

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Bahan

Bahan sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah buah berenuk (*Crecentia kujete* L), etanol 70%, bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Media yang digunakan adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA), NaCl 0,9%.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut etanol 70%, pelarut N-heksana, DMSO 10%, aquadestilata, larutan dragendrof, FeCl₃, asam asetat, asam sulfat pekat, H₂O₂, HCl, NH₃, kloroform, anhidrida asetat.

3.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, botol maserasi, cawan penguap, gelas kimia, pembakar spirtus, timbangan analitik, tabung reaksi, rak tabung, erlenmeyer, cawan petri, kaca arloji, gelas ukur, spatula, sendok tanduk, pinset, lubang sumuran, inkubator, pipet, jarum ose, autoklap, vial, mikropipet, *rotary evaporator*, pipet volum, oven, kertas saring.

3.3. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Universitas Buana Perjuangan Karawang. Waktu penelitian dimulai dari Februari sampai dengan Agustus 2020.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Simplisia

Buah berenuk segar diambil bagian daging buah ditimbang 1000 mg kemudian di blender hingga halus (Monica, 2019).

3.4.2 Pembuatan Ekstrak Etanol dan n-Heksana Buah Berenuk

Pembuatan ekstrak etanol buah berenuk dilakukan dengan menggunakan metode maserasi (perendaman), sedangkan pembuatan ekstrak n-heksana dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair (partisi).

Buah berenuk yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 1000 g, lalu dimasukkan dalam botol kaca gelap kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:5 yaitu sebanyak 5000 mL (Timoteus, 2014). Kemudian ditutup rapat dibiarkan selama 2x24 jam di tempat yang terlindung dari sinar matahari langsung sambil diaduk sesekali, setelah 2x24 jam disaring dan dipisahkan

ampas dan filtratnya. Filtrat dipekatkan di rotary evaporator pada suhu dibawah 40°C sampai diperoleh ekstrak etanol kental (Raymon *et al.*, 2016; Sari, 2013).

Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang sebanyak 10 gram kemudian dipartisikan dengan menggunakan pelarut etanol dan n-heksana perbandingan 1:1 dengan cara melarutkan ekstrak kental dalam pelarut etanol 70% kemudian dimasukan dalam corong pisah dan menambahkan pelarut n-heksana. Campuran dikocok dan dibiarkan hingga terjadi pemisahan, selanjutnya fase n-heksana dipisahkan dalam residunya dan dimasukan kedalam labu. Ekstraksi cair-cair dilakukan hingga larutan berwarna jernih dan selanjutnya fase n-heksana didiamkan sampai pelarutnya menguap (Sari, 2013) (Asmaliyah *et al.*, 2010).

3.4.3 Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol dan n-heksana buah berenuk. Senyawa yang dianalisis adalah alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, polifenol, kuinon, steroid, dan triterpenoid.

3.4.4 Pembuatan Suspensi Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus Aureus*

Isolat bakteri *E.coli* dan *S.aureus* diremajakan pada media MHA selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya diambil 1 ose dan disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl 0,9% sebanyak 10 mL hingga diperoleh kosentrasi bakteri yang sesuai dengan larutan standar Mc Farland 0,5 atau setara dengan kosentrasi bakteri 10⁸ CFU/mL. Selanjutnya larutan tersebut diencerkan kembali hingga mencapai kosentrasi bakteri 10⁶ CFU/mL (Rini *et al.*, 2017)(Pasril & Yuliasanti, 2014).

3.4.5 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Sebanyak 9,54 g MHA dimasukan dalam gelas kimia kemudian ditambahkan aquadest kemudian dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Diambil medium MHA sekitar 15 mL masukan kedalam cawan petri biarkan memadat.

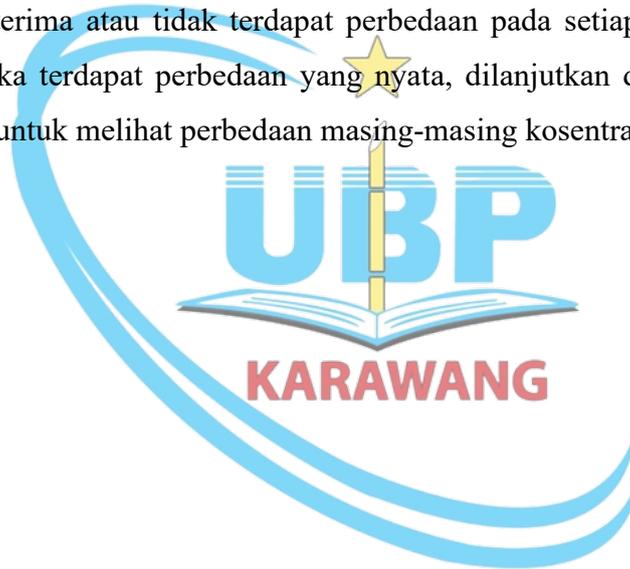
3.4.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar sumuran. Larutan uji ekstrak buah berenuk dan n-heksana masing-masing dibuat dalam berbagai kosentrasi yaitu 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100%. Untuk kontrol positif digunakan ciprofloxacin 5µg dan untuk kontrol negatif digunakan DMSO 10%, kemudian

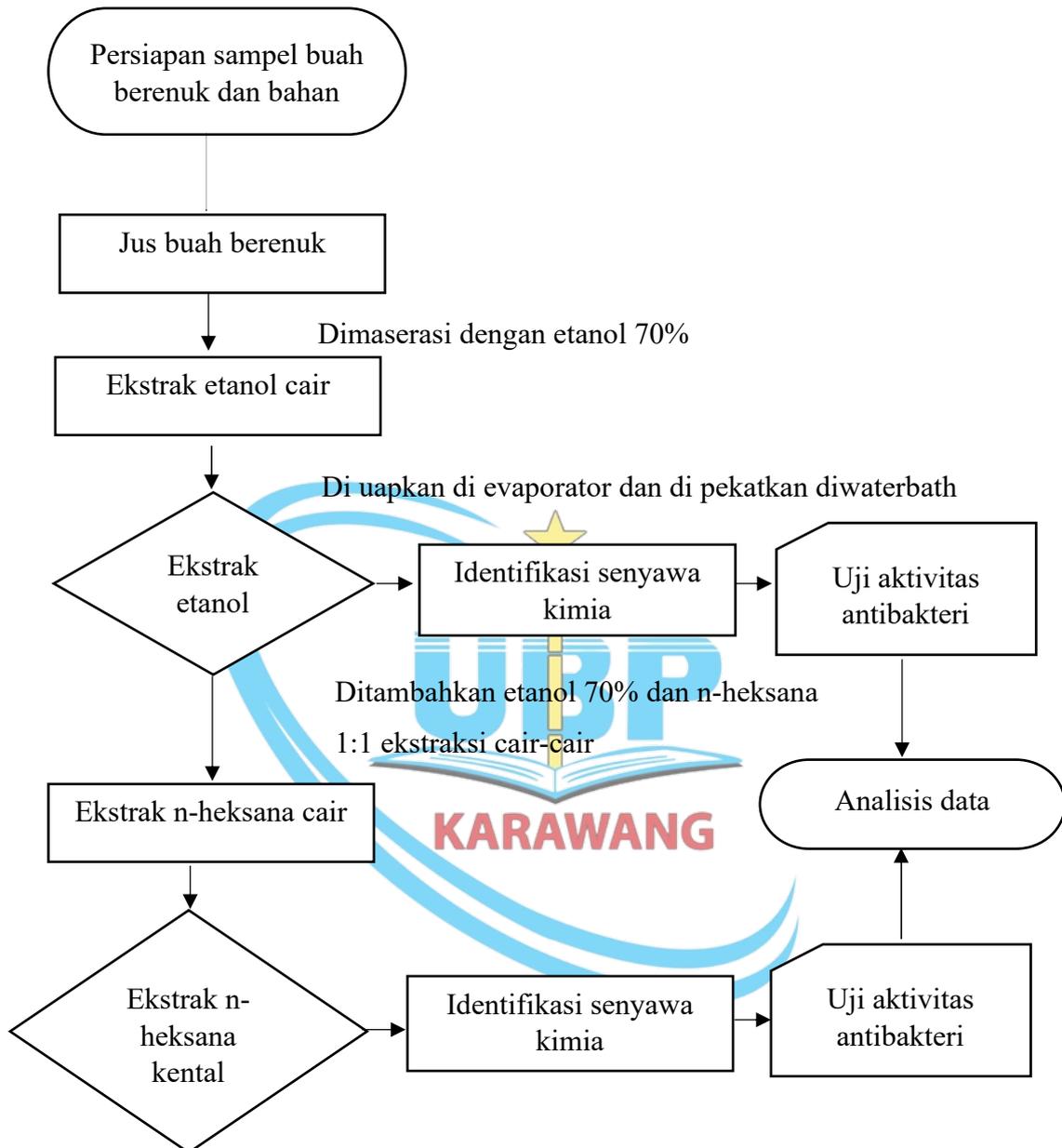
media agar dibuat lubang sumuran dan diisi dengan ekstrak yang akan diuji yang telah ditanami bakteri *Escherchia coli* dan *Staphylacoccus aureus* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati dan diukur diameter zona hambatnya (Prayoga *et al.*, 2013).

3.4.7 Analisis Data

Data penelitian yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *one way* Anova dengan tingkat kepercayaan $\alpha = 95\%$ dengan pengulangan tiga kali uji aktivitas antibakteri untuk ekstrak etanol dan dua kali untuk ekstrak n-heksana. Analisis data ini bertujuan untuk melihat perbedaan bermakna pada setiap konsentrasi ekstrak. Jika nilai sig lebih kecil dari 0,05 maka H_0 ditolak atau terdapat perbedaan pada setiap konsentrasi ekstrak dan jika nilai sig lebih besar dari 0,05 maka H_0 diterima atau tidak terdapat perbedaan pada setiap konsentrasi ekstrak. Kemudian jika terdapat perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan uji Post Hoc Tukey HSD untuk melihat perbedaan masing-masing konsentrasi ekstrak.



3.5. Diagram Alir



Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian