengan metode difusi disk, dimana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen yang akan diuji.

### 3.5 Parameter pengamatan

Parameter yang akan diamati dalam penelitian ini yaitu mengamati diameter zona bening atau hambatan pada medium setelah pemberian antara ekstrak daging biji buah kadara dan pembanding yaitu ciprofloxacin golongan quinolon dalam menghambat pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus* secara in vitro.

#### 3.5.1 Peralatan penelitian

Petridis, rak tabung, timbangan, cawan porselin, lemari penanaman, tabung reaksi, yellow tip, mikro pipet, inkubator, swab kapas steril, batang pengaduk, termometer, blender, gelas ukur, pipet tetes, jarum ose, toples kaca, api bunsen, pinset.

#### 3.5.2 Bahan Penelitian

Ekstrak daging biji buah kadara, etanol 70 %, bakteri *staphylococcus aureus*, Media Muller Hinton Agar (MHA), Antibiotik ciprofloxacin dan aquadest.

### 3.6 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.6.1 Pembuatan Ekstrak

Ada beberapa tahapan dalam pembuatan sampel yaitu :

a. Pembuatan simplisia daging biji buah kadara

Adapun beberapa tahapan dalam pembuatan simplisia daging biji buah kadara (Gunawan dan Mulyani, 2004), yaitu :

1. Pengumpulan bahan baku

Kadara diambil dari pohonnya langsung dikebun Desa Teke Kecamatan Palibelo Kabupaten Bima NTB

2. Sortasi basah

Perlakuan ini bertujuan untuk memisahkan kotoran atau bahan asing yang tidak diinginkan.

3. Pencucian

Pencucian dilakukan menggunakan air bersih yang mengalir sehingga benar-benar bersih dari kotoran yang menempel.

4. Pembuatan serbuk

Setelah digoreng kemudian di pisahkan daging dengan cangkang dan selanjutnya daging biji buah kadara dilanjutkan dengan pembuatan serbuk menggunakan blender.

b. Pembuatan Ekstrak Etanol Daging Biji Buah Kadara (*caesalpnia bonduc*)

Pembuatan ekstrak daging biji buah kadara dilakukan dengan metode remaserasi, dengan cara serbuk daging biji buah

kadara diambil 700 gram kemudian dimasukkan ke dalam bejana yang telah disediakan dan direndam dengan pelarut dengan etanol bahan perbandingan pelarut 1 : 1, yaitu 700 ml pelarut, kemudian ditutup. Lakukan penggojokan secara konstan pada suhu ruangan sampai seluruh bahan tercampur dengan baik, kemudian diamkan selama 1 hari dan dilakukan pemisahan pelarut dari residu, kemudian di remaserasi kembali dengan pelarut 1 : 1 sambil dilakukan penggojokan sesekali. Selanjutnya disaring dengan kain flannel dan diperas. Hasil filtrat ditampung dalam *beaker glass*, kemudian dipekatkan dengan cara diuapkan pelarutnya menggunakan Water bath pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak yang pekat.

Ekstrak pekat ditimbang dan dihitung randemennya dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\% \text{Rendemen (b/b)} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot serbuk}} \times 100\%$$

### 3.7 Uji Kualitatif

1. Uji alkaloid dilakukan dengan mengambil 2 mL sampel daging biji buah kadara yang telah diekstraksi dengan pelarut etanol ke dalam tabung reaksi yang. Setelah itu ekstrak ditambah dengan 5 tetes reagen Dragendroff. Jika larutan terbentuk warna jingga maka positif mengandung alkaloid. (Mustikasari & Ariyani, 2010)

2. Uji flavonoid dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 2 mL sampel ekstrak daging biji buah kadara yang telah diekstraksi dengan etanol dan diencerkan dengan aquades 1 ml, kemudian dipanaskan kurang lebih 5 menit. Setelah dipanaskan ditambahkan dengan 0,1 gram logam Mg dan 5 tetes HCl pekat. Jika larutan terbentuk warna kuning jingga sampai merah, maka positif mengandung flavonoid (Mustikasari & Ariyani, 2010)
3. Uji terpenoid dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 2 mL sampel ekstrak daging biji buah kadara yang telah diekstraksi dengan etanol. Setelah itu ekstrak, ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Jika larutan terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid (Mukriani 2011)
4. Uji tanin dilakukan dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 2 mL sampel daging biji buah kadara yang telah diekstraksi dengan pelarut etanol, kemudian encerkan dengan aquadest 1 ml dan dipanaskan dalam penangas air kurang lebih 5 menit. Setelah dipanaskan ditambahkan beberapa tetes FeCl<sub>3</sub> 1%. Jika larutan terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman maka positif mengandung tanin (Marlinda dkk, 2012).
5. Uji saponin dilakukan dengan cara sampel daging biji buah kadara yang telah diekstraksi dengan pelarut etanol dididihkan dengan 20 ml air dalam penangas air. Filtrat dikocok dan didiamkan selama 15 menit.

Terbentuknya busa yang stabil berarti positif terdapat saponin (Uyatmi, Inorih, & Marwanto, 2019)

Uji daya hambat menggunakan metode sumuran, ekstrak yang telah diperoleh dibuat sebanyak 5 macam konsentrasi sesuai dengan perlakuan yang telah ditentukan yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100 % dengan perhitungan sebagai berikut :

1. Perlakuan A 100 % = 5 gram ekstrak + 5 ml aquadest steril.

2. Perlakuan B (80 % b/v) =  $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$

$$100 = 2 \times 80$$

$$= \frac{160}{100}$$

$$= 1.6 \text{ add } 4 \text{ ml}$$

3. Perlakuan C (60 % b/v) =  $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$

$$100 = 2 \times 60$$

$$= \frac{120}{100}$$

$$= 1.2 \text{ add } 4 \text{ ml}$$

4. Perlakuan D (40 % b/v) =  $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$

$$100 = 2 \times 40$$

$$= \frac{80}{100}$$

$$= 0,8 \text{ add } 4 \text{ ml}$$

5. Perlakuan B (20 % b/v) =  $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$

$$100 = 2 \times 20$$

$$= \frac{40}{100}$$

$$= 0,4 \text{ add } 4 \text{ ml}$$

### 3.8 Cara kerja pengujian ekstrak daging biji buah kadara dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Uji untuk mengetahui daya hambat ekstrak etanol daging biji buah kadara (*caesalpnia bonduc*) terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan cara yaitu menyiapkan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kepekaan 0,5 unit Mc. Farland , selanjutnya menyiapkan media MHA yang kemudian dioleskan bakteri dengan menggunakan swap kapas steril sehingga merata pada permukaan media, dan diinkubasi 5-15 menit pada suhu kamar. Selanjutnya dibuat lubang-lubang sumuran menggunakan *yellow tip* steril yang ditekan pada media, dengan menggunakan dispenser. Pipetkan masing-masing 50  $\mu$ L ekstrak daging biji buah kadara konsentrasi 20 %, 40%, 60 % 80 % dan 100 %, letakkan pada masing-masing sumuran. Disamping itu dengan dispenser pipetkan 50  $\mu$ L kontrol positif (*Ciprofloxacin*) dan kontrol negatif (Aquadest). Yang dilakukan selanjutnya adalah diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam dengan keadaan petri dish tidak terbalik agar ekstrak daging biji buah kadara tidak tumpah, kemudian dilihat adanya hambatan dengan menggunakan penggaris diukur besarnya zona hambatan, dan selanjutnya menghitung standar deviasi.

### 3.9 Analisa Data

Analisis data pada penelitian ini dibuat dengan cara menggambarkan secara deskriptif. Data uji kualitatif dikumpulkan dalam bentuk gambar dan

tabulasi. Data yang telah didapat dari hasil pengamatan uji daya hambat akan diolah dengan menggunakan *software statistik* SPSS 16.0 untuk melihat apakah ada perbedaan daya hambat yang bermakna dari masing-masing uji yang mengandung kontrol positif, kontrol negatif, dan berbagai konsentrasi ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Data pada penelitian ini berupa variabel numerik lebih dari 2 kelompok sehingga menggunakan uji *One Way Anova* (Eko Prayoga, 2013). Jika distribusi data normal, dilanjutkan dengan menggunakan uji analisis *One Way Anova*. Berikut ini adalah langkah-langkah melakukan uji analisis *One Way Anova*:

1. Memeriksa syarat uji parametrik *one way Anova* untuk lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan :
  - a. Distribusi data harus normal,
  - b. Varians data harus sama,
2. Jika memenuhi syarat uji parametrik (distribusi data normal, varians sama), dipilih uji *one way Anova*,
3. Jika variabel transformasi data memenuhi syarat, maka dipilih uji parametrik *one way Anova*,

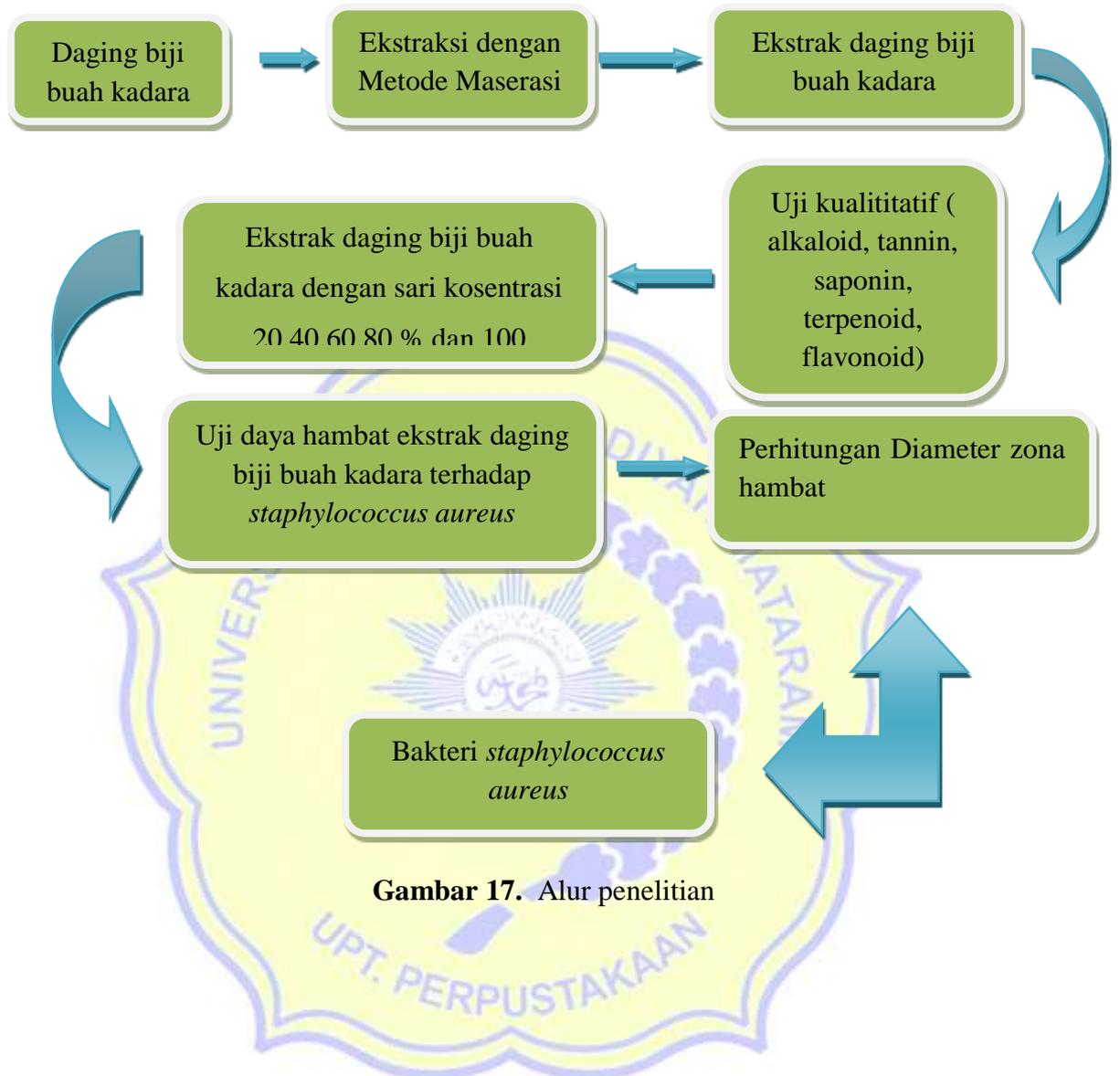
Jika variabel hasil transformasi tidak memenuhi syarat, maka alternatifnya dipilih uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*, jika pada uji *one way Anova* atau *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai  $p < 0,05$  dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc* pada taraf kepercayaan 0,05 (Dahlan, 2011).

Hipotesis :

1.  $H_0$  = tidak ada perbedaan yang bermakna antara konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% ( $>0,05$ )
2.  $H_a$  = ada perbedaan yang bermakna antara konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% ( $<0,05$ )



### 3.10 Alur Penelitian



Gambar 17. Alur penelitian