

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmasi Teknologi Bahan Alam dan Mikrobiologi Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, autoklaf, mikropipet, labu ukur, pipet tetes, batang pengaduk, Timbangan analitik (ADAM EQUIPMENTTM), *rotary evaporator* (EYELA), *waterbath* (memmert) *laminar air flow*, erlenmeyer, autoklaf, inkubator (GEMMYCO), tabung reaksi (IWAKI), erlenmeyer (PYREX), gelas ukur (PYREX), gelas kimia (IWAKI), batang pengaduk, jarum ose, batang L, pinset, cawan petri, aluminium foil, lampu spiritus, kaca arloji, kompor listrik (MASPION), blender, ayakan mesh 65, corong, pelubang sumuran, mikropipet (FisherBrand), jangka sorong (VERNIER CALIPER 6), gunting, sarung tangan, masker.

3.2.2 Bahan

Bahan tanaman yang digunakan adalah rimpang bangle (*Zingiber montanum* (J.Koenig) yang diperoleh dari daerah kalihurif Desa Sirnabaya Kecamatan Teluk Jambe Timur, aquades, HCL, , Dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck), H₂SO₄, FeCl₃, kloroform, etanol 96% (BRATACO), media Nutrien Broth (NB) (OXOIDTM), larutan Mc Farland (REMEL) dan *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Simplisia

Rimpang Bangle yang segar di cuci terlebih dahulu untuk menghilangkan kontaminasi pengotor serta benda asing lain yang tidak diinginkan. Kemudian dikeringkan di oven dengan suhu 50⁰C hingga di peroleh kadar air <10% (Prabowo, *et al.*, 2019).

3.3.2 Ekstraksi

Ekstraksi rimpang bangle dilakukan dengan metode maserasi yaitu dengan merendam 500 g bubuk masing – masing rimpang bangle dengan pelarut etanol 96% selama 24 jam. Kemudian masing – masing filtrat etanolnya difiltrasi, kemudian diulangi lagi dimaserasi dan difiltrasi hingga diperoleh filtrate yang jernih. Semua filtrate dikumpulkan dan dievaporasi pada suhu 46 – 50⁰C hingga semua pelarut etanol habis dan diperoleh ekstrak kental (Citradewi, *et al.*, 2019).

3.3.3 Skrining Fitokimia Ekstrak

A. Uji Flavonoid

Sebanyak 1 gram ekstrak di masukan ke dalam tabung reaksi kemudian di tambahkan serbuk Mg dan 5 mL HCL 2N, apabila warna berubah menjadi warna kuning hingga merah menandakan adanya Flavonoid (Agustina, 2017).

B. Uji Tanin

Sebanyak 1 gram ekstrak di masukan ke dalam tabung reaksi kemudian di teteskan reagen FeCl₃ 10%. apabila terbentuk perubahan warna biru tua atau kehitaman menandakan adanya tannin (Robinson, 1991).

C. Uji Saponin

Sebanyak 1 gram ekstrak di masukan ke dalam tabung reaksi kemudian ekstrak di kocok selama 10 detik, apabila mengandung saponin terdapat busa yang stabil >10 menit setinggi 1-10 cm dan apabila di teteskan 1 tetes HCL 2 N busa tidak hilang (Depkes RI, 1995).

D. Uji Triterpenoid

Sebanyak 1 gram ekstrak di masukan ke dalam tabung reaksi kemudia di teteskan reagen asam asetat anhidrat dan H₂SO₄, apabila terbentuk cincin kecoklatan menunjukkan adanya triterpenoid (Prabowo, *et al.*, 2019).

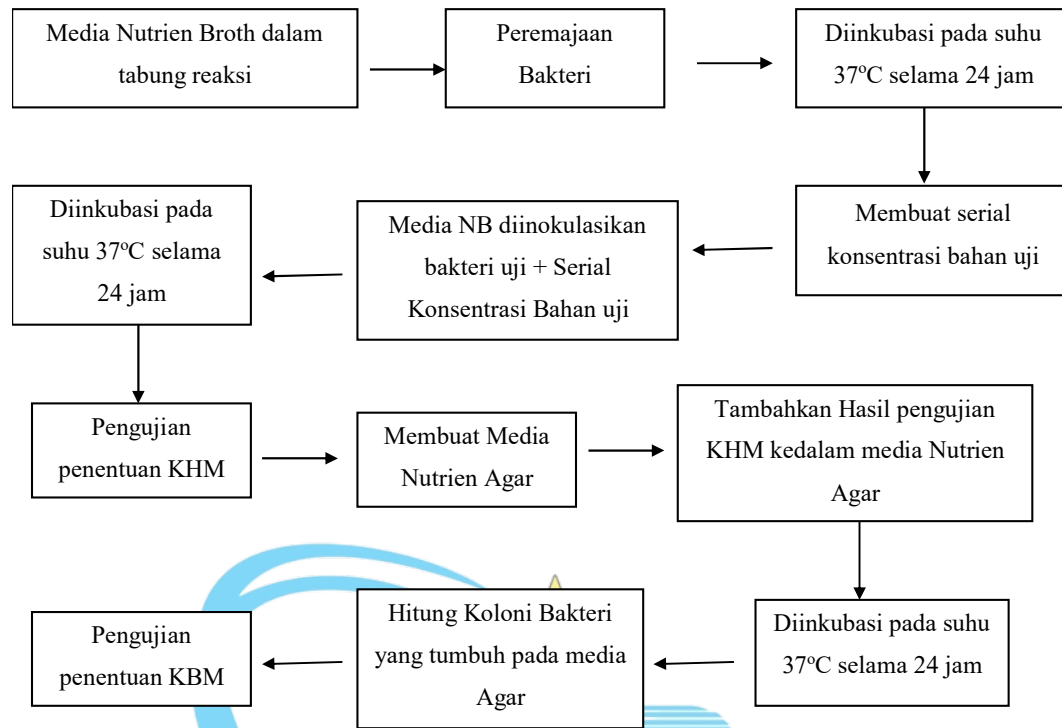
3.3.4 Uji Aktivitas Antibakteri

A. Pembuatan Media Agar

Timbang sejumlah media Nutrien Agar (NA) dan Nutrien Broth (NB) kemudian larutkan dengan aquadest. selanjutnya larutkan dan panaskan sampai larutan berwarna kuning jernih, Lalu disterilisasi Autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, dimasukan kedalam cawan petri dan dinginkan pada suhu ruangan.

B. Pengujian Aktivitas Antibakteri metode dilusi cair / Broth dilution.

Metode dilusi yaitu melarutkan antibiotik dan bakteri uji dalam media cair. Parameter sensitivitasnya dapat dilihat dari tingkat kejernihan. Metode ini dapat digunakan untuk mengukur KHM dan KBM. Metode dilusi menggunakan 1 seri tabung reaksi yang diisi media cair dan jumlah zat tertentu sel mikroba yang di uji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan bahan yang telah diencerkan secara serial yaitu suspensi bakteri yang setara dengan standard Mc Farland 0,5 kecuali tabung nomor 1 sebagai kontrol negatif. Selanjutnya seri tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi yang rendah pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM dari bahan uji. Konsentrasi terendah yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM dari bahan terhadap bakteri uji (Jenida,2017).



Gambar 3.1 Pengujian Aktivitas Antibakteri metode dilusi cair

3.4 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.2. Diagram Alir Penelitian