

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian adalah penelitian kuantitatif bentuk *true experimental design* fraksi etil asetat propolis lebah kelulut *Geniotrigona thoracica* menggunakan metode DPPH untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada senyawa yang terkandung serta difusi sumuran untuk mengetahui besar hambatan bakteri

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek
Fraksi etil asetat lebah kelulut *Geniotrigona thoracica*.
2. Objek
aktivitas antioksidan dan aktivitas antibakteri dari Fraksi Etil Asetat lebah kelulut *Geniotrigona thoracica*.

C. Tempat dan waktu Penelitian

1. Tempat penelitian
Proses ekstraksi dan fraksinasi dilakukan di Laboratorium kimia bahan alam, Fakultas farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur. Uji antioksidan dilakukan di Laboratorium kimia, Fakultas farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur. Uji antibakteri dilakukan di laboratorium Mikrobiologi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Samarinda.
2. Waktu penelitian
Pada bulan Oktober 2021 sampai dengan Februari 2022

D. Definisi Operasional

1. Variabel bebas
Konsentrasi fraksi semi polar etil asetat propolis lebah kelulut *Geniotrigona thoracica*.
2. Variabel terikat
IC₅₀ penangkapan radikal dan zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.
3. Variabel terkontrol
Konsentrasi DPPH, waktu inkubasi, pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat
Alat-alat gelas, cawan porselen, waterbath, timbangan analitik, spektrofotometer Uv-Vis, spatula, blender, corong pisah, batang pengaduk dan tabung reaksi, mikropipet, kuvet, vortex dan rak tabung.
2. Bahan
Sampel propolis lebah kelulut *Geniotrigona thoracica* (PGT) (diambil dari wilayah Samarinda, Kalimantan Timur), Metanol, etil asetat, aquadest, HCL pekat, pereaksi dragendorff, NAOH 1%, kloroform, Asam sulfat pekat, timbal asetat 1%, DPPH, vitamin C, nutrisi agar, bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, acetone, thiamphenicol, kertas saring dan aluminium foil.

F. Metode Pengumpulan Data

Pengumpulan data pada penelitian ini yaitu dengan data penelitian yang diperoleh dari data primer dan data sekunder. Data primer uji laboratorium pengujian aktivitas antioksidan dan antibakteri, data sekunder dari studi pustaka berupa media cetak elektronik yang valid, berhubungan dan dapat dipertanggung jawabkan secara ilmiah.

G. Teknis Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan data perhitungan *Standar deviasi (SD)* menggunakan *software excel* serta perhitungan inhibisi serapan DPPH dan nilai IC_{50} dari persamaan regensi linear. Rata-rata serta signifikan menggunakan *SPSS* dengan analisis *One Way ANOVA*.

H. Alur Jalannya Penelitian

1. Penyiapan Sampel

Sampel propolis segar diambil dari peternakan lebah lempake Samarinda, Kalimantan Timur dengan jenis lebah *Geniotrigona thoracica*. Sebelum dilakukan ekstraksi propolis disimpan di dalam freezer dengan suhu $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan hingga larutan ekstrak tidak berwarna lagi. Ditimbang 425,8 g propolis mentah lalu dihancurkan, dimasukkan kedalam wadah toples kaca kemudian ditambahkan pelarut metanol kedalam toples disertai dengan pengadukan lalu didiamkan selama 1 hari, kemudian disaring menggunakan corong dan kertas saring dengan tujuan memisahkan antara filtrat dan ampas kedalam erlenmayer. Ampas yang diperoleh dilakukan maserasi dengan menambahkan pelarut metanol kembali dan didiamkan selama sehari, filtrat yang didapat diuapkan menggunakan *waterbath*.

3. Fraksinasi

Ekstrak metanol yang sudah kental ditimbang sebanyak 20g, kemudian dimasukkan kedalam erlenmayer lalu ditambahkan n-heksan sebanyak 200ml. Aduk campuran tersebut, masukkan ke corong pisah dan tambahkan metanol 80% sebanyak 200ml (perbandingan 1:1).

Penggojokan dilakukan selama satu menit, lalu didiamkan sampai terpisah membentuk 2 fase. Penggojokan dilakukan selama satu menit dengan sesekali membuka penutup corong untuk mengeluarkan gas, setelah itu didiamkan sampai terpisah membentuk 2 fase. Pisahkan antara fase metanol dan fase n-heksan kemudian lakukan pengulangan sebanyak 3x dengan menambahkan pelarut n-heksan hingga didapatkan fraksi n-heksan yang bening, setelah itu hasil fraksi n-heksan dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental. Lalu larutkan dalam etil asetat 200ml dan ditambahkan aquadest 200ml, digojok selama 1 menit tunggu hingga membentuk 2 fase, pisahkan dan kentalkan hasil fraksi etil asetat dengan *waterbath*.

4. Uji Fitokimia

Analisis fitokimia menggunakan metode kualitatif untuk mengetahui kandungan berdasarkan perubahan warna (Khairunnisa *et al.*, 2020).

a. Alkaloid

Dimasukan 5 ml fraksi etil asetat dalam tabung reaksi, tambahkan 2 ml HCL pekat, kemudian ditambahkan 1ml pereaksi dragendorf. Dilihat perubahan warna yang terjadi, fraksi mengandung alkaloid jika berwarna merah/ jingga.

b. Flavonoid

Dimasukan 1 ml fraksi etil asetat dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes NAOH 1%, dilihat warna yang terjadi, fraksi mengandung flavonoid jika berwarna kuning terang.

c. Triterpenoid/Steroid

Dimasukan 1 ml fraksi etil asetat kedalam tabung reaksi, Ditambahkan 0,5ml kloroform, kemudian ditambahkan beberapa tetes H₂SO₄. Pekat pada sisi tabung reaksi. Dilihat perubahan warna yang terjadi, fraksi mengandung triterpenoid jika warna menjadi cokelat kemerahan diantara permukaan, fraksi mengandung steroid

jika lapisan atas berwarna merah dan lapisan H_2SO_4 berwarna kuning.

d. Saponin

Dimasukan 1 ml fraksi etil asetat kedalam tabung rekasi, Ditambahkan 2 ml aquadest lalu panaskan menggunakan *hotplate* selama 10 menit, disaring campuran tersebut kemudian filtrat dimasukan dalam tabung rekasi lalu ditambahkan 10ml aquadest, gojok selama 2 menit. Dilihat perubahan yang terjadi, fraksi mengandung saponin jika terdapat buih konstan pada bagian atas.

e. Tanin

Dimasukan 3 ml fraksi etil asetat kedalam tabung reaksi, Ditambahkan 2 tetes $FeCl_3$ 1%. Dilihat perubahan warna yang terjadi, fraksi mengandung tanin jika larutan yang awalnya berwarna kuning berubah menjadi hijau kehitaman (Baud *et al.*, 2014).

5. Uji Antioksidan

a. Pembuatan larutan DPPH

Ditimbang sebanyak 5mg serbuk DPPH kemudian dimasukan kedalam labu ukur 50ml dilarutkan dengan sedikit metanol PA lalu kocok dengan vortex setelah itu tambahkan metanol PA hingga tanda batas. Bungkus labu ukur dengan alumunium foil dan simpan ditempat yang terhindar dari cahaya.

b. Pembuatan Larutan Stok

Ditimbang Fraksi etil asetat propolis lebah kelulut dalam beaker glass sebanyak 100 mg, larutkan dengan 2 ml metanol PA lalu masukkan kedalam labu ukur 10 ml. Lakukan pembilasan dengan sedikit metanol PA kemudian masukkan kedalam labu ukur, tambahkan metanol PA hingga batas. Vortex sampel kurang lebih 5 menit, saring sampel yang telah dilarutkan dengan kertas saring,

pindahkan larutan ke beaker glass kecil dan tutup bagian atas dengan aluminium foil agar tidak menguap.

c. Pembuatan kontrol positif vitamin C

Ditimbang 5mg vitamin C dalam beaker glass kecil, Larutkan dengan 3ml metanol PA kemudian masukan kedalam labu ukur 5 ml. Bilas beaker glass dengan metanol masukan kedalam labu ukur hingga tanda batas. Disiapkan 6 labu ukur 10 ml, dibuat sampel dengan konsentrasi 1, 2, 4, 6, 8 µg/mL dan hanya DPPH. Tambahkan 3 ml DPPH pada tiap tabung dan tambahkan metanol PA hingga tanda kemudian simpan sampel diruang gelap selama 30 menit. Baca absorbansi di spektro pada panjang gelombang 517 nm sebanyak dua kali. Metanol PA digunakan sebagai blanko.

d. Penentuan IC₅₀ Fraksi etil asetat lebah kelulut dengan DPPH Metode Spektrofotometer UV-Vis

Disiapkan 7 labu ukur 10 ml, 6 labu ukur dimasukan larutan stok konsentrasi 5, 10, 20, 40, 100, 200 µg/mL kemudian ditambahkan 3 ml DPPH, lalu ditambahkan metanol PA hingga tanda batas. 1 labu ukur dimasukan 3 ml DPPH kemudian ditambahkan metanol PA hingga tanda batas. Simpan semua sampel diruang bebas cahaya selama 30 menit. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517nm dan dilakukan pengulangan sebanyak 2x. Hasil analisa aktivitas antioksidan dinyatakan dalam bentuk %. Metanol PA digunakan sebagai blanko.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100$$

6. Uji Antibakteri

a. Penyiapan dan pembuatan media agar

Larutkan 7 g agar dalam 250 ml aquades, kemudian panaskan, masukan dalam erlenmayer kemudian disterilkan menggunakan

autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit (Prihandani *et al.*, 2015).

b. Uji antibakteri dengan metode sumuran

Disiapkan dan disterilkan media agar untuk kultur bakteri. Pertama, dituangkan 20ml larutan nutrient agar ke dalam cawan petri diamkan hingga dingin dan mengeras, kemudian ambil sedikit bakteri yang telah disuspensi dengan *cotton bud* steril kemudian goreskan secara *zigzag* pada permukaan atas media agar yang telah dingin. dibuat 6 lubang dengan alat pelubang sesuai dengan larutan sampel yang akan diuji. Ditambahkan 20 µL fraksi konsentrasi 75,150,300 dan 600 µL/ml yang telah dilarutkan dalam acetone pada 4 lubang. Ditambahkan asetone 20 µL pada lubang sebagai kontrol negatif dan ditambahkan thiamphenicol 20 µL sebagai kontrol positif. Setelah itu tutup cawan petri kemudian wrap dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambatan dihitung dengan satuan mm dengan jangka sorong.

I. Jadwal Penelitian

Tabel 3.1 Jadwal Penelitian

Kegiatan	Oktober 2021	November 2021	Desember 2021	Januari 2022	Februari 2022
Pengambilan sampel					
Ekstraksi					
Fraksinasi					
Uji Fitokimia					
Uji antioksidan					
Uji Antibakteri					
Analisis Data					
Penulisan skripsi					