

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknobia-Industri, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta dan Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta. Penelitian dilakukan selama 4 bulan dimulai pada bulan Maret sampai Juni 2016.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, *petridish*, jarum ose, erlenmeyer, gelas ukur, gelas beker, *laminair air flow* ESCO, autoklaf STMN-Y222 OMRON, *microwave* Panasonic, inkubator Memmert, *rotary evaporator* RV06-ML KIKA WERKE, inkubator *shaker* JSR-JSSI-300C, spektrofotometer UV-1800 Shimadzu, pinset, pipet tetes, pipet ukur, pro pipet, mikropipet BIOHIT, tips, timbangan elektrik AL204, lampu spirtus, *vortex* 3760 Mixer Termolyne, kapas, karet, ayakan, trigalski, perforator, tissue, korek api, *waterbath* Memert, aluminium foil, *blender* Cosmos, labu takar, kuvet, corong pisah, stirrer magnetic, kertas label, kertas payung, penjepit kayu, pisau, penggaris, kertas saring, plastik *wrap*, dan tempat pembuangan tip.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji alpukat sebanyak 370 gram dari buah alpukat sebanyak 5 kg, yang diperoleh dari Pasar Beringharjo JL. Pabringan No. 1 Yogyakarta, etanol, n-heksana, etil asetat, isolat *Bacillus cereus* dan *Vibrio cholerae* yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta, Ampisilin *disc* 10 μ l, aquadest steril, alkohol 70%, medium *Nutrient*

Agar, medium *Nutrient Broth*, metanol 30%, H₂SO₄, kloroform, amoniak, H₂SO₄ 2M, reagen Dragendorff, reagen Meyer, reagen Wagner, larutan FeCl₃ 1%, asam chloride 2N, dietil eter, natrium nitrit 5%, aluminium chloride 10%, natrium hidroksida 1M, quercetin, quinine, larutan BCG, dan buffer fosfat.

C. Rancangan Percobaan

Penelitian aktivitas antibakteri dari ekstrak biji alpukat ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap faktorial dengan perlakuan sampel berupa variasi pengekstrak biji alpukat (pelarut etanol, n-heksana, dan etil asetat). Perlakuan tersebut akan dilakukan pengulangan sebanyak lima kali ulangan pada setiap perlakuan, dengan kontrol positif yaitu ampisilin dan kontrol negatif yaitu larutan etanol, n-heksana, dan etil asetat (Tabel 3).

D. Tahapan Penelitian

1. Preparasi dan pembuatan serbuk biji alpukat (Soetarno dan Soediro, 1995)

Biji alpukat dicuci terlebih dahulu untuk menghilangkan kotoran yang menempel, kemudian ditiriskan. Biji kemudian dipotong-potong kecil dengan menggunakan pisau. Biji alpukat kemudian dikeringkan dengan metode pengeringan tradisional menggunakan sinar matahari. Proses pengeringan dilakukan selama 6 jam dengan pengadukan sesekali. Penentuan berat kering dilakukan dengan mengurangi berat awal daun dengan berat akhir daun kering dikali 100% hingga kadar air total mencapai 13%. Biji yang sudah benar-benar kering kemudian dibuat serbuk menggunakan *blender*. Serbuk kering tersebut kemudian diayak dengan saringan kopi dan disimpan dalam wadah plastik.

Tabel 3. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Alpukat dengan Variasi Pengekstrak melalui Uji Zona Hambat

Perlakuan	Ulangan	Bakteri	
		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
Ekstrak Etanol	1	EE1CP	EE1VC
	2	EE2CP	EE2VC
	3	EE3CP	EE3VC
	4	EE4CP	EE4VC
	5	EE5CP	EE5VC
Ekstrak n-heksana	1	EH1CP	EH1VC
	2	EH2CP	EH2VC
	3	EH3CP	EH3VC
	4	EH4CP	EH4VC
	5	EH5CP	EH5VC
Ekstrak Etil Asetat	1	EA1CP	EA1VC
	2	EA2CP	EA2VC
	3	EA3CP	EA3VC
	4	EA4CP	EA4VC
	5	EA5CP	EA5VC
Kontrol Negatif Etanol	1	KE1CP	KE1VC
	2	KE2CP	KE2VC
	3	KE3CP	KE3VC
	4	KE4CP	KE4VC
	5	KE5CP	KE5VC
Kontrol Negatif n-heksana	1	KH1CP	KH1VC
	2	KH2CP	KH2VC
	3	KH3CP	KH3VC
	4	KH4CP	KH4VC
	5	KH5CP	KH5VC
Kontrol Negatif Etil Asetat	1	KA1CP	KA1VC
	2	KA2CP	KA2VC
	3	KA3CP	KA3VC
	4	KA4CP	KA4VC
	5	KA5CP	KA5VC
Kontrol Positif Ampisilin	1	KP1CP	KP1VC
	2	KP2CP	KP2VC
	3	KP3CP	KP3VC
	4	KP4CP	KP4VC
	5	KP5CP	KP5VC

Keterangan :

- EE = Ekstrak biji alpukat dengan pelarut etanol
 EH = Ekstrak biji alpukat dengan pelarut n-heksana
 EA = Ekstrak biji alpukat dengan pelarut etil asetat
 KE = Kontrol negatif pelarut etanol
 KH = Kontrol negatif pelarut n-heksana
 KA = Kontrol negatif pelarut etil asetat
 KP = Kontrol positif ampisilin

2. Ekstraksi biji alpukat (Dewi, 2010 dengan modifikasi)

Serbuk biji alpukat sebanyak 100 gram dimaserasi dengan cara merendam simplisia ke dalam masing-masing pelarut (etanol, n-heksana, dan etil asetat) sebanyak 1000 ml (perbandingan 1:10 (w/v)) selama 24 jam pada suhu 25 °C. Sampel kemudian disaring dengan kertas penyaring. Residu kembali dimaserasi lagi dengan cara yang sama, sampai dua kali (selama 2 hari). Ekstrak hasil maserasi atau filtrat yang dihasilkan kemudian ditampung menjadi satu dan diuapkan untuk memisahkan pelarutnya. Penguapan dilakukan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 60 °C untuk pelarut n-heksana dan 70 °C untuk pelarut etanol dan etil asetat, sampai pelarut habis menguap, sehingga didapatkan ekstrak kental biji alpukat.

3. Pembuatan medium untuk pertumbuhan bakteri uji

- a. Medium *Nutrient Agar* (NA) (Johnson dan Case, 2010; Jutono dkk., 1980)

Medium *Nutrient Agar* (NA) dapat dibuat dengan mencampurkan 1000 ml akuadest, dengan 5 g pepton, 3 g *beef extract* dan ditambahkan 15 g agar. Pelarutan bahan-bahan tersebut dilakukan pada suhu 100 °C, lalu didinginkan pada suhu 40 °C hingga mengeras. Pada pembuatan medium agar miring, medium yang telah dipanaskan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml. Tabung reaksi tersebut disimpan dalam posisi miring.

b. Medium *Nutrient Brooth* (NB) (Cappucino dan Sherman, 2011)

Nutrient Brooth (NB) dibuat dengan menggabungkan 1000 ml akuades, dengan 5 g pepton, dan ditambahkan 3 g ekstrak daging.

4. Sterilisasi alat dan medium (Lay dan Hastowo, 1992)

Alat-alat dicuci bersih dan dikeringkan, lalu dibungkus dengan menggunakan kertas payung. Medium yang akan digunakan, medium cair dimasukkan dalam erlenmeyer, lalu ditutup dengan kapas. Medium padat dalam petridish dibungkus dengan kertas payung. Alat dan medium tersebut kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dan dipanaskan pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit untuk bahan dan 20 menit untuk alat.

5. Perbanyak bakteri uji (Cappucino dan Sherman, 2011 dengan modifikasi)

Kultur bakteri dinokulasikan ke dalam medium NA miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat bakteri hasil perbanyak diambil 1-2 ose dan dimasukkan ke dalam 20 ml medium cair dalam erlenmyer, kemudian diinkubasi pada *shaker* inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

6. Identifikasi kandungan kimia biji alpukat

a. Uji flavonoid (Harborne, 1987)

Ekstrak biji alpukat diambil sebanyak 0,1 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. air panas sebanyak 100 ml ditambahkan ke erlenmeyer, dididihkan selama 5 menit, lalu disaring. Filtrat diambil

sebanyak 5 ml, serbuk Mg sebanyak 0,05 mg, larutan HCl 5N sebanyak 1 tetes, dan amil alkohol sebanyak 3 tetes dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok perlahan. Hasil positif flavonoid ditandai terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga bening.

b. Uji alkaloid (Harborne, 1987)

Ekstrak biji alpukat sebanyak 0,2 gram ditambah 5 ml kloroform dan 3 tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan 2 tetes larutan H_2SO_4 2 M. Fraksi asam dibagi menjadi 3 tabung yang masing-masing ditambah pereaksi Dragendorff, Meyer, dan Wagner. Senyawa alkaloid pada sampel ditandai dengan adanya endapan merah pada pereaksi Dragendorff, endapan putih pada pereaksi Meyer, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner.

c. Uji tanin (Harborne, 1987)

Ekstrak biji alpukat sebanyak 0,1 gram ditambah 10 ml akuades, kemudian didiamkan selama 5 menit. Ekstrak biji alpukat disaring, lalu filtrat ditambah 5 tetes larutan $FeCl_3$ 1%. Pengamatan dilakukan terhadap perubahan warna yang terjadi. Hasil positif ditandai dengan terjadinya perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru kehitaman.

d. Uji saponin (Harborne, 1987)

Ekstrak biji alpukat sebanyak 0,1 gram ditambah 10 ml akuades, kemudian dikocok selama 30 menit. Pengamatan

dilakukan terhadap ada atau tidaknya busa yang terbentuk di permukaan ekstrak biji alpukat. Hasil positif ditandai dengan adanya busa ± 1 cm.

7. Penghitungan Kadar Flavonoid dengan Spektrofotometer UV-Vis (Titisdkk., 2013)

a. Preparasi ekstrak biji alpukat

Ekstrak biji alpukat sebanyak 50 mg dimasukkan dalam labu godog dan ditambahkan asam chloride 2 N sebanyak 10 ml. Larutan direfluk selama 30 menit, kemudian didinginkan. Larutan diekstraksi dengan 10 ml dietil eter, kemudian fase dietil eter diambil. Ekstraksi larutan diulangi sebanyak 2 kali. Fase dietil eter diuapkan dengan hembusan gas nitrogen hingga kering. Natrium nitrit 5% sebanyak 0,3 ml kemudian ditambahkan dan setelah 5 menit 0,6 ml aluminium chloride 10% kemudian ditambahkan pada larutan. Setelah 5 menit larutan ditambah 2 ml natrium hidroksida 1 M, kemudian ditambah dengan aquades hingga 10 ml dengan labu takar. Larutan dipindah ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan program UV-Probe untuk menghitung konsentrasi ekstrak pada panjang gelombang 510 nm.

b. Pembuatan kurva baku standar

Standar quercetin sebanyak 10,0 mg diambil dan ditambah 0,3 ml natrium nitrit 5%. Setelah 5 menit larutan ditambah 0,6 ml aluminium chloride 10%, kemudian didiamkan selama 5 menit, dan

ditambah 2 ml natrium hidroksida 1 M. Larutan ditambah dengan aquades hingga 10 ml dengan labu takar. Larutan dipindah ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan program UV-Probe untuk menghitung regresi linier secara otomatis ekstrak pada panjang gelombang 510 nm.

Tabel 4. Pengenceran Larutan Baku Standar Quercetin

Conc	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200	400	ppm
Lar. Induk	39,1	78,13	156,3	312,5	625	1250	2500	5000	μ l
Aqua bides	4960,9	4921,87	4843,7	4687,5	4375	3750	250	0	μ l
Volume	5	5	5	5	5	5	5	5	ml

Sumber: Titis dkk. (2013)

8. Penghitungan Kadar Alkaloid dengan Spektrofotometer UV-Vis (Raaman, 2006)

a. Preparasi ekstrak biji alpukat

Ekstrak biji alpukat sebanyak 50 mg ditambah 5 ml HCl 2N, kemudian digojog dan disaring. Larutan dicuci dengan 10 ml chloroform sebanyak 3 kali dalam corong pisah. Larutan dinetralkan dengan penambahan 0,1 N NaOH, kemudian ditambah dengan 5 ml larutan BCG dan 5 ml buffer fosfat. Larutan ditambah dengan chloroform 5 ml dan diaduk dengan stirrer magnetic selama 15 menit pada kecepatan 500 rpm. Ekstraksi larutan diulang dengan chloroform sebanyak 2 kali. Fase chloroform dikumpul dan dievaporasikan dengan gas nitrogen, kemudian ditambah dengan 10 ml chloroform pada labu takar.

Larutan dipindah ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan program UV-Probe untuk menghitung konsentrasi ekstrak pada panjang gelombang 334 nm.

b. Pembuatan kurva baku standar

Standar quinine sebanyak 10,0 mg diambil dan ditambah dengan 10 ml chloroform pada labu takar. Larutan dipindah ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan program UV-Probe untuk menghitung regresi linier secara otomatis ekstrak pada panjang gelombang 334 nm.

Tabel 5. Pengenceran Larutan Baku Standar Quinine

Conc	6,5625	13,125	26,25	52,5	105	210	420	ppm
Lar. Induk	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000	µl
Chloroform	4968,75	4937,5	4875	4750	4500	4000	3000	µl

Sumber: Raaman (2006)

9. Uji antibakteri berdasarkan luas zona hambat dengan kertas cakram (Mpila dkk., 2012)

Kultur bakteri uji diambil sebanyak 100 µl diinokulasikan pada medium NA dengan metode *spread plate*. Kertas cakram berukuran 0,6 mm diambil menggunakan pinset dan diletakkan pada medium. Ekstrak biji alpukat dengan berbagai pengeksrak (etanol, n-heksana, dan etil asetat) dilarutkan sebanyak 1 gram dalam 6 ml aquadest steril, dan masing-masing ditetaskan pada kertas cakram yang berbeda sebanyak 30 µl. Kontrol pelarut etanol, n-heksana, dan etil asetat ditetaskan sebanyak

30 µl masing-masing pada kertas cakram yang berbeda. Ampisilin *disc* 10 mg sebanyak 1 buah diletakkan pula diatas medium sebagai kontrol positif. Cawan petri kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Daerah bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lainnya yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat. Luas zona hambat dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$L = 3,14 \times \frac{d_1^2 - d_2^2}{2} \text{ (cm cm)}$$

$$d = \frac{d \text{ terpanjang} + d \text{ terpendek}}{2}$$

Keterangan:

d_1 = diameter sumuran (cm)

d_2 = rata-rata diameter zona hambat (cm)

10. Pengukuran konsentrasi hambat minimum (Juliantina dkk., 2010 dengan modifikasi)

Pengukuran konsentrasi hambat minimum (KHM) dapat dilakukan dengan metode seri pengenceran. Tabung reaksi disiapkan 7 buah untuk setiap pengenceran ekstrak. Masing-masing tabung reaksi diberi label dari 1 sampai 7 pada masing-masing seri pengenceran ekstrak. Tabung nomor 2 sampai 7 berisi nutrient broth sebanyak 5 ml sementara tabung nomor 1 berisi nutrient broth sebanyak 10 ml.

Ekstrak biji alpukat yang sudah dipekatkan dengan *rotary evaporator* dianggap memiliki konsentrasi 100%. Ekstrak biji alpukat 100% ditimbang sebanyak 1,7 gram dan dimasukkan ke dalam tabung no.

1 berisi 10 ml nutrient broth, kemudian diambil dan ditambahkan sebanyak 5 ml ke dalam tabung no. 2 dan dihomogenkan dengan *vortex*, langkah ini diulang hingga tabung no. 7. Pengenceran secara serial tabung nomor 1 hingga nomor 7 adalah 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,625, dan 1,8125% dengan mengacu hasil penelitian Damayanti (2014).

Tabel 6. Serial pengenceran ekstrak biji alpukat untuk mengetahui KHM

Penambahan (ml):	Nomor Tabung Reaksi						
	1	2	3	4	5	6	7
Nutrient broth	10	5	5	5	5	5	5
Presentase ekstrak (%)	100	50	25	12,5	6,25	3,625	1,8125
Volume total	5	5	5	5	5	5	10

Biakan bakteri uji sebanyak 1 ml diinokulasikan ke dalam masing-masing tabung, kemudian di-*vortex*. Tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Terdapat antibiotik ampisilin sebagai kontrol positif dan masing-masing pelarut sebagai kontrol negatif. Tabung yang kekeruhannya paling sedikit dengan nilai konsentrasi terkecil ditentukan sebagai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) untuk ekstrak biji alpukat.

E. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan ANAVA dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% dan untuk mengetahui letak beda nyata tiap perlakuan dengan kontrol maka akan dilakukan uji Dunnet. Apabila ANAVA menunjukkan adanya beda nyata, analisis dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui adanya beda nyata antar perlakuan.

Analisis tersebut akan dilakukan dengan menggunakan program *Statistical Product Services Solution* (SPSS 15.0) (Gasperz, 1994).

