

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan bentuk *true experimental design* fraksi N-Hexane ekstrak propolis lebah kelulut *Geniotrigona thoracica* dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH dan aktivitas penghambatan bakteri dengan menggunakan metode difusi sumuran.

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek

Pada penelitian ini subjek yang digunakan adalah fraksi N-Hexane dari ekstrak propolis lebah kelulut *Geniotrigona thoracica*.

2. Objek

Pada penelitian ini objek yang digunakan adalah aktivitas antioksidan dan aktivitas antibakteri dari fraksi N-Hexane dari ekstrak propolis 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. Sedangkan uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan sejak bulan November hingga Januari 2022.

D. Definisi Operasional

1. Variabel bebas

Konsentrasi fraksi N-Hexane (non-polar) dari ekstrak propolis lebah kelulut *Geniotrigona thoracica*.

2. Variabel terikat

Besaran IC_{50} penangkapan radikal bebas dan zona hambatan pada 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 penelitian

Alat penelitian yang digunakan antara lain, alat-alat glass, cawan porselen, *waterbath*, timbangan analitik, spektrofotometer UV-Vis, spatula, corong pisah, batang pengaduk, tabung reaksi, mikropipet, kuvet, vortex, rak tabung dan kertas saring.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, sampel propolis lebah kelulut (*Geniotrigona thoracica*) (diambil dari wilayah Samarinda, Kalimantan Timur), Methanol, N-Hexane, HCl pekat, Preaksi Dragendroff, NaOH 1%, Kloroform, H₂SO₄ pekat, Timbal asetat 1%, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Asam askorbat, Nutrien agar, Aceton, Kloramfenikol, bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

F. Metode Pengumpulan Data

Data pada penelitian ini terbagi menjadi dua jenis, yaitu data primer yang diperoleh dari pengujian aktivitas antioksidan dan antibakteri di Laboratorium, sedangkan data sekunder dikumpulkan melalui proses studi pustaka dari media cetak elektronik yang berhubungan dan relevan, serta mampu dipertanggung jawabkan secara ilmiah.

G. Teknis Analisis Data

Analisa data dilakukan dengan perhitungan Standar Deviasi (SD) data serta menghitung inhibisi serapan DPPH dan nilai IC_{50} dari persamaan linear, dengan menggunakan *software excel*.

H. Alur Jalannya Penelitian

1. Penyiapan sampel

Sampel propolis lebah kelulut *Geniotrigona thoracica* diperoleh dari peternakan lebah kelulut yang terletak di Kelurahan Lempake, Kota Samarinda. Setelah diambil dan sebelum diekstraksi, sampel propolis disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -4°C .

2. Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Propolis lebah *Geniotrigona thoracica* sebanyak 435,8 gram, dihancurkan dan kemudian direndam dengan pelarut metanol di dalam toples kaca, lalu di diamkan selama 24 jam dan sesekali diaduk. Setelah 24 jam, sampel di saring menggunakan kertas saring dan residu dari maserasi yang tersisa dilakukan remaserasi selama 24 jam. Proses remaserasi diulang hingga laurtan menjadi bening atau tidak berwarna. Filtrat yang dihasilkan kemudian dipanaskan menggunakan pengangas air hingga dihasilkan ekstrak kental.

3. Fraksinasi

Ekstrak kental dari propolis metanol ditimbang sebanyak 20 g, kemudian dimasukkan kedalam erlenmayer dan di tambahkan air panas sebanyak 400 ml, dan kemudian di campur keduanya. Campuran tersebut kemudian dimasukkan kedalam corong pisah dan ditambahkan N-Hexane sebanyak 400 ml. Setelahnya dilakukan penggojrokan selama 1 menit, dan diamkan hingga terbentuk 2 fase yang terpisah. Fraksinasi dilakukan sebanyak dua kali dengan penambahan N-Hexane hingga diperoleh fraksi N-Hexane bening. Kemudian fraksi yang dihasilkan dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental dan dihitung rendemen.

4. Uji Fitokimia

a. Alkaloid

Sebanyak 5 ml fraksi N-Hexane dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 ml HCl pekat, dan ditambahkan

preaksi dragendroff. Fraksi positif mengandung alkaloid apabila muncul perubahan warna menjadi merah / jingga.

b. Flavonoid

Fraksi N-Hexane sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditetaskan beberapa tetesan NaOH 1% dan kemudian beberapa tetes HCl 1%. Fraksi positif mengandung flavonoid apabila larutan uji menjadi bening atau tidak berwarna.

c. Triterpenoid / Steroid

Fraksi N-Hexane sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 0,5 ml Kloroform, kemudian ditetaskan beberapa tetesan H₂SO₄ melalui dinding tabung. Fraksi positif mengandung triterpenoid apabila muncul perubahan warna menjadi coklat kemerahan diantara permukaan, dan positif mengandung steroid apabila lapisan atas berwarna merah dan bagian bawah menjadi kuning.

d. Saponin

Fraksi N-Hexane sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan 2 ml aquadest lalu dipanaskan menggunakan *hotplate* selama 10 menit, campuran kemudian disaring dan filtrat dimasukkan ketabung reaksi dan ditambahkan 10 ml aquadest, kemudian campuran digojok selama 1-2 menit. Fraksi positif mengandung saponin apabila terbentuk buih konstan pada bagian atas.

e. Tannin

Fraksi N-Hexane sebanyak 3 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditetaskan 2 tetes FeCl₃ 1%. Fraksi positif mengandung tannin apabila muncul perubahan warna menjadi hijau kehitaman (Baud *et al.*, 2014).

5. Uji Kandungan Total Fenolik

a. Pembuatan Pereaksi Na_2CO_3

Sebanyak 10 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam aquadest dan dibuat campuran hingga 50 ml, dengan digojrok hingga homogen.

b. Pembuatan Larutan Standar Asam Galat

Sebanyak 10 g asam galat dilarutkan dengan menggunakan 1 ml metanol p.a dalam labu ukur dan ditambahkan 10 ml aquadest. Dari campuran yang ada kemudian dibuat beberapa seri konsentrasi larutan standar asam galat, antara lain 0,5, 1, 2, 4, 8, dan 16 $\mu\text{g/ml}$.

c. Pengukuran Larutan Standar Asam Galat

Masing-masing seri konsentrasi asam galat kemudian ditambahkan pereaksi *Follin-Ciocalteu* sebanyak 0,5 ml dan lalu dikocok pelan dan di inkubasi selama 8 menit. Kemudian ditambahkan Na_2CO_3 sebanyak 3 ml dan aquadest hingga batas pada labu ukur 10 ml. Didiamkan larutan selama 2 jam pada ruangan gelap dan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 767 nm.

d. Pengujian Kandungan Total Fenolik

Sebanyak 500 mg larutan sampel dimasukkan kedalam labu ukur dan ditambahkan reagen *Follin-Ciocalteu* sebanyak 0,5 ml, kemudian dikocok pelan dan ditambahkan Na_2CO_3 sebanyak 3 ml setelah campuran di inkubasi selama 8 menit, dan ditambahkan aquadest hingga tanda pada labu ukur 10 ml. Di inkubasi larutan selama 2 jam, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 767 nm.

6. Uji antioksidan

a. Pembuatan larutan DPPH

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 5mg, kemudian dilarutkan dengan 50ml metanol PA didalam labu ukur dengan cara digojok pelan. Setelahnya labu ukur dilapisi dengan

aluminium foil dan disimpan ditempat yang terhindar cahaya matahari sambil dinkubasi.

b. Pembuatan larutan stok

Fraksi N-Hexane propolis ditimbang sebanyak 100mg dan dilarutkan dengan 2 ml metanol PA dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Dilakukan pembilasan dengan metanol PA dan ditambahkan hingga batas kalibrasi botol. Digojok labu ukur hingga larutan tercampur sempurna. Kemudian tutup dan lapiasi botol dengan aluminium foil.

c. Pembuatan kontrol positif Asam askorbat (Vitamin C)

Vitamin C ditimbang sebanyak 5 mg dengan beaker glass 30 ml. Kemudian dilarutkan dengan 3 ml metanol PA dan dimasukkan kedalam labu ukur 5 ml. Beaker glass kemudian dibilas dengan metanol PA dan dimasukkan ke labu ukur hingga batas kalibrasi. Dibuat 6 seri larutan konsentrasi pada labu ukur 10 ml, tiap konsentrasi diberi 3 ml DPPH dan metanol PA hingga batas kalibrasi. Kemudian larutan di inkubasi dalam ruangan bebas cahaya selama 30 menit. Setelahnya ukur absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis dengan panjang gelombang 517nm sebanyak 2 kali. Digunakan metanol PA sebagai blanko.

d. Pengukuran IC_{50} fraksi N-Hexane

Dibuat 7 seri konsentrasi larutan stok dengan besaran 0, 5, 10, 20, 40, 100 dan 200 $\mu\text{g/ml}$, kemudian ditambahkan 3 ml larutan DPPH pada masing-masing labu ukur dan ditambahkan metanol PA hingga batas. Inkubasi semua larutan selama 30 menit pada tempat bebas cahaya. Absorbansi kemudian diukur menggunakan spektrofotometer Uv-Vis dengan panjang gelombang 517nm. Dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Hasil analisa aktivitas dinyatakan dalam satuan % dengan perhitungan persen inhibisi. Digunakan metanol PA sebagai blanko.

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

7. Uji Antibakteri

a. Pembuatan media agar.

Sebanyak 7 g agar dilarutkan dalam 250 ml aquadest. Campuran kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga agar terlarut sempurna. Larutan dimasukkan kedalam cawan petri 10 ml. Kemudian larutan agar dimasukkan kedalam autoklaf untuk disterilkan dengan suhu 121°C selama 5 menit (Prihandani, 2015).

b. Pengujian antibakteri dengan metode sumuran

Media agar untuk kultur bakteri disiapkan dan disterilkan. Dituangkan 20ml larutan nutrient agar kedalam tabung reaksi dan diambil sedikit bakteri menggunakan jarum ose dan campurkan dengan media agar. Setelah itu, tuang larutan ke cawan petri dan goyangkan hingga memadat dan dingin. Kemudian dibuat 5 lubang dengan alat pelubang, ditambahkan fraksi N-Hexane dengan konsentrasi 50, 100, 200, dan 400 µl yang telah dilarutkan dengan acetone. Pada lubang kontrol negative ditambahkan 20 µl acetone dan Cloramphenicol sebanyak 20 µl sebagai kontrol positif pada lubang lain. Tutup cawan petri dengan warp dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 32°C. Setelah 24 jam, diukur zona hambatan dengan menggunakan jangka sorong.

I. Jadwal Penelitian

Tabel 3. 1 Jadwal Penelitian

Kegiatan	November 2021	Desember 2021	Januari 2022	Februari 2022	Maret 2022
Pengambilan sampel					
Ekstraksi dan Fraksinasi					
Uji Fitokimia					
Uji Antioksidan					
Uji Antibakteri					
Analisis Data					
Penulisan Skripsi					