

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain amilum kunyit dan amilum temulawak, *Staphylococcus aureus*, dan tablet ciprofloxacin generic, dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck), NaCl 0.9%, *Mueller Hinton agar* (MHA) (OXOID™), larutan *mc farland* (REMEL), biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, anaerogen (OXOID™).

3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain batang pengaduk, tabung reaksi (PIREX), rak tabung reaksi, timbangan analitik (ADAM EQUIPMENT™), spatula, gelas ukur (pirex), gelas kimia (PIREX), kompor listrik (LUCKY STORE), autoklaf (ALL AMERICAN), jarum ose, incubator, alat tulis, jangka sorong (VERNIER CALIPER 6), mikropipet (*fisherbrand*). Gunting, sarung tangan, masker, lampu spiritus, cawan petri, inkubator (GEMMYOCO), pinjet, batang L, Kertas Coklat.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium bahan alam dan Mikrobiologi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Waktu yang dibutuhkan untuk menyelesaikan penelitian ini kurang lebih selama 6 bulan (Februari sampai dengan Agustus 2020).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Skrining Fitokimia

Skrining Fitokimia terhadap serbuk amilum kunyit dan temulawak meliputi :

a) Uji Alkaloid

Ditimbang 500 mg serbuk simplisia, Ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL aquadest, panaskan di atas tangas air selama 2 menit, dinginkan dan saring, pindahkan 3 tetes filtrat pada kaca arloji, tambahkan 2 tetes larutan

Bouchardat (Jika terdapat endapan berwarna coklat sampai hitam, maka serbuk mengandung alkaloid), tambahkan 2 tetes larutan Mayer (Jika terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam metanol P, maka serbuk mengandung alkaloid).

b) Uji Flavonoid

Sampel ditambahkan serbuk magnesium 0.1 mg dan 0.4 mL amil alkohol (campuran asam klorida 37 % dan etanol 95 % dengan volume yang sama) dan 4 mL alkohol kemudian campuran dikocok. Pembentukan warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan hasil flavonoid.

c) Uji Saponin (uji busa)

Saponin dapat dideteksi dengan uji busa dalam air panas. Busa yang stabil selama 10 menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2 N menunjukkan saponin.

d) Uji Tanin

Ekstrak sebanyak 1 gram ditambahkan 10 mL akuades kemudian dididihkan. Setelah dingin filtrat ditambahkan 5 mL FeCl_3 1 % (b/v). Apabila terjadi perubahan warna menjadi biru tua, berarti sampel mengandung tanin.

e) Uji Folifenolat

Sebanyak 1 gram sampel diekstrak dengan 20 mL etanol 70%. Ekstrak sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 5%. Pembentukan warna hijau atau hijau biru menunjukkan senyawa fenol dalam bahan.

3.4.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian bungkus 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.

3.4.3 Pembuatan Media

Mueller hinton Agar (MHA) ditimbang sebanyak yang dibutuhkan dilarutkan dalam aqua bidws kemudian dipanaskan di atas kompor listrik samai mendidih dan diperoleh larutan jernih. Didisterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Pembuatan media agar sering di gunakan untuk inokulasi bakteri dilakukan melalui tahap berikut: sebanyak 5 mL media agar di masukan kedalam tabung reaksi ,dibiarkan miring dan mengeras pada kemiringan 30°C bakteri uji inokulasi pada media agar miring menggunakan jarum ose kemudian di masukan kedalam *anaerobic jar*, masukan *gas pack* anaero, selanjutnya di inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam untuk bakteri *Staphayelococcus aureus* diinkubasi dalam inkubator (Alusinget *al.*,2017)

3.4.4 Peremajaan Bakteri

Peremajaan Bakteri dilakukan dengan cara masing-masing biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasikan dengan digorskan pada media MHA secara aseptik kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

3.4.5 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan Suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil bakteri uji yang telah di remajakan dengan jarum ose steril lalu disuspensikan kedalam tabung reaksi yang berisi 5 ml NaCl 0.9% (b/v) hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar 0,5 *Mc. Farland*.

3.4.6 Pembuatan Larutan Uji

Dibuat larutan 10%, 20%, 30%, 40% b/v dengan cara ditimbang amilum kunyit dan temulawak masing-masing 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, dan 0,4 g kemudian di larutkan dalam 1 ml DMSO.

3.4.7 Uji Aktivitas Antibakteri

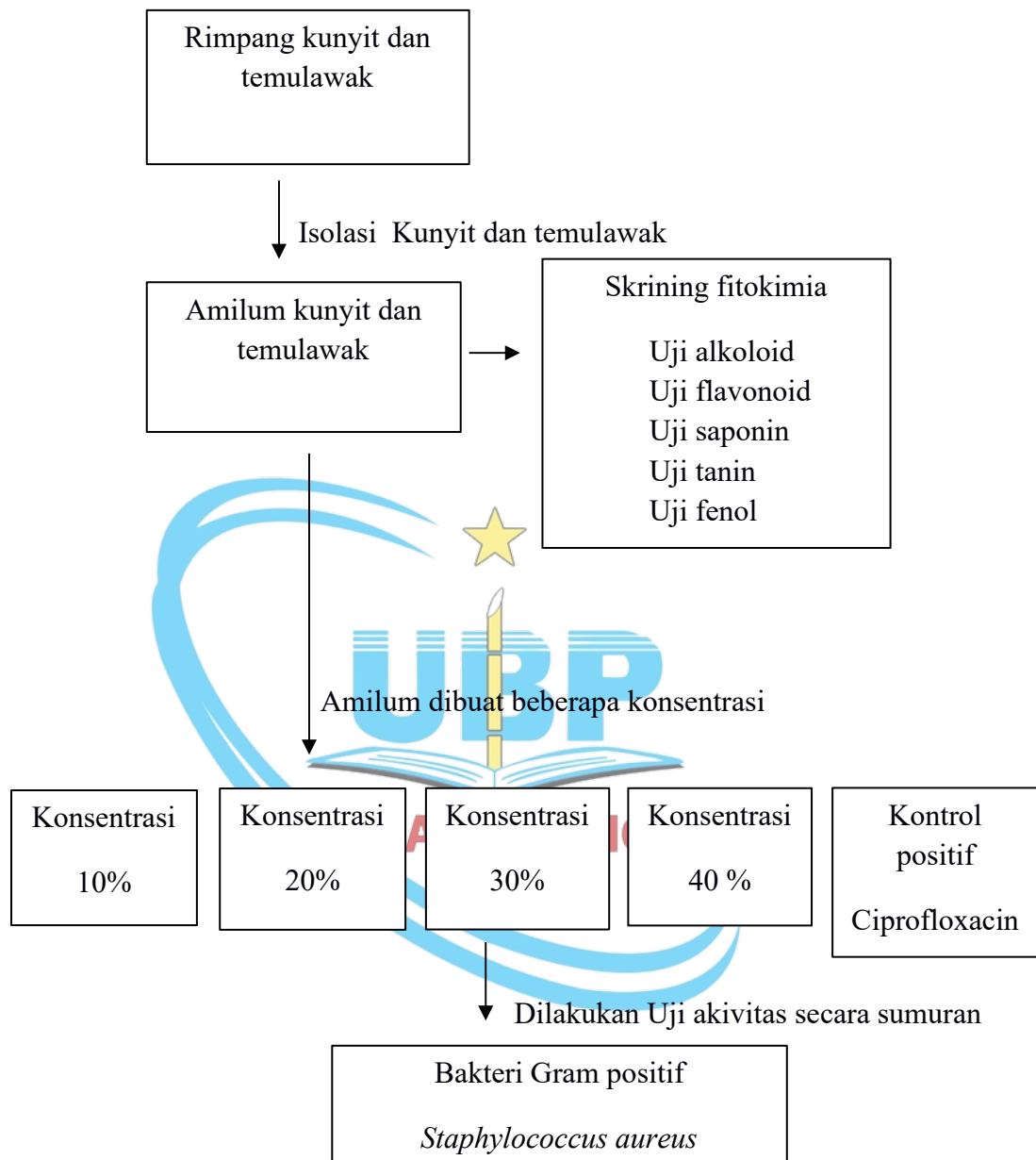
Tuangkan MHA kedalam cawan petri steril dan biarkan memadat. Setelah memadat, Suspensi bakteri yang telah diukur kesetaraannya dengan *Mc. Farland* diatas media dengan mikro pipet. Stelah itu letakan masing-masingkonsetrasi

yang telah dilubangi dengan sumuran amilum kunyit dan temulawak dengan berbagai konsentrasi (10%, 20%, 30%, 40%), ciprofloxacin (kontrol positif). Dan DMSO (kontrol negatif) secara aseptis menggunakan mikro pipet pada permukaan media yang telah memadat. Kemudian media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, dan selanjutnya dilakukan pengamatan zona hambat yang terbentuk.

Ciprofloxacin dipilih sebagai kontrol positif yang merupakan larutan pembanding efek antara obat antimikroba baku dengan larutan amilum uji dalam hal ini amilum kunyit dan temulawak. Pemilihan ciprofloxacin sebagai kontrol positif karena ciprofloxacin merupakan golongan obat fluoroquinolon yang memiliki berfungsi untuk menghambat sintesis DNA bakteri sehingga menghambat resistensi mikroba dan merupakan antimikroba berspektrum luas.



3.5 Diagram Penelitian



Gambar 3.1 Diagram alir

3.6 Analisis data

Analisis data yang digunakan adalah analisis statistik menggunakan *Anova One way* dengan tingkat kepercayaan 95% dan dilakukan dengan mengukur diameter zona bening dari beberapa konsentrasi selama 1x24 jam.



