

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. DESAIN PENELITIAN**

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif eksperimental laboratorium mengenai aktivitas bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *Eschericia coli*.

#### **B. TEMPAT dan WAKTU**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, dan Laboratorium Penelitian Universitas Ahmad Dahlan pada bulan Agustus 2018 – Desember 2018.

#### **C. IDENTIFIKASI VARIABEL PENELITIAN**

1) Variabel bebas

Kadar ekstrak bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*).

2) Variabel tergantung

Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Diameter Zona Inhibisi.

3) Variabel terkontrol

a) Bakteri *Eschericia coli*

b) Jumlah bakteri

c) Media pertumbuhan bakteri

d) Waktu inkubasi 24 jam

e) Suhu inkubasi 37°C

4) Variabel tidak terkendali

Zat aktif dalam bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*)

#### **D. DEFINISI OPERASIONAL**

Diameter Zona Inhibisi (DZI) adalah diameter yang menunjukkan daerah hambatan suatu senyawa antibakteri terhadap bakteri yang diuji dan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

#### **E. INSTRUMEN PENELITIAN**

##### **1. Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *blender*, bejana (*Stainless steel*), kertas saring, corong, *aluminium foil* (Klin Pak®), label (Brand®), *blue tip* (Pipette Tip®), *yellow tip* (Pipette Tip®), *vakum*, *rotari evaporator* (Heidolph®), alat-alat gelas (Prex®), timbangan analitik (Casbee®), ose, pinset, mikropipet (Gilson®), inkubator (Memmert®), *laminar air flow* (LAF), *hot plate* (Thermo Scientific®), almari asam (Fume Hood®), autoklaf (All American®), oven (Shimadzu®), penangas (Akebonno®).

##### **2. Bahan**

###### **a. Bahan uji**

Sampel yang digunakan sebagai bahan uji adalah simplisia kering bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*) yang diperoleh dari Kalimantan

tengah dan determinasi dilakukan di Laboratorium Penelitian Farmasi Universitas Ahmad Dahlan (UAD).

b. Bahan Kimia

Pelarut etanol 70% (Brataco®), asam klorida pekat (HCl), asam sulfat pekat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), aquades (Brataco®), besi III klorida (FeCl<sub>3</sub>), natrium hidroksida (NaOH), natrium klorida (NaCl) fisiologis, anhidrida asetat (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) (Brataco®), kloroform (CHCl<sub>3</sub>) (Brataco®), serbuk logam magnesium (Mg), tween 20% (Brataco®).

c. Bahan uji antimikroba

Mikroba uji yang digunakan adalah *Eschericia coli* ATCC 25922. Antibiotik pembanding adalah kloramfenkol. Media yang digunakan adalah *Nutrien Agar* (NA).

## F. CARA KERJA

### 1. Pembuatan Ekstrak

a. Determinasi Tanaman

Determinasi bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*) dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan (UAD).

b. Penyiapan Bahan

Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*) yang telah dikumpulkan dari Kalimantan tengah dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang masih menempel pada bahan dan dirajang

tipis, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam hingga bahan menjadi simplisia kering. Simplisia yang sudah kering dicuci kembali menggunakan air mengalir. Kemudian simplisia di *blende* sampai halus.

c. Ekstraksi

Serbuk simplisia dari bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*) yang digunakan dalam percobaan sebanyak 1 kilogram. Pembuatan ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi. Serbuk bawang Dayak direndam dengan pelarut etanol 70% selama 5x24 jam. Perbandingan antar serbuk dengan pelarut adalah 1kg : 7 L b/v. Selama maserasi sesekali diaduk agar penyaring sempurna, disaring dan dipisah antar filtrat dan ampas yang terbentuk. Filtrat kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga menghasilkan ekstrak kental.

d. Rendemen total ekstrak bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*).

Rendemen ekstrak bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) total dihitung dengan membandingkan berat awal serbuk dengan berat akhir ekstrak kental total yang diperoleh (Depkes, 2002).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak total yang diperoleh}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

## 2. *Skrining* fitokimia

*Skrining* fitokimia dilakukan untuk melihat senyawa-senyawa kandungan zat aktif yang terkandung dalam ekstrak bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*).

Pengujian *skrinig* fitokimia meliputi :

### a. Flavonoid

Ekstrak dilarutkan dalam 1 ml etanol 96% kemudian ditambahkan sebanyak 0.1 gram serbuk Mg dan 5 tetes asam klorida pekat (HCl). Jika terbentuk warna merah jingga menandakan adanya flavonoid. Jika membentuk warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron (Depkes, 1995).

### b. Kuinon

Sejumlah kurang lebih 5 ml larutan ekstrak ditambahkan natrium hidroksida (NaOH) 1 N, adanya kuinon ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah (Harborne, 1987).

### c. Saponin

Ekstrak ditambahkan 5 ml aquadest panas, didinginkan kemudian digojok kuat-kuat selama 10 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan pada penambahan 1 tetes asam klorida (HCl) 2 N buih tidak hilang (Depkes, 1980).

### d. Steroid / Terpenoid

Sebanyak 1 ml larutan ekstrak ditambahkan 0,5 ml anhidrida asetat ( $C_4H_6O_3$ ) dan 0,5 ml kloroform ( $CHCl_3$ ). Selanjutnya tambahkan asam sulfat pekat ( $H_2SO_4$ ) setetes demi tetes sebanyak 0,2 ml ke dalam dasar tabung dan diamati terbentuknya warna ungu (Depkes, 1980).

e. Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukan ke dalam tabung reaksi, tambahkan dengan  $FeCl_3$  0,1%. Terbentuknya warna biru-hitam, hijau atau biru hijau dan endapan menunjukkan adanya tanin (Harborne, 1987).

### 3. Sterilisasi alat

Alat-alat gelas dan media disterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^\circ C$  selama 15 menit, ose dan pinset dibakar dengan pembakaran diatas api.

### 4. Pembuatan medium *Nutrien Agar* (NA)

Dalam penelitian ini digunakan medium NA dibuat sebanyak 10 cawan petri, setiap cawan berisi 15 ml. NA ditimbang sebanyak 4,2 gram dan dilarutkan dengan 150 ml aquadest. setelah media tercampur, media dipanaskan hingga larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^\circ C$  selama 15 menit, kemudian dimasukan dalam petri yang sudah disiapkan dalam BSC.

### 5. Persiapan inokulum

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Eschericia coli* ATCC

25922.

a. Peremajaan bakteri

Bakteri yang akan diujikan diremajakan pada media *Nutrien Agar* (NA). Mikroba uji diinokulasi sebanyak satu ose ke dalam media NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Peremajaan dilakukan dalam keadaan steril dalam *Laminal Air flow* (LAF).

b. Pembuatan suspensi Bakteri

Bakteri yang telah diremajakan pada media NA diambil satu ose kemudian disuspensikan dalam 15 ml larutan NaCl 0,9 % steril, kemudian dihomogenkan.

**6. Pembuatan larutan uji**

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan membuat beberapa variasi kadar konsentrasi ekstrak 20%, 40%, 60%, dan 80%. Pembuatan variasi konsentasi dengan cara menimbang 0.2 gr, 0,4 gr, 0,6 gr dan 0.8 gr ekstrak kental dilarutkan dengan pelarut Tween 20% hingga volume 1 ml kemudian di vorteks hingga homogen.

**7. Pembuatan larutan kontrol positif**

Pada penelitian ini digunakan kontrol positifnya yaitu antibiotik kotrimoksazol 480 mg. Kotrimoksazol yang digunakan pada pengujin sebanyak 1 mg/1ml. Untuk menghasilkan larutan uji tersebut, maka sebanyak 1 mg kotrimoksazol dilarutkan dalam 1 ml aquadest steril, kemudian vorteks hingga homogen.

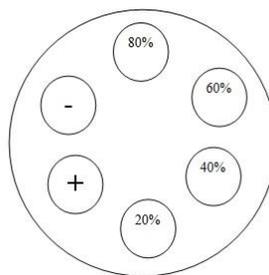
**8. Pembuatan larutan kontrol negatif**

Dalam metode antibakteri ini kontrol negatif yang digunakan adalah tween 20%. Volume larutan kontrol negatif yang ingin digunakan adalah 1 ml, maka diambil tween sebanyak 200 µl dengan mikropipet, kemudian dilarutkan dalam aquadest sebanyak 800 µl kemudian di vorteks sampai homogen.

### 9. Penentuan aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode sumuran

Metode yang digunakan dalam menentukan aktivitas antimikroba dalam penelitian ini adalah metode sumuran. Pertama dalam metode sumuran ini disiapkan cawan petri steril berisi media NA, larutan uji, larutan kontrol positif yaitu antibiotiknya, dan larutan kontrol negatif sebagai pelarutnya. Pengujian dilakukan dalam keadaan semua alat dalam keadaan steril di dalam LAF, kemudian 3 cawan petri berisi media NA diusapkan larutan suspensi bakteri secara merata dengan menggunakan catton bud yang sudah disterilkan menggunakan autoklaf.

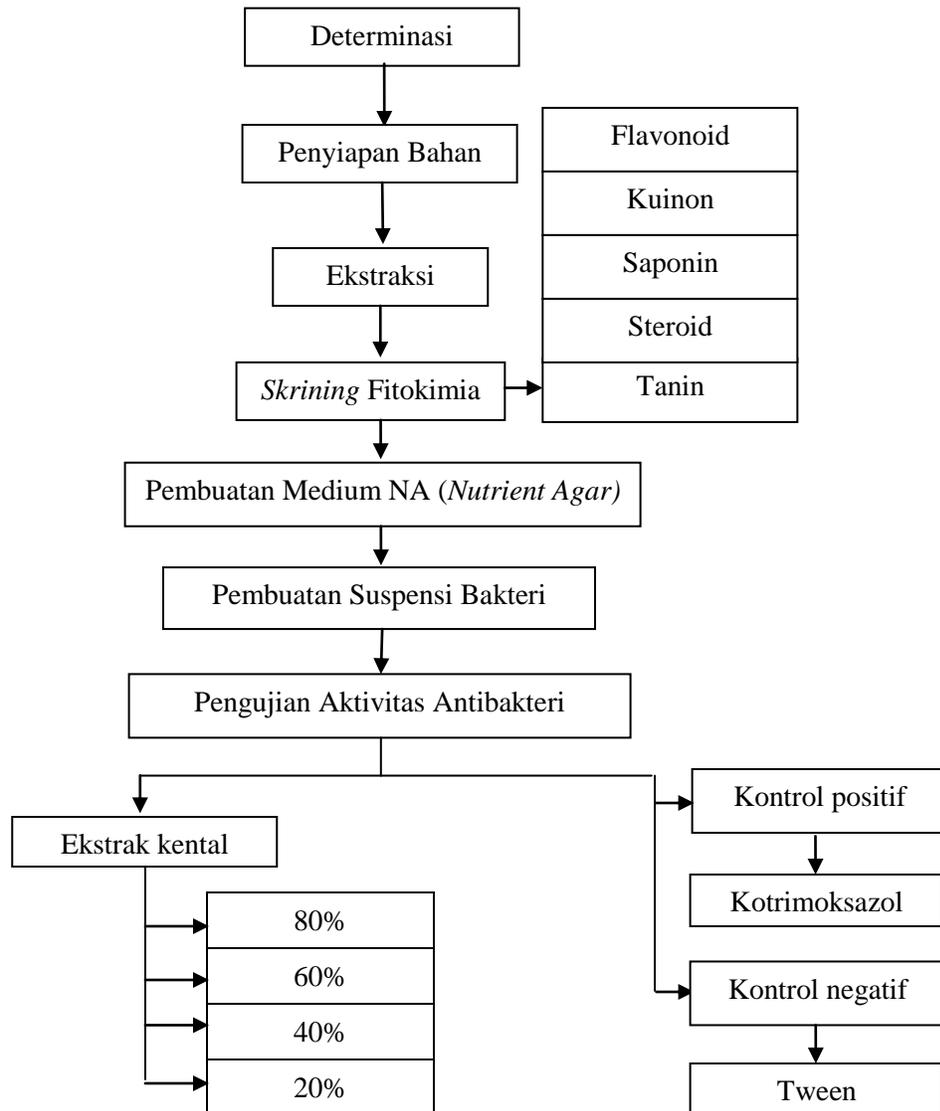
Cawan pentri berisi media NA diberi lubang, masing-masing cawan berisi 6 lubang. Pembagian lubang larutan uji, larutan control positif dan negatif seperti pada gambar 3.1.



**Gambar 3.1.** Pembagian lubang pada cawan petri

Disetiap lubang dimasukan larutan konsetrasi sesuai lubang yang sudah ditetapkan, sebanyak 20  $\mu$ l dengan menggunakan mikropipet. Kemudian dimasukkan cawan petri tersebut ke dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C. Amati dan diukur diameter zona inhibisinya dengan 3 kali pengukuran.

## G. SKEMA LANGKAH KERJA



**Gambar 3.2.** Skema Langkah Kerja Penelitian

## H. ANALISIS DATA

Data hasil penelitian ini disajikan dengan membuat tabel hasil, kemudian dianalisis menggunakan SPSS dengan uji analisis statistik *Kruskal-Wallis* dengan membandingkan nilai diameter zona inhibisi tiap konsentrasi ekstrak bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*) dan kontrol positif Kortrimoksazol terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.