

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Determinasi tanaman dan susut pengeringan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Proses ekstraksi, identifikasi senyawa, uji bebas etanol dilakukan di Laboratorium Farmasi Mikrobiologi, Bahan Alam, Sintesis, dan Farmakognosi Universitas An Nuur Purwodadi. Sedangkan untuk pengujian antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret.

2. Waktu

Penelitian pada bulan April – Agustus 2023.

B. Jenis dan Rancangan Penelitian

1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimen laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun belimbing manis dalam menghambat perkembangan mikroba dengan melihat zona bening pada media pertumbuhan bakteri.

2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian terdiri dari 4 tahap:

- a. Pembuatan simplisia daun belimbing manis dimulai dari pengumpulan sampel, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, dan sortasi kering untuk memperoleh simplisia kering yang berkualitas, juga dilakukan determinasi tanaman untuk mengetahui kepastian varietas tanaman.
- b. Ekstrak daun belimbing manis dilakukan dengan maserasi memakai etanol 70%.
- c. Uji efektivitas antibakteri ekstrak daun belimbing manis diawali dengan proses sterilisasi menggunakan autoklaf, penyiapan bakteri uji yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* yang murni, pembuatan

media uji yaitu menggunakan media uji media MHA (*Muler Hinton Agar*), pembuatan konsentrasi uji menggunakan persentase 60%, 75% dan 90% setelah itu pengujian aktivitas antibakteri dengan cara difusi cakram.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Merupakan seluruh bagian jumlah anggota yang memiliki asal dari satu kesatuan untuk melihat karakternya berdasarkan inferensi dan generalisasi. Daun belimbing manis adalah populasi.

2. Sampel

Sampel daun belimbing manis didapatkan dari Desa Tarub Kecamatan Tawangharjo Kabupaten Grobogan. Daun dikumpulkan ketika tanaman telah mencapai pertumbuhan maksimal dan telah memasuki masa matang fisiologis. Hal ini berlaku untuk tanaman yang berusia 2-3 tahun dan telah mulai berbunga serta berbuah. Daun diambil dari tanaman yang melakukan fotosintesis pada rentang waktu pukul 09.00-12.00 ketika reaksi fotosintesis sedang berlangsung dengan sempurna (Mukhriani, 2014). Saat pengumpulan daun yang dikumpulkan berupa daun yang tua, segar dan terletak pada posisi keempat setiap cabang. Pemilihan posisi keempat disetiap cabang untuk mengurangi gangguan metabolisme tanaman yang bisa disebabkan karena pengambilan daun terlalu banyak dalam satu pohon (Mardhatillah *et al.*, 2022).

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Ekstrak etanol 70 % daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L.).

2. Klasifikasi variabel utama

a. Variabel bebas

Variabel yang mampu mempengaruhi variabel terganggunya variabel terganggun yaitu kadar konsentrasi ekstrak yang digunakan. Variasi persentase ekstrak yaitu dalam 65%, 75% dan 90%.

b. Variabel terganggun

Aktivitas antibakteri ekstrak daun belimbing manis terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan variabel terganggun, yaitu merupakan hasil dari pengaruh variabel bebas.

c. Variabel terkendali

Variabel ini merupakan variabel yang diperlukan untuk referensi penelitian selanjutnya sehingga perlunya ditetapkan kualifikasinya agar hasilnya tepat. Isolat bakteri, metode ekstraksi serta sterilisasi alat dan bahan digunakan sebagai variabel terkendali dari penelitian ini.

E. Definisi Operasional

1. Daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L.)

Sampel daun belimbing manis berasal dari Desa Tarub Kecamatan Tawangharjo Kabupaten Grobogan. Saat memilih sampel, peneliti menggunakan tanaman yang homogen sehingga kadar fitokimianya sama. Untuk pemilihan sampel daunnya tua, segar serta terletak pada posisi keempat setiap cabang dan daunnya diambil diwaktu pagi hari.

2. Serbuk

Pembuatan serbuk diawali dengan pengambilan sampel yang kemudian dilakukan sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, dan sortasi kering. Pembuatan ekstrak sampel dilakukan dengan maserasi dengan bantuan pelarut etanol 70%.

3. Konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing manis dibuat dengan konsentrasi ekstrak 60%, 75% dan 90%.

4. Pembuatan kontrol positif dan kontrol negatif. DMSO digunakan sebagai kontrol negatif sedangkan kontrol positif adalah gentamicin.

5. Bakteri adalah bakteri *Staphylococcus aureus*.

6. Uji antibakteri menggunakan metode difusi cakram
7. Diameter zona hambat perkembangan atau pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diamati dari kertas cakram yang telah diberikan konsentrasi ekstrak yang menunjukkan wilayah transparan atau zona yang tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Pengukuran zona transparan ini dilakukan menggunakan alat pengukur jarak atau jangka sorong.

F. Alat dan Bahan

1. Alat berupa gelas ukur (Pyrex[®]), *beaker glass* (Pyrex[®]), *chamber*, timbangan analitik (OEM[®]), *autoclave* (*Smic model YX-280 B*[®]), LAF (*laminar air flow*), kapas lidi, cawan petri (Pyrex[®]), cawan porselen (Pyrex[®]), *vortex* (Gemmy[®]), rak tabung reaksi, plastik *wrap*, bunsen, *paper disk*, *Erlenmeyer* (Pyrex[®]), pipet tetes (OneMed[®]), *aluminium foil*, jangka sorong, jarum *ose*, gunting, *rotary evaporator* (*BOne*[®]), spatula, kertas saring, *blender* (Miyako[®]), oven (Mettler[®]) dan botol besar gelap.
2. Bahan berupa daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L.) yang sudah kering, aquadest (Merck[®]), etanol 70% (Merck[®]), *dragendorff*, *mayer*, *wagner*, magnesium (Merck[®]), HCl pekat (Merck[®]), methanol (Merck[®]), FeCl₃, besi (III) klorida 10%, CH₃COOH glasial, HCl₂N, plat KLT (Merck[®]), asam sulfat pekat (Smartlab[®]), ammonia (Merck[®]), *Lieberman-Buchard*, NaCl fisiologis (Merck[®]), asam sulfat 1%, etil asetat, N-butanol, kloroform (Merck[®]), *β-sitosterol*, sapogenin, kuarsetin, katekin, piperin, *mueller hinton* agar (Merck[®]), bakteri *Staphylococcus aureus*, *gentamicin disk* dan barium klorida, DMSO 10% (Corning[®]).

G. Jalannya Penelitian

1. Determinasi

Pengujian di B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional).

2. Pembuatan Simplisia

Daun belimbing manis dikumpulkan dari perkebunan belimbing di desa Tarub, kemudian tanaman dibersihkan, dirajang dan dikeringkan. Pengeringan dengan oven pada suhu 60°C, setelah kering diserbuk memakai *blender* dan disimpan ditempat kering sebelum digunakan (Putri, 2021).

3. Pembuatan Ekstrak

Serbuk daun belimbing manis dilakukan penyarian menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan melakukan penimbangan simplisia sebanyak 1 kg kemudian direndam dengan pelarut sebanyak 10 liter, kemudian diamkan selama 18 jam pada 6 jam pertama aduk sesekali. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring, lalu ulangi kembali dengan memberikan pelarut 5 liter pada maserat tadi (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Kemudian dilakukan penguapan pelarut memakai *rotary evaporator* dengan suhu 50°C setelah volume pelarut berkurang ekstrak dikentalkan dengan oven di suhu 50°C (Susanty *et al.*, 2016).

4. Parameter Standar ekstrak

a. Parameter Spesifik

1) Uji Organoleptik

Ini adalah pengujian fisik yang menggunakan indra manusia untuk menggambarkan bentuk, aroma, warna, rasa, dan ukuran (Rustam, 2018).

2) Pengujian Kandungan Ekstrak

a) Teknik tabung menggunakan reagen untuk mengidentifikasi senyawa ekstrak daun belimbing manis.

(1) Identifikasi Senyawa Alkaloid

Menyiapkan ekstrak sebanyak 0,5 gram ditambahkan 1 ml HCl_2N lalu bagi menjadi tiga tabung. Tabung satu dimasukan tambahan berupa 3 tetes

pereaksi *dragendorff* dan kedua tabung lainnya dimasukan *mayer* 3 tetes dan tabung satunya *wagner* 3 tetes. Terdapat kandungan alkaloid jika tabung pertama terdapat endapan putih dan kedua tabung lainnya ada endapan coklat kemerahan (Kinasih, 2021).

(2) Identifikasi Senyawa Flavonoid

Menimbang 0,5 gr ekstrak dilarutkan dengan metanol sebanyak 2 ml kemudian panaskan, setelah dingin 0,1 gram magnesium dan 0,5 ml HCL pekat ditambahkan. Terdeteksinya kandungan flavonoid yaitu tabung reaksi memberikan warna kuning sampai jingga (Rahman, 2020).

(3) Identifikasi Senyawa Tanin

Memasukan larutan besi (III) klorida 10% kedalam tabung reaksi kemudian menambahkan ekstrak sebanyak 1 ml. Senyawa ini dapat terdeteksi apabila ada endapan berwarna biru, hitam kehijauan (Rahman, 2020).

(4) Identifikasi Senyawa Triterpenoid atau Steroid

Sebanyak 2 ml ekstrak dicampur dengan 10 tetes CH_3COOH glasial dan 2 tetes H_2SO_4 pekat. Larutan tersebut dikocok perlahan setelah itu tunggu sebentar dan diamkan. Kandungan steroid jika terdapat endapan berwarna biru atau hijau, namun jika berwarna merah dan ungu mengandung triterpenoid (Rahman, 2020).

(5) Identifikasi Senyawa Saponin

Melarutkan 2-3 ml ekstrak dengan 10 ml air panas, setelah dingin tambahkan HCl 2N dan kocok sampai terdapat buih. Buih setinggi 1-10 cm dalam waktu 10 menit menunjukan sampel mengandung saponin (Rahman, 2020).

b) Uji Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L.) diambil sedikit menggunakan pipa kapiler dan ditotolkan ke plat silika gel, kemudian meletakkan plat ke dalam chamber yang sudah diberi eluen namun harus menunggu eluen dalam keadaan jenuh. Untuk memastikan kejenuhan pelarut di dalam ruang, kertas saring dimasukkan ke dalamnya. Ruang dianggap jenuh jika kertas saring terlihat basah. Setelah itu, plat dimasukkan chamber dibiarkan terelusi mencapai batas plat atas. Kemudian mengeluarkan plat dan mengamati dibawah sinar UV 366 dan UV 254, setelah itu semprot dengan penampak noda dan perubahan warnanya diamati pada sinar tampak (Muzemmila *et al.*, 2017).

1) Alkaloid

Fase gerak : Etil asetat : metanol : air (6:4:2)
 Pembanding : Piperin (Yanty *et al.*, 2019)
 Penampak noda : *Dragendroff*
 Hasil : Noda berwarna hijau kekuningan pada lampu 366 dan lampu 254 kuning (Fajrin *et al.*, 2019).

2) Flavonoid

Fase gerak : N-butanol:asam asetat: air (4:1:5)
 Pembanding : Kuarsetin
 Penampak noda : Amonia (Jawa *et al.*, 2020)
 Hasil : Noda bercak berwarna biru pada lampu UV 366 dan berwarna hitam pada lampu UV 254 (Jawa *et al.*, 2020).

3) Tanin

Fase gerak : Methanol : air (6:4)

Pembanding : Katekin
 Penampak noda : FeCl_3 (Jawa *et al.*, 2020)
 Hasil : Noda bercak berwarna hitam pada lampu UV 366 dan UV 254 (Yuda *et al.*, 2017)

4) Triterpenoid

Fase gerak : N-heksan : etil asetat (5 : 5).
 Pembanding : β -sitosterol
 Penampak noda : *Lieberman Bouchard* (Zaini *et al.*, 2020)
 Hasil : Noda bercak biru pada lampu UV 366 (Siti *et al.*, 2020) dan hitam pada lampu UV 254 (Yuda *et al.*, 2017)

5) Saponin

Fase gerak : Kloroform : metanol : air (10:7:4)
 Pembanding : Sapogenin
 Penampak noda : *Lieberman Bouchard*
 Hasil : Noda berwarna hijau kekuningan pada lampu UV 366 dan 254 (Zaini *et al.*, 2020).

b. Parameter Non Spesifik

1) Rendemen ekstrak

Perhitungan kadar rendemen ekstrak daun belimbing manis dilakukan dengan melihat perbandingan antara berat awal dan berat akhir ekstrak (Maradona, 2013).

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang dihasilkan}}{\text{Bobot awal simplisia}} \times 100\%$$

2) Susut pengeringan

Dalam melakukan penentuan susut pengeringan simplisia dilakukan menggunakan *moisture balance*, yaitu dengan

memasukan serbuk sebanyak ± 1 gr kedalam alat *moisture balance* kemudian diatur suhu 105°C , selama 10 menit setelah itu alat akan menghasilkan nilai susut pengeringan sampel yang di uji (Dharma *et al.*, 2023).

3) Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan mencampurkan ekstrak dengan H_2SO_4 dan CH_3COOH , kemudian dipanaskan. Hasil tes dianggap negatif jika tidak tercium aroma eter yang khas (Kurniawati, 2015).

5. Uji Antibakteri

Pengujian antibakteri untuk memeriksa keefektifan daya penghambat pertumbuhan bakteri pada sampel pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Ekstrak etanol daun belimbing manis yang digunakan adalah variasi konsentrasi 60%, 75%, dan 90%. Difusi cakram dipilih sebagai metode pengujian antibakteri dalam penelitian ini dikarenakan kelebihanannya yang mudah, tidak membutuhkan banyak peralatan dan berbiaya murah. Berikut adalah tahapan pengujian antibakteri:

a. Sterilisasi

Semua peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian disterilkan dengan *autoclave* yaitu dengan mengatur suhu alat 121°C dan tekanan 1 atm dalam waktu 15 menit (Utami *et al.*, 2017).

b. Pembuatan medium

Pembuatan media MHA atau *Muler Hinton Agar* dilakukan dengan menimbang 38 gr kemudian melarutkan dengan aquades sebanyak 1 liter, untuk proses sterilisasi dengan autoklaf di suhu 121°C dalam waktu 20 menit, kemudian media dituang pada cawan petri steril dan dipadatkan dan simpan di lemari es (Utomo *et al.*, 2018).

c. Penyiapan Mikroba Uji

Mikroba yang dipakai merupakan 1 ose *Staphylococcus aureus* yang berasal dari kultur murni kemudian dipindahkan dengan menggoreskannya pada media MHA dan dilakukan pemeliharaan atau diinkubasi dengan suhu 37°C dalam waktu satu hari atau 24 jam (Utami *et al.*, 2017).

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Mengambil satu ose mikroba uji dan melarutkannya dengan NaCl sebanyak 2 ml sampai sesuai dengan pembanding berupa larutan *Mac Farland*.

- 1) Pembuatan larutan NaCl fisiologis dengan menimbang NaCl sejumlah 0,9 gram dan aquades sebanyak 100 ml digunakan untuk melarutkan hingga homogen.
- 2) Larutan standar *Mac Farland* 0,5 dibuat dengan mencampurkan larutan 0,9 ml asam sulfat 1% dengan 0,5 ml barium klorida dalam satu tabung dan mengocok sampai homogen. (Thressia, 2018).

e. Pembuatan Konsentrasi Uji

- 1) Kontrol (-) adalah DMSO 5%
- 2) Kontrol (+) adalah disk antibiotik gentamisin 10µg.
- 3) Pembuatan konsentrasi uji 60%
- 4) Pembuatan konsentrasi uji 75%
- 5) Pembuatan konsentrasi uji 90%

Pengenceran ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan DMSO yang dihitung menggunakan rumus :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

Keterangan:

V_1 : Volume larutan yang akan diencerkan (ml)

M_1 : Konsentrasi ekstrak yang tersedia (%)

V_2 : Volume larutan yang diinginkan (ml)

M_1 : Konsentrasi ekstrak yang diinginkan (%)

Konsentrasi 60%, 75%, dan 90% dari ekstrak daun belimbing manis digunakan dalam pengujian untuk menguji perbedaan tingkat daya antibakteri masing-masing konsentrasi. Kontrol positif gentamicin digunakan karena memiliki kemampuan menurunkan tingkat pertumbuhan bakteri gram positif dan negatif yang tinggi. Oleh karena itu, *gentamicin* dapat mematikan bakteri *Staphylococcus aureus* (Basit *et al.*, 2019). Pelarut DMSO merupakan pelarut yang tidak memberi pengaruh terhadap bakteri yang digunakan (Rahmi *et al.*, 2020)

f. Pemeriksaan Aktivitas Antibakteri

Untuk menguji terdapatnya antibakteri metode difusi kertas cakram dengan langkah-langkah dibawah ini:

- 1) Menyiapkan 10 ml MHA yang steril dan sudah didinginkan di suhu sekitar 45°C.
- 2) Menuangkan MHA dan memadatkannya pada cawan petri dan dilakukan pengadukan dengan *vortex mixer* hingga homogen. Bakteri uji dituangkan ke atas permukaan MHA dengan pengenceran 10^{-5} cfu/mL
- 3) Media dilakukan pemeliharaan dalam waktu sehari dengan cara dan ruangan yang steril.
- 4) *Paper disks* direndam dalam DMSO 10% dan ekstrak daun belimbing manis.
- 5) Meletakkan *paper disk* pada cawan yang sudah berisi media bakteri. Tiap cakram kertas dimasukkan dengan jarak teratur untuk menghindari tumpang tindih zona hambatan, kemudian tambahkan label dengan tepat.
- 6) Inkubasi media dalam waktu sehari di dalam ruang steril.
- 7) Daerah keruh dan daerah bening digunakan untuk melihat daya aktif antibakteri pada sampel daun belimbing manis daerah bening menunjukkan terdapatnya aktivitas antibakteri sedangkan daerah keruh menunjukkan tidak terdapatnya aktivitas antibakteri.

Ukuran diameter zona jernih diukur dengan jangka sorong (Utami *et al.*, 2017).

6. Analisis Data

Hasil penelitian mencakup hasil parameter ekstrak seperti rendemen ekstrak, susut pengeringan, jumlah kadar air, dan bebas etanol. Perolehan data dilampirkan berupa tabel sedangkan untuk perolehan data uji antibakteri ekstrak daun belimbing manis dilakukan analisis menggunakan software SPSS 25. Dalam melakukan analisis, dilakukan uji statistik yang terdiri dari:

a. Uji normalitas

Shapiro-Wilk melihat jika data terdistribusi normal atau tidak.

b. Uji homogenitas

Dalam pengujian homogenitas menggunakan *levane test* untuk melihat apakah semua kelompok perlakuan memiliki data yang homogeny, dengan syarat apabila nilai $<0,05$ untuk signifikasi menunjukkan bahwa data tidak homogen. Namun apabila signifikansinya $>0,05$ data disebut homogen.

c. Uji *One Way Anova*

One Way Anova adalah jenis analisa yang dipilih untuk penelitian yang memiliki hanya dengan variabel bebas dan terikatnya hanya berjumlah satu, selain itu digunakan untuk data yang sudah terdistribusi normal dan dikatakan homogen. Pengujian ini dilakukan untuk melihat perbedaan rata-rata diameter hambat ekstrak daun belimbing manis pada masing masing konsentrasi uji dengan asumsi :

H_0 : nilai $\text{sig} \geq 0,05$ tidak terdapat perbedaan signifikan

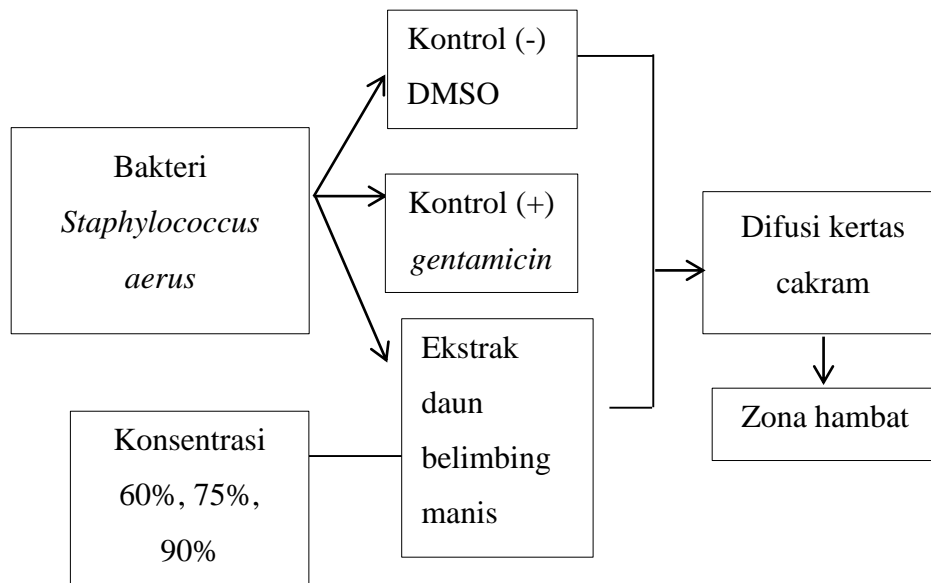
H_1 : nilai $\text{sig} \leq 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan signifikan

d. Uji *Post Hoc*

Analisa ini digunakan jika pada data terdapat perbedaan yang signifikan (Indriyani *et al.*, 2020).

H. Kerangka Konsep

Gambar 3.1 Kerangka Konsep



I. Hipotesis

1. Pelarut etanol 70% mampu menghasilkan ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*).
2. Terdapat kandungan senyawa kimia pada ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*).
3. Ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L.*) dengan konsentrasi etanol 70% yang diperoleh dari desa Tarub efektif dalam melawan bakteri *Staphylococcus aureus*.

J. Kerangka Penelitian

Gambar 3. 2 Kerangka Penelitian

