

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Metode penelitian kuantitatif dikombinasikan dengan strategi penelitian eksperimental digunakan dalam desain penelitian ini. Eksperimental yaitu rancangan penelitian dengan menyelenggarakan percobaan dengan tujuan untuk mengetahui gejala ataupun pengaruh yang muncul menjadi akibat terdapatnya perlakuan tertentu ataupun eksperimen tersebut (Notoatmodjo, 2010). Dalam penelitian ini aktivitas antioksidan ekstrak propolis diuji dengan metode DPPH, dan uji antibakteri dilaksanakan memakai metode sumuran. Metode sumuran digunakan untuk mengetahui apakah ekstrak propolis dapat menghambat bakteri yang dihasilkan dalam ekstrak propolis dari bakteri *Staphylococcus aureus* serta *Escherichia coli*.

#### **B. Subjek dan Objek Penelitian**

##### 1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ialah batasan penelitian yang mana peneliti dapat menentukan dengan benda, perihal ataupun individu guna melekatnya variable penelitian (Arikunto, 2010).

##### a. Populasi

Bakteri yang dipergunakan pada penelitian ini untuk mewakili populasi yakni *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang keduanya didapatkan dari Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

##### b. Sampel

Sampel yang digunakan adalah propolis lebah *Trigona apicalis* yang di ambil dari pembudidaya lebah kelulut yang berada di Tanah merah, Samarinda

c. Teknik pengambilan sampel

Purposive sampling dipergunakan pada penelitian ini, dan sampel yang digunakan adalah propolis dari lebah kelulut *Trigona apicalis*.

2. Objek Penelitian

Menurut Arikunto (2010), objek penelitian ialah variabel, ataupun apa saja yang menjadi fokus fokus suatu penyelidikan. Menurut Sugiono (2015), objek penelitian adalah karakteristik atau kualitas seseorang, dan objek penelitian memiliki variasi tertentu yang telah dipilih peneliti untuk dapat membuat kesimpulan tentang hal itu. Uji antioksidan serta uji antibakteri akan menjadi fokus penelitian ini. Objek dalam penelitian ini ialah pengujian antioksidan dan uji antibakteri.

**C. Waktu dan Tempat Penelitian**

1. Waktu penelitian

Jangka waktu penelitian dimulai pada November 2021 dan berlanjut hingga Januari 2022, dimulai dengan persiapan, pelaksanaan, dan pembuatan laporan hasil.

2. Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

**D. Definisi operasional**

**Tabel 3.1 Definisi Operasional**

NO	VARIABEL	DEFINISI OPERASIONAL	CARA UKUR	ALAT UKUR	SKALA UKUR	HASIL UKUR
1	Ekstrak propolis	Maserasi sampel menggunakan methanol	-	Gelas ukur	Numerik	350 ml
2	Absorbansi sampel	Nilai absorban pada masing-masing konsentrasi	Diukur panjang gelombang maksimum dengan alat spektrofotometer Uv Vis	Spektrofotometri Uv Vis	Numerik	Absorbansi (nm)

3	% hambatan	% sampel dalam menghambat radikal bebas pada setiap konsentrasi	Dengan rumus : $\frac{\text{kntrl abs} - \text{abs sampe}}{\text{kontrol absorpsi}}$	-	Numerik	Hasil sampel dalam %
4	IC <sub>50</sub>	Nilai konsentrasi ekstrak (ppm)	Persamaan regresi linier kurva perbandingan konsentrasi (X) dan % hambatan (Y)	-	Numerik	<50 ppm = sangat kuat 50-100ppm= kuat 100-150= sedang 151-200ppm = lemah
5	Antibakteri	Jarak daya hambat bakteri pada sampel	Menggunakan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i>	Jangka sorong	Numerik	Jarak daya hambat (cm)
6	Fitokimia	Mengetahui senyawa yang terdapat pada sampel	-	-	Numerik	Terdapat senyawa flavonoid, tannin, alkaloid, Triterpenoid, saponin,

### E. Instrumen Penelitian

Alat yang dipergunakan pada penelitian ini ialah waterbath, cawan porselen, alat-alat gelas, timbangan analitik, spatula, tabung reaksi, rak tabung, mikropipet, vortex, kuvet, *spektrofotometri Uv-Vis*, corong pisah, dan mikropipet.

### F. Metode Pengumpulan Data

Penelitian ini memakai teknik pengumpulan data secara observasi secara langsung yang diselenggarakan dengan uji laboratorium yakni uji antioksidan menggunakan *diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) dan

pengujian antibakteri (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*) pada lebah kelulut *Trigona apicalis*.

### G. Teknik Analisis Data

Pada penelitian ini analisis data pada aktivitas antioksidan diselenggarakan melalui mengukur absorbansi yang memakai spektrofotometer. Setelah mendapatkan nilai absorbansinya maka hitung Nilai persentase penghambatan antioksidan dihitung menggunakan persamaan:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{kontrol abs} - \text{absorbansi sampel}}{\text{kontrol absorpsi}} \times 100\%$$

Dan menghitung rata-rata dengan menggunakan *Microsoft Excel*. Data antioksidan ekstrak propolis *Trigona apicalis* dihitung nilai IC<sub>50</sub> nya melalui penggunaan analisis probit, ditentukan nilai IC<sub>50</sub> untuk data antioksidan ekstrak propolis apikal *Trigona*. Angka yang dikenal sebagai IC<sub>50</sub> memperlihatkan konsentrasi ekstrak (dalam ppm) yang bisa menghambat proses oksidasi dengan faktor lima puluh persen. Jika nilai IC<sub>50</sub> lebih rendah, hal ini memperlihatkan bahwasanya zat tersebut mempunyai tingkat aktivitas antioksidan yang lebih tinggi.

Pada aktivitas antibakteri analisis data yang dipakai yakni *Microsoft Excel* untuk menghitung rata-rata zona hambat bakteri dan SPSS dengan uji *One Way Anova*.

### H. Alur Jalannya Penelitian

#### 1. Pengambilan sampel

Propolis lebah *Trigona apicalis* diambil dari Budidaya Lebah Kelulut Tanah Merah, Kota Samarinda, Provinsi Kalimantan Timur, yang kemudian sampel dibersihkan dari kotoran yang masi melekat pada propolis. Setelah dibersihkan sampel ditimbang dan dilakukan Maserasi.

#### 2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Timbang sampel propolis lebah *Trigona apicalis* sebanyak 114,01 yang kemudian dilakukan maserasi dengan menggunakan methanol 350ml selanjutnya ditutup rapat memakai aluminium foil

dan plastic wrap, simpan sampel pada tempat yang terhindar dari matahari langsung. Proses maserasi ini diselenggarakan selama 3 hari. Setelah 3 hari ekstrak disaring memakai kertas saring kasar yang menghasilkan filtrat I dan ampas. selanjutnya dilakukan remaserasi dengan menambahkan pelarut methanol, remaserasi dilakukan sejumlah 3-4x. Hasil dari maserasi dipekatkan memakai waterbath dengan suhu 64,7°C hingga didapatkan ekstrak pekat dari propolis lebah *Trigona apicalis*.

Setelah didapatkan ekstrak pekat propolis lebah *Trigona apicalis* dilakukan partisi cair menggunakan pelarut dengan perbandingan 1;1 (n-heksan;methanol). Kemudian dikocok dan didiamkan hingga membentuk dua fase. Hasil filtrate n-heksan dari partisi tersebut dikumpulkan dan di uapkan untuk mendapatkan fraksi dari n-heksan propolis.

### 3. Fitokimia

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

#### a. Alkaloid

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

#### b. Flavonoid

Dimasukan 1 ml fraksi etil asetat kedalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$ , Dilihat perubahan warna yang terjadi, fraksi mengandung flavonoid jika berwarna kuning,merah, atau coklat.

#### c. Triterpenoid/Steroid

Masukkan satu mililiter fraksi etil asetat ke dalam tabung reaksi, diikuti dengan setengah mililiter kloroform dan beberapa tetes hidrogen peroksida. Individu memusatkan perhatian

mereka pada sisi tabung reaksi. Berdasarkan perubahan warna yang terjadi, fraksi mengandung triterpenoid jika warna antar permukaan menjadi coklat kemerahan, dan fraksi mengandung steroid apabila lapisan atas berwarna merah serta lapisan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> berwarna kuning. Kesimpulan ini dapat diambil dari perubahan warna yang terjadi.

d. Saponin

Dimasukan 1 ml fraksi etil asetat kedalam tabung rekasi, Ditambahkan 2ml 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 3ml fraksi etil asetat kedalam tabung reaksi, Ditambahkan 2 tetes FeCl<sub>3</sub> 1%. Dilihat perubahan warna yang terjadi, fraksi mengandung tanin apabila larutan yang awalnya berwarna kuning berubah menjadi hijau kehitaman .

4. Antioksidan

Uji antioksidan diselenggarakan memakai metode DPPH yang diawali dengan pembuatan larutan DPPH sebanyak 5mg yang dilarutkan dengan 5ml methanol, campuran dikocok hingga homogen. Kemudian dilanjutkan dengan pembuatan konsentrasi fraksi n-heksan propolis Lebah Kelulut dengan konsentrasi 5, 10, 20, 40, 100, dan 200 ppm, dan ditambahkan 3ml larutan DPPH dan methanol hingga 10ml, lalu larutan di inkubasi selama 30 menit dalam kegelapan serta diukur memakai spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 517nm. Asam askorbat digunakan sebagai pembanding kontrol positif. Aktivitas antioksidan dengan memakai persamaan regresi linear ( $y = bx + a$ ) guna memperoleh nilai IC<sub>50</sub>.

## 5. Antibakteri

Uji antibakteri dalam penelitian ini memakai metode difusi cakram. Pada penelitian ini menggunakan media nutrient agar dan menggunakan paper disk yang berfungsi sebagai tempat penampung zat antimikroba. Hal pertama yang dilakukan pada pengujian ini adalah mensterilkan semua alat-alat yang akan digunakan, setelah semua steril lalu dibuat 20ml larutan nutrient agar yang dituangkan pada cawan petri yang telah steril tunggu hingga dingin. Setelah larutan dingin dan padat bakteri dioleskan pada permukaan media. Dibuat 5 lubang dengan ukuran diameter 4mm. Pengujian ini menggunakan konsentrasi 75, 150, 300, 600 ug/ml. Thiamphenicol digunakan sebagai kontrol positif serta aseton sebagai kontrol negative pada penelitian ini. Media agar yang telah siap kemudian di inkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Zona hambat yang dihasilkan diukur dengan memakai jangka sorong dengan satuan mm.

### I. Jadwal Penelitian

**Tabel 3.2 Jadwal Penelitian**

Kegiatan	Oktober 2021	November 2021	Desember 2021	Januari 2022
Pengambilan sampel				
Ekstraksi				
Fraksinasi				
Uji Fitokimia				
Uji Antioksidan				
Uji Antibakteri				
Analisis data				
Penulisan skripsi				