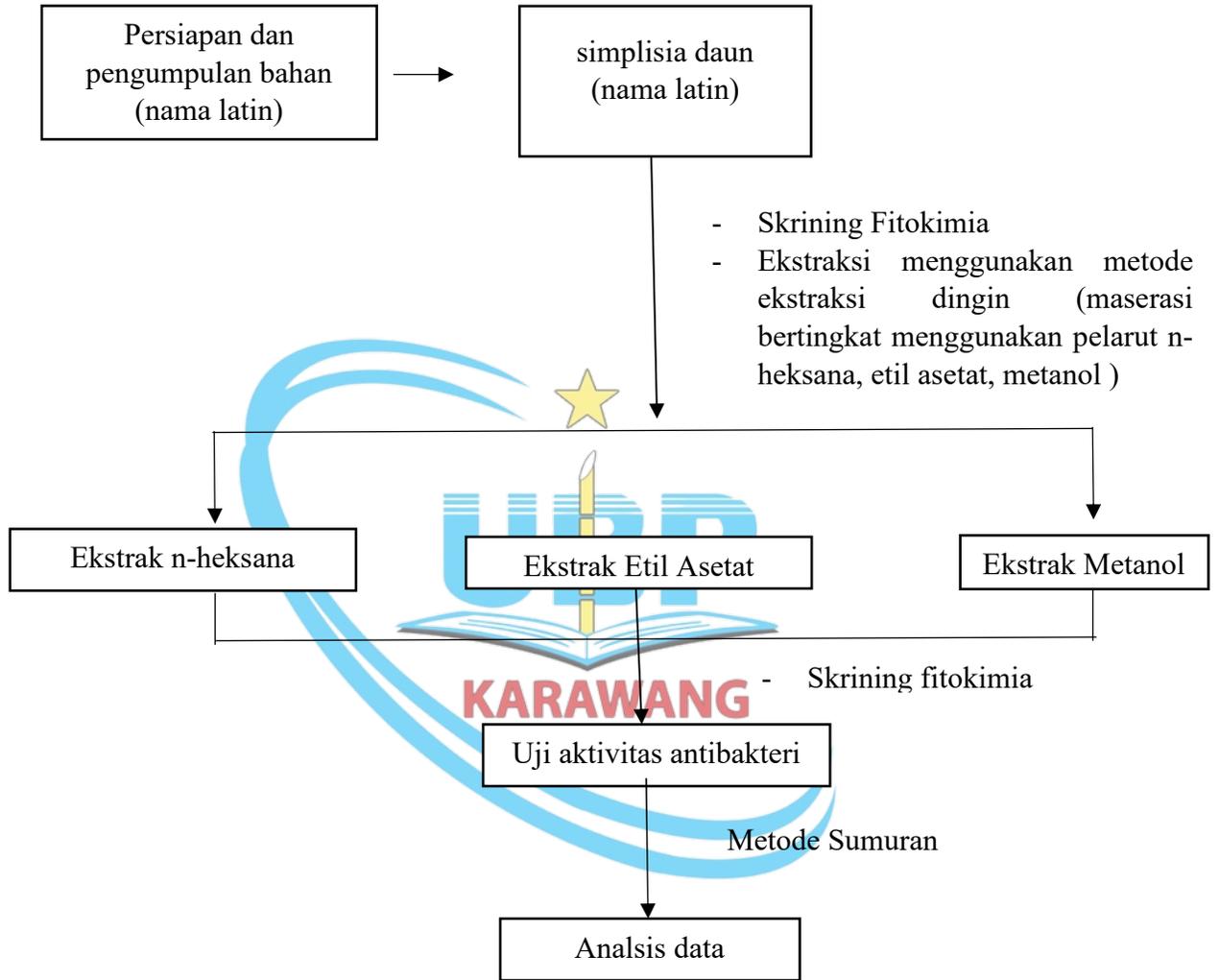


BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai juni 2021 di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang

3.2.2 Bentuk Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimental. Dan untuk pengukuran aktivitas antibakteri digunakan metode sumuran.

3.2.3 Alat dan Bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan yaitu Maserator, cawan petri, alat-alat gelas, autoklaf (merk), incubator (merk), gunting, pinset, keranjang, hot plate, mikropipet, lampu spritus, kawat ose, laminar air flow, satu set tabung reaksi, Lampu UV.

b. Bahan

Bahan bahan yang akan digunakan yaitu Ekstrak dari daun kirinyuh, (*Staphylococcus Aureus*, pelarut N-heksana, Etil Asetat dan Metanol. Bakteri *Staphylococcus Aureus* dan media agar (STA), kertas label, kertas saring, mirkrotip, sedotan, lakban, plat kromatografi Lapis Tipis (KLT),

3.3 Uji Antibakteri

3.3.1 Sterilisasi dan Pembuatan Media Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian aktivitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, pinset dibakar dengan pembakaran di atas api langsung dan media disterilkan di autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit (Ortez, 2015)

3.3.2 Metode sumuran

Metode yang digunakan dalam untuk uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini adalah metode difusi agar dengan menggunakan membuat sumuran pada media

agar, dimana dalam teknik ini media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri kemudian dimasukan larutan suspensi yang telah dilakukan pengenceran bakteri kedalam media, melalui penelitian ini dilakukan uji aktivitas antibakteri dari ekstrak daun kirinyuh dimana ekstrak daun kirinyuh diperoleh melalui teknik maserasi bertingkat dengan menggunakan pelarut N heksan, Methanol dan etil asetat, selanjutnya ekstrak yang diperoleh dari masing masing fraksi akan dilakukan uji bioaktivitasnya terhadap bakteri *Staphylococcus Aureus* dengan menggunakan metode sumuran. (Choma, 2016)

3.3.3 Konsentrasi Hambat Minimum

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Didefinisikan sebagai konsentrasi terendah obat yang akan menghambat pertumbuhan dari mikroorganisme setelah inkubasi semalam. Khm ditetapkan sebagai *gold standar* untuk menentukan kerentanan organisme terhadap mikroba dan digunakan untuk menilai kinerja dari semua metode pengujian kerentanan. KHM digunakan di laboratorium diagnostik untuk mengkonfirmasi resistensi yang tidak biasa, untuk memberikan jawaban yang pasti ketika hasil batas diperoleh oleh metode lain yang tidak sesuai.

Pada penelitian ini dilakukan uji KHM ekstrak daun kirinyuh terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus Aureus*, dengan menggunakan metode serial dilusi perbandingan yaitu 40% 60% 80% dan 100%

3.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder dengan menunjukkan ada tidaknya senyawa yang terkandung dalam suatu tanaman. Ujiskrining fitokimia antara lain : (Kumalasari & Andiarna, 2020)

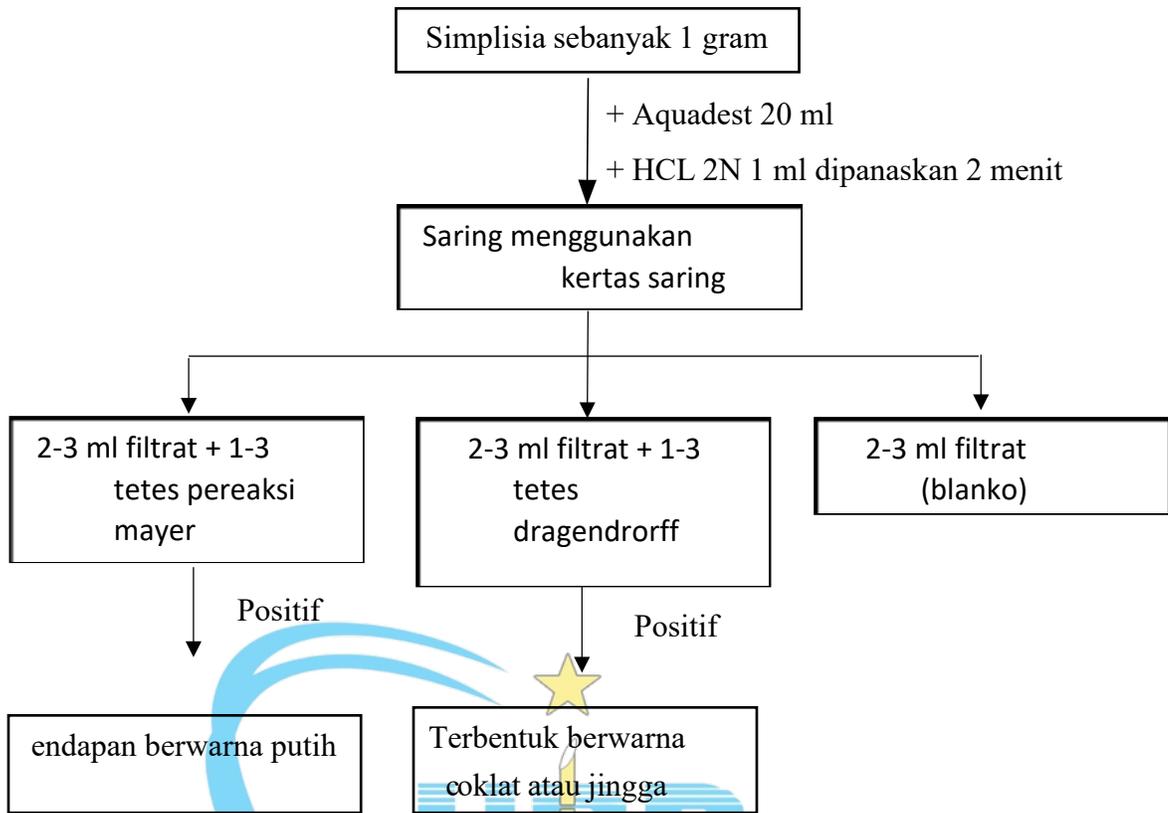
a. Uji Alkaloid

Sebanyak 1 gram sampel ditambah 1 ml HCl dan dipanaskan selama 2 menit sambil terus diaduk. Saring campuran ekstrak Daun kirinyuh dan HCl setelah dingin. Filtrat hasil penyaringan digunakan untuk uji senyawa alkaloid, masukan masing- masing 0,5 ml kedalam 3 tabung reaksi.

- 1) Pada tabung 1, tambahkan pereaksi mayer sebanyak 2 ml akan menunjukkan terbentuk endapan berwarna putih atau kuning.

- 2) Pada tabung 2, tambahkan pereaksi dragendorff sebanyak 2 ml, akan menunjukkan endapan berwarna coklat atau jingga kecoklatan. Pada tabung 3, sebagai blanko

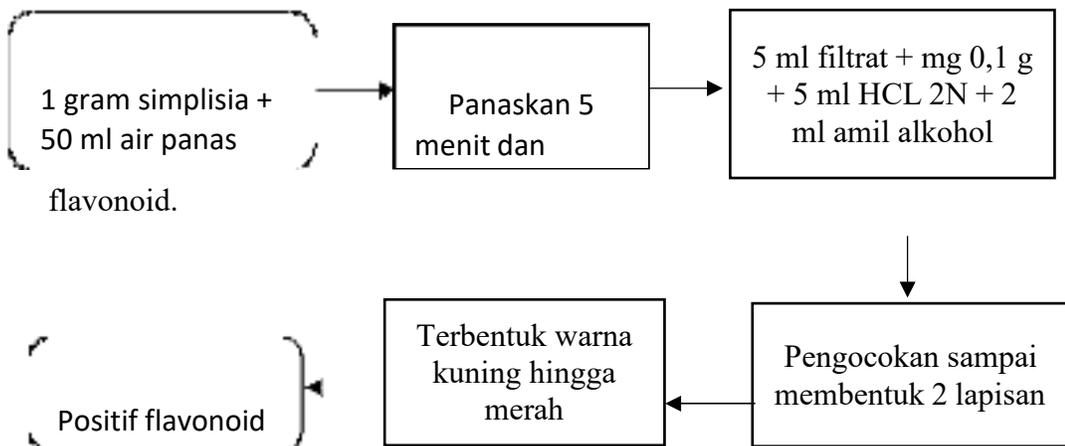




Gambar 3.2 Diagram Uji Alkaloid

b. Uji Flavonoid

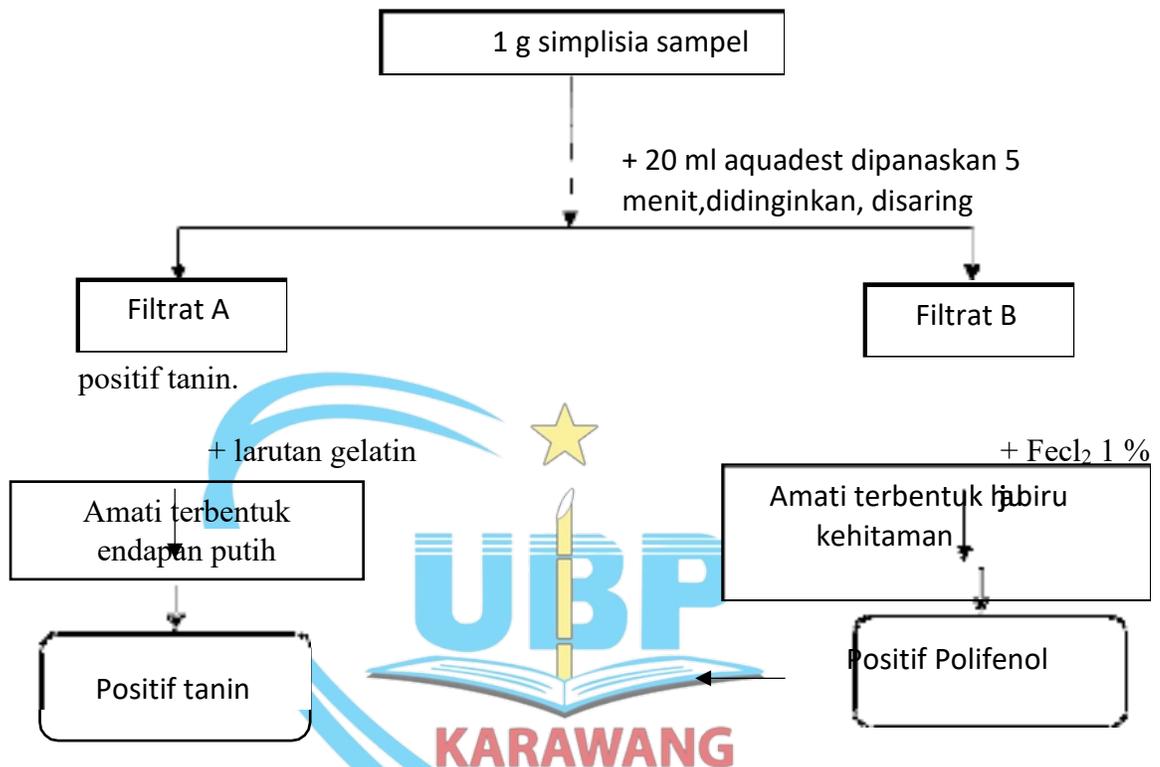
Sebanyak 1 gram sampel ditambahkan dengan 20 ml aquadest, dididihkan selama 5 menit kemudian saring. Filtrat yang dihasilkan ditambahkan dengan sedikit serbuk Mg dan 5 ml HCl 2N. Lalu tambahkan amilalkohol kocok kuat dan biarkan memisah. Terbentuk warna kuning hingga merah (atau suatu warna ekstrak tertentu) yang ditarik dengan amilalkohol menandakan hasil positif flavonoid.



Gambar 3.3 Diagram Uji Flavonoid

c. Uji Tanin dan Polifenol

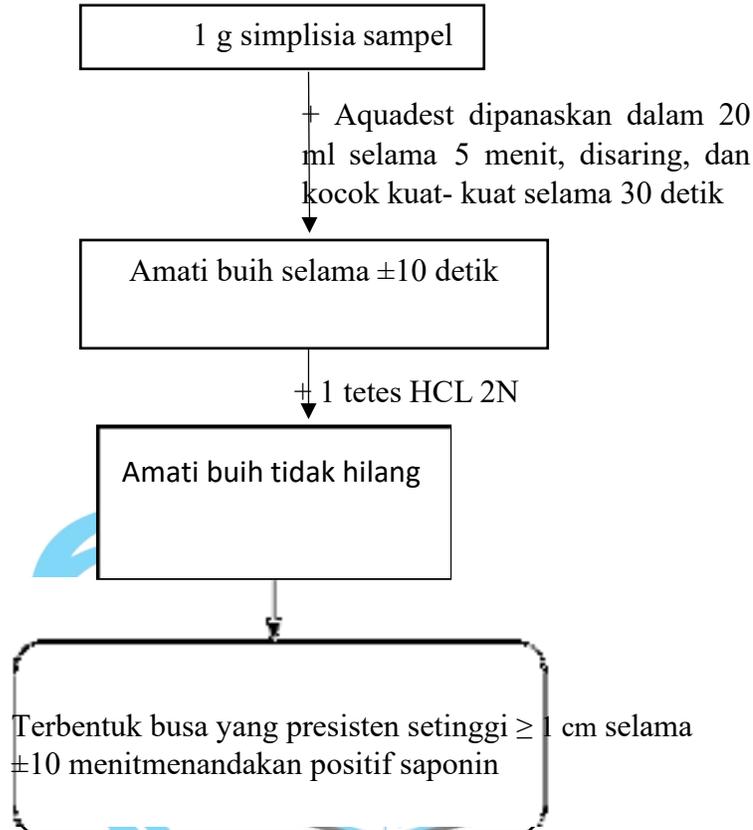
Sebanyak 50 mg sampel masukan dalam tabung reaksi didihkan dalam 30 ml aquadest selama 5 menit, kemudian dinginkan dan disaring (Filtrat A). dalam filtrat A tambahkan gelatin 1%. Terbentuknya endapan putih menandakan hasil



Gambar 3.4 Diagram Uji Tanin

d. Uji Saponin

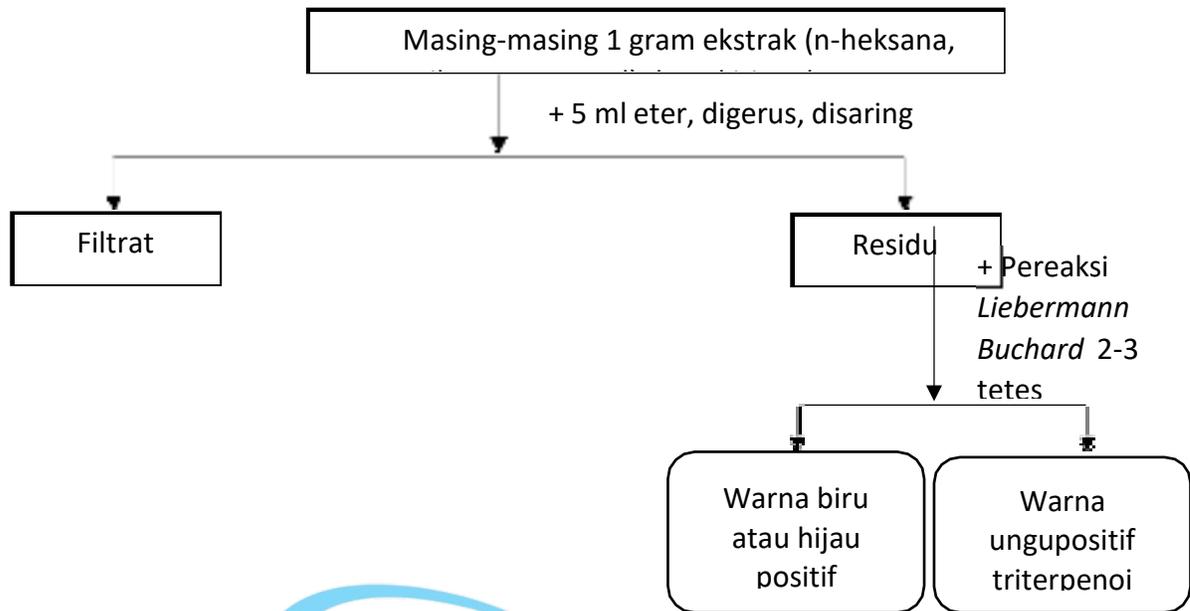
Sebanyak 50 mg sampel masukan dalam tabung reaksi didihkan dalam 20 ml aquadest selama 5 menit, kemudian dinginkan dan disaring (Filtrat A). Sejumlah filtrat A, dikocok vertikal dalam tabung reaksi selama 10 detik. Terbentuknya busa yang persisten setinggi ≥ 1 cm kurang lebih selama 10 menit menandakan hasil positif saponin



Gambar 3.5 Diagram Uji Saponin

e. Uji Triterpenoid dan Steroid

Sebanyak 1 gram sampel digerus dengan 10 ml eter. Filtrat dimasukkan dalam cawan penguap, kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Dalam residu teteskan 2 hingga 3 tetes pereaksi Libermann Buchard. Terbentuk warna ungu menandakan hasil positif triterpenoid, sedangkan terbentuknya warna biru atau hijau menandakan hasil positif steroid.



Gambar 3.6 Diagram Uji Triterpenoid dan Steroid

3.6 Proses Pengujian Aktivitas Antibakteri

A. Sterilisasi Alat

Dicuci bersih semua alat yang akan digunakan, lalu dikeringkan dan bungkus dengan kertas coklat, kemudian alat-alat yang digunakan disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit sampai 30 menit. Untuk alat yang terbuat dari karet disterilkan dengan cara direndam dalam etanol 70%, jarum ose dibakar dengan api bunsen. Simpan alat yang telah disterilisasi pada laminar air flow.

B. Pembuatan Stok Bakteri

Dibuat stok bakteri dilakukan dengan metode sumuran, dengan cara menginokulasikan ose biakan murni bakteri *S. aureus* dalam tabung reaksi yang berisi media agar (STA) miring, kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C (Nurhayati, 2011).

C. Pembuatan Media Agar

Diambil Nutrient Agar (STA) sebanyak 10 g dilarutkan dalam 250 ml aquades (10g/250ml) menggunakan erlenmeyer. Selanjutnya dihomogenkan dengan stirrer di atas

hot plate sampai mendidih. Sebanyak 5 ml dituangkan pada tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil. Media disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama kurang lebih 30 menit sampai media memadat pada kemiringan 30°C. Media agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri (Lay, 1994)

D. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Dimasukkan 10 ml NaCl 0,9% kedalam masing-masing tabung reaksi, diambil bakteri uji yang telah diinokulasikan dengan menggunakan kawat ose steril dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland 0,5%.

E. Pembuatan Stok Variabel Konsentrasi Ekstrak, kontrol negatif dan kontrol positif

Pembuatan stok variable konsentrasi ekstrak yaitu, masing-masing ekstrak (n-heksana, etil asetat, metanol) Daun kirinyuh di buat larutan stok sebagai larutan induk dengan konsentrasi 100%, kemudian diencerkan untuk dibuat beberapa variasi konsentrasi yaitu 40%, 60% 80% dan 100%; DMSO (kontrol negatif); Pembuatan kontrol positif ciprofloxacin yaitu, ditimbang 2 g ciprofloxacin kemudian dilarutkan dalam 2 ml aquadest.