BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan September 2018 sampai Februari 2019.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain seperangkat alat ekstraksi refluks, *rotary evaporator* (Eyela), waterbath (Memmert), batang pengaduk, tabung reaksi, rak tabung reaksi, neraca analitik, botol kaca, spatula, gelas ukur (Pirex), gelas kimia (Pirex), batu didih, cawan petri, erlenmeyer (Pirex), kompor listik, autoklaf (All American), jarum ose, inkubator, kapas lidi steril, *laminar air flow* (CV Quadrant), alat tulis, jangka sorong (Tricle Brand), mikropipet (Fisherbrand Elite), pinset, cawan penguap.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.), etanol 96% redest, aquadest steril (Widatra Bhakti), DMSO (Dimetil Sulfoksida) (Merck), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, larutan NaCl 0,9% (b/v) (Otsu – NS), medium *nutrient agar* (Oxoid), *paper disk* (Macherey Nagel) dan tablet Ciprofloxacin generik.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Simplisia

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang kunyit. Rimpang kunyit disortasi basah kemudian dicuci dengan air mengalir. Kemudian rimpang kunyit tersebut dirajang dan dikeringkan dengan dijemur di bawah sinar matahari. Setelah proses pengeringan selesai, rimpang

dihaluskan hingga diperoleh serbuk yang akan digunakan untuk proses ekstraksi.

3.3.2 Pembuatan Ekstrak

Rimpang kunyit diekstraksi dengan cara refluks menggunakan pelarut etanol 96%. Rimpang kunyit yang telah halus ditimbang lalu dimasukkan ke dalam labu alas bulat, kemudian ditambahakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan sampel dan pelarut (1:5). Rangkai alat refluks, dan kemudian lakukan ekstraksi. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator dan waterbath hingga diperoleh ekstrak kental etanol rimpang kunyit.

3.3.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia terhadap serbuk simplisia rimpang kunyit meliputi:

1. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram serbuk simplisia ditambahkan 1 ml HCl 2N dan 9 ml air suling. Lalu dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Kemudian filtrat dibagi ke dalam 2 tabung reaksi. Pada tabung pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan merah bata. Pada tabung kedua ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau kuning (Harborne (1987) dalam Marpaung, 2017).

2. Uji Flavonoid

Sebanyak 2 g serbuk simplisia ditambahkan NaOH 10%, tunggu beberapa saat, apabila terbentuk warna kuning, orange atau merah, menunjukkan bahwa adanya flavonoid (Harborne (1987) dalam Marpaung, 2017).

3. Uji Fenol

Sampel sebanyak 1 ml ditambah 10 tetes $FeCl_3$ 1%. Hasil positif adanya senyawa fenolik adalah terbentuknya warna merah, biru, ungu, hitam atau hijau (Harborne (1987) dalam Wardana, 2016).

4. Uji Terpenoid

Uji dilakukan dengan cara sebanyak 2 ml sampel ditambahkan dengan 3 ml H_2SO_4. Lapisan dipermukaan atau antarmuka berwarna coklat kemerahan menunjukkan adanya terpenoid (Riaz *et.al.*, 2015)

5. Uji Steroid

Uji dilakukan dengan cara sebanyak 2 ml sampel ditambahkan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H_2SO_4. Jika terbentuk warna hijau pada larutan maka positif mengandung steroid (Septianingsih, 2013 dalam Ergina, 2014).

6. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan melarutkan sampel dalam aquadest kemudian dipanaskan selama 15 menit lalu dikocok selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang stabil selama kurang lebih 10 menit dan tidak hilang saat ditambahkan beberapa tetes asam klorida 2N, maka sampel positif mengandung saponin (Harborne, 1987 dalam Andriyanto, 2016)

7. Uji Tanin

Uji fitokimia tanin dilakukan dengan penambahan larutan gelatin dalam ekstrak. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih (Mabruroh, 2015). Sebanyak 3 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 5 tetes larutan gelatin, jika terbentuk endapan putih maka positif mengandung tanin (Kusumaningsih, 2015).

Skrining fitokimia terhadap ekstrak etanol rimpang kunyit meliputi:

1. Uji Alkaloid

Ekstrak sebanyak 1 ml ditambah 2 ml HCl 2N dan dikocok. Campuran selanjutnya dibagi dalam 2 tabung berbeda. Masing-masing tabung ditetesi 1 tetes reagen Dragendorff pada tabung pertama, pada tabung kedua ditetesi 1 tetes reagen Mayer. Adanya senyawa alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan kuning pada penambahan reagen Mayer dan terbentuknya endapan merah pada penambahan reagen Dragendorff (Tiwari *et al.* (2011) dalam Wardana, 2016)

2. Uji Flavonoid

Ekstrak sebanyak 1 ml ditambahkan serbuk magnesium secukupnya dan 10 tetes asam klorida pekat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna hitam kemerahan, kuning atau jingga (Rumagit, 2015).

3. Uji Fenol

Ekstrak sebanyak 1 ml ditambah 10 tetes $FeCl_3$ 1%. Hasil positif adanya senyawa fenolik adalah terbentuknya warna merah, biru, ungu, hitam atau hijau (Harborne (1987) dalam Wardana, 2016).

4. Uji Terpenoid

Ekstrak sebanyak 2 ml ditambahkan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H_2SO_4. Jika terbentuk warna merah atau ungu pada larutan maka positif mengandung terpenoid (Septianingsih, 2013 dalam Ergina, 2014).

5. Uji Steroid

Ekstrak sebanyak 2 ml ditambahkan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H_2SO_4. Jika terbentuk warna hijau pada larutan maka positif mengandung steroid (Septianingsih, 2013 dalam Ergina, 2014).

6. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan melarutkan sampel dalam aquadest kemudian dipanaskan selama 15 menit lalu dikocok selama

10 detik. Jika terbentuk buih yang stabil selama kurang lebih 10 menit dan tidak hilang saat ditambahkan beberapa tetes asam klorida 2N, maka sampel positif mengandung saponin (Harborne, 1987 dalam Andriyanto, 2016)

7. Uji Tanin

Uji fitokimia tanin dilakukan dengan penambahan larutan gelatin dalam ekstrak. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih (Mabruroh, 2015). Sebanyak 3 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 5 tetes larutan gelatin, jika terbentuk endapan putih maka positif mengandung tanin (Kusumaningsih, 2015).

3.3.4 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas. Setelah itu dilakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Untuk alat seperti jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara dipijarkan atau dipanaskan pada nyala api bunsen.

3.3.5 Pembuatan Medium NA (*Nutrient Agar*)

Medium NA (*Nutrient Agar*) dibuat dengan cara *Nutrient Agar* dilarutkan dalam aquadest dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Kemudian panaskan sampai mendidih. Selanjutnya media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.3.6 Peremajaan Bakteri

Peremajaan Bakteri dilakukan dengan cara masing-masing biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* diinokulasikan dengan digoreskan pada media NA secara aseptik. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.3.7 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil bakteri uji yang telah diremajakan dengan jarum ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml NaCl 0,9% (b/v) hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan 0,5 *Mc. Farland*.

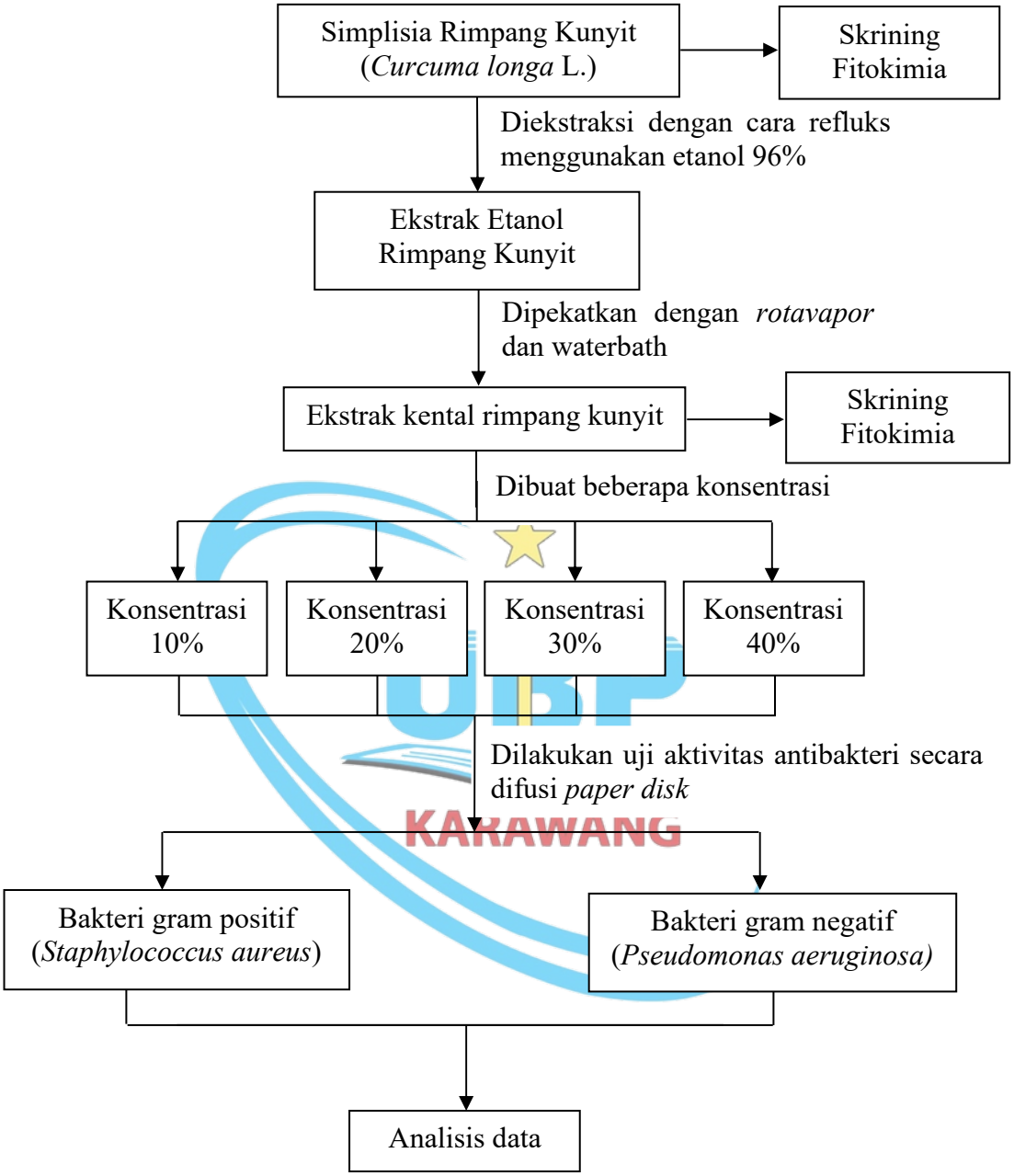
3.3.8 Pembuatan Larutan Uji

Dibuat larutan uji 10%, 20%, 30%, 40% b/v dengan cara ditimbang ekstrak etanol rimpang kunyit masing-masing sebanyak 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, dan 0,4 g kemudian dilarutkan dalam 1 ml DMSO.

3.3.9 Uji Aktivitas Antibakteri

Tuangkan nutrien agar (NA) kedalam cawan petri steril dan biarkan memadat. Setelah memadat, oleskan suspensi bakteri yang telah diukur kesetaraannya dengan *Mc. Farland* di atas media dengan kapas ulas steril. Setelah itu letakkan masing-masing *paper disk* yang telah diteteskan ekstrak etanol rimpang kunyit dengan berbagai konsentrasi (10%, 20%, 30%, 40%), *paper disk* yang mengandung ciprofloxacin (kontrol positif), dan *paper disk* yang mengandung DMSO (kontrol negatif) secara aseptis menggunakan pinset steril pada permukaan media yang telah memadat. Kemudian media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam, dan selanjutnya dilakukan pengamatan serta pengukuran zona hambat yang terbentuk.

3.4 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian