

BAB III

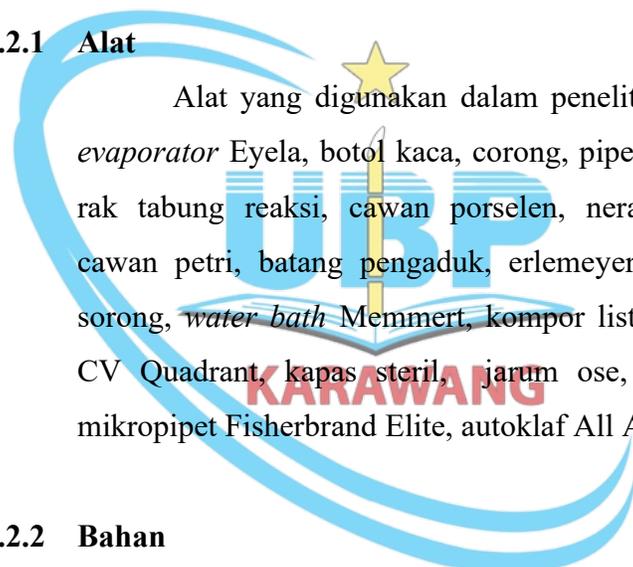
METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bahan alam Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2018 – Februari 2019.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat



Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *rotary evaporator* Eyela, botol kaca, corong, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan porselen, neraca analitik, spatula, cawan petri, batang pengaduk, erlemeyer, gelas ukur, jangka sorong, *water bath* Memmert, kompor listrik, *laminar air flow* CV Quadrant, kapas steril, jarum ose, bunsen, pipet tetes, mikropipet Fisherbrand Elite, autoklaf All American.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kental karang lunak SP2 dan SP4, etanol 70%, *nutrient agar*, NaCl 0,9%, CMC Na, Amoxicilin, Bakteri *S.aureus* ATCC 6538, *B.subtilis* ATCC 6633 dan *E.coli* ATCC 8739.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Ekstraksi

Sampel diekstraksi dengan pelarut etanol dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan. Hasil dari ekstraksi berupa ekstrak cair. Ekstrak cair

selanjutnya dikentalkan dengan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut yang terkandung di dalam ekstrak cair.

3.3.2 Uji Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Sebanyak 4 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 ml kloroform dan 5 ml amoniak 10%, lalu ditambahkan 10 tetes asam sulfat 2M. Diambil bagian atas dari fase yang terbentuk, kemudian ditambahkan mayer. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan merah (Harborne, 1996 dalam Rumagit, 2015).

b. Uji Flavonoid

Ekstrak diambil sebanyak 1 ml lalu ditambahkan dengan serbuk Mg secukupnya dan 10 tetes asam klorida pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna hitam kemerahan, kuning atau jingga.

c. Uji Saponin

Ekstrak uji ditambahkan dengan 10 ml air panas, kemudian ditambahkan asam klorida 2N dan kemudian dikocok kuat. Terbentuk buih stabil kurang lebih 10 menit setinggi 1-10 cm.

d. Uji Tanin

Ekstrak ditambahkan dengan larutan besi (III) klorida 10%. Hasil positif menunjukkan warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan.

e. Uji Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak ditambah 5 ml eter lalu dipipet. Diletakkan dalam cawan penguap hingga pelarut menguap. Filtrat ditambahkan 2-3 tetes pereaksi LB. Hasil positif ditunjukkan

dengan adanya warna aungu (triterpenoid) dan warna biru (steroid).

3.3.3 Penyiapan Media Agar

Timbang NA sejumlah tertentu dan dilarutkan dalam aquadest. Lalu dilarutkan dan dipanaskan sampai berwarna kuning jernih, Lalu disterilisasi dalam autoklaf 121°C selama 15 menit. Setelah itu, dimasukkan ke dalam cawan petri dan didinginkan pada suhu ruang.

3.3.4 Sterilisasi Alat

Cawan petri, tabung reaksi, corong, gelas ukur, serta *Nutrient Agar* (NA) yang telah dibuat dibungkus dalam kertas coklat. Setelah itu, dimasukkan ke dalam autoklaf. Metode sterilisasi yang digunakan adalah metode panas basah, dimana alat-alat yang disterilisasi tahan terhadap pemanasan serta kelembapan. Disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat yang sudah disterilisasi dibungkus kembali dengan kertas coklat kering, lalu diletakkan di lemari *Laminar Air Flow* (LAF) yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol 70%.

3.3.5 Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri uji berupa *S. aureus*, *B. subtilis* dan *E. coli* yang berasal dari biakan murni, diambil satu ose kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada media *nutrient agar* (NA) selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dibuat suspensi bakteri dengan menggunakan NaCl sebagai media pertumbuhannya.

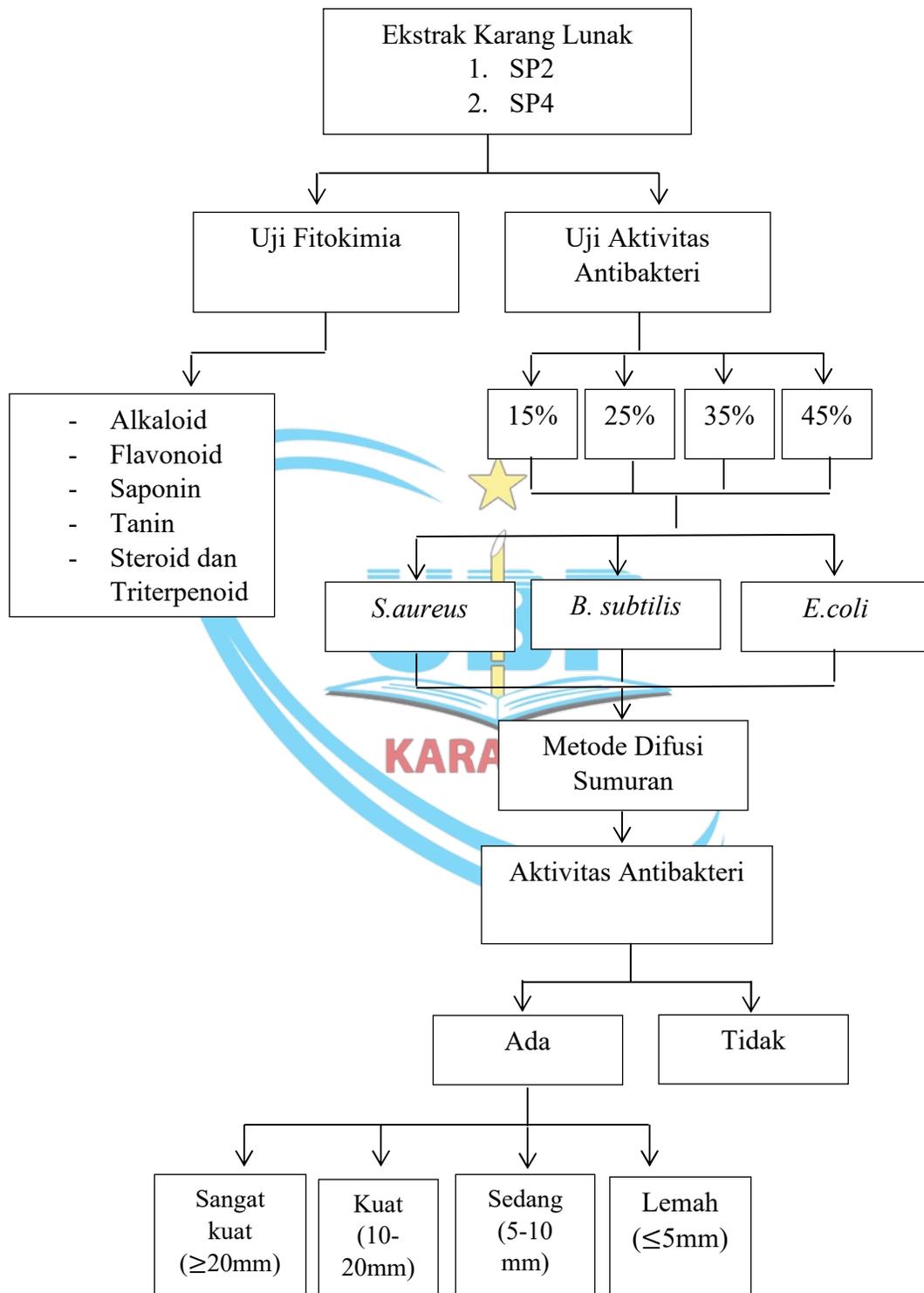
3.3.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian daya hambat ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran. Disiapkan media *nutrient agar* (NA) steril dengan suhu 45 -50⁰C sebanyak 15 ml, selanjutnya dituang secara aseptik kedalam cawan petri steril dan dibiarkan hingga memadat. Selanjutnya suspensi bakteri yang telah disiapkan, di goreskan ke media agar. Selanjutnya, lubang media agar dengan pelubang sumuran dan masing-masing lubang diisikan ekstrak dengan konsentrasi seperti yang ditunjukkan pada tabel 3.1. Konsentrasi ekstrak yang digunakan telah dioptimasi oleh penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, dikatakan bahwa ekstrak karang lunak efektif sebagai antibakteri pada konsentrasi diatas 15%. Ekstrak disuspensikan dalam CMC Na 1%. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Kontrol positif yang digunakan adalah Amoxicilin dan kontrol negatif yang digunakan adalah CMC Na.

Tabel 3. 1 Konsentrasi ekstrak etanol karang lunak yang digunakan dalam penelitian

Ekstrak	Konsentrasi (%)			
SP2	15	25	35	45
SP4	15	25	35	45

3.4 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Karang Lunak SP2 dsn SP4