

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental untuk mengetahui daya hambat ekstrak etanol rimpang kunyit hitam terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Penelitian ini diawali dengan preparasi sampel, determinasi tanaman, pembuatan ekstrak etanol 70% rimpang kunyit hitam, skrining fitokimia, uji kromatografi lapis tipis (KLT), serta pengujian daya hambat antibakteri dengan menggunakan metode sumuran.

B. Lokasi dan Waktu

Tempat penelitian yaitu Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Juli tahun 2023.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini yaitu rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) yang diperoleh dari tempat budidaya kunyit hitam yang berada di daerah Samirono, Caturtunggal, Kecamatan Depok, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi Dinas Kesehatan DIY.

2. Sampel

Pada penelitian ini menggunakan dua sampel yang pertama yaitu 1,5 kg rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.). Kunyit hitam yang akan dipanen yaitu yang sudah berumur 10-11 bulan. Lalu sampel yang kedua adalah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : Variasi konsentrasi ekstrak etanol rimpang kunyit hitam.
2. Variabel terikat : Zona hambat dan konsentrasi hambat minimum (KHM) bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* 25922.
3. Variabel terkendali : Suhu, pelarut, bakteri, media pertumbuhan bakteri, waktu inkubasi, dan suhu inkubasi.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak rimpang kunyit hitam merupakan sediaan pekat yang diperoleh dari ekstraksi zat aktif dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian pelarut diuapkan.
2. Zona hambat pertumbuhan bakteri adalah daerah bening di sekitar sumuran media pertumbuhan bakteri yang tidak ditumbuhi bakteri. Ukur zona hambat ini dapat diukur menggunakan jangka sorong dalam sentimeter.
3. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal zat antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan suatu bakteri setelah diinkubasi selama 24 jam dan tidak ada koloni bakteri yang tumbuh pada saat dilakukan pengamatan.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
Untuk persiapan sampel alat yang digunakan yaitu *Grinder*, ayakan 40 mesh (Test Sieve) dan oven. Untuk skrining fitokimia digunakan pipet tetes, rak tabung reaksi (Lokal), dan tabung reaksi (Iwaki). Untuk uji daya hambat bakteri digunakan *autoclave* (B-one), cawan petri (Anubra), inkubator, jarum ose (Lokal), pembakar bunsen (Lokal), mikropipet (Ohaus), jangka sorong (Lokal), timbangan analitik (Ohaus), *cookborrer*, batang L, labu erlenmeyer, pinset, alumunium foil, mikropipet, tabung reaksi, dan *laminar air flow* (LabTech). Untuk persiapan uji KLT dibutuhkan plat, labu ukur, dan erlenmeyer.

2. Bahan

Untuk preparasi sampel dibutuhkan ekstrak rimpang kunyit hitam, pelarut etanol 70%. Untuk skrining fitokimia dibutuhkan serbuk magnesium, larutan amil alkohol, etanol 70%, aquadest, FeCl_3 1%, asetat anhidrat, asam sulfat pekat, kloroform, reagen Mayer, reagen Dragendrof, dan reagen Wagner. Untuk uji daya hambat bakteri digunakan biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* 25922, aquadest, *blue tips*, nutrient agar (NA), Mueller-Hinton agar (MHA), Larutan Standar Mc. Farland 0,5, dan sampel. Untuk persiapan uji KLT dibutuhkan silika gel 60 F254, n-butanol, asam asetat glacial, air, ammonia pekat, etanol, dan kuarsetin.

G. Pelaksanaan Penelitian

1) Persiapan

a. Determinasi Tumbuhan

Determinasi pada tanaman rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Determinasi dilakukan untuk memastikan tanaman yang akan digunakan dan menghindari terjadinya kesalaham dalam pengumpulan sampel serta menghindari kemungkinan tercampurnya tanaman yang akan digunakan dengan tanaman lain.

b. Preparasi sampel

Dilakukan pemanenan kunyit hitam dengan cara dicabut kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) yang sudah layak panen, lalu dilakukan proses sortasi basah untuk membersihkan sampel dari kotoran. Dikumpulkan sekitar 1,5 kg rimpang kunyit hitam. Rimpang kunyit hitam selanjutnya dibersihkan dan dipotong dengan ukuran ± 5 cm lalu dikeringkan di oven pada suhu 40°C. Setelah sampel kunyit hitam dikeringkan, sampel diserbuk menggunakan *grinder* hingga menjadi serbuk dan diayak. (M. U. Ulfah, 2020).

2) Pelaksanaan

a. Pembuatan Ekstrak Rimpang Kunyit Hitam (*Curcuma caesia* Roxb.)

Rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) yang sudah menjadi serbuk selanjutnya diekstraksi menggunakan metode ekstraksi dingin yaitu cara maserasi. Ditimbang 300 gram serbuk kunyit hitam. Serbuk kemudian direndam dengan menggunakan 1,5 liter pelarut etanol 70% selama 3x24 jam hingga bening pada bejana yang kedap udara. Selama maserat berada didalam bejana dilakukan pengadukan yang bertujuan untuk menjaga keseimbangan konsentrasi bahan yang diekstraksi agar lebih cepat larut didalam pelarut. Filtrat yang didapatkan akan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* bertujuan menguapkan pelarut etanol hingga akan didapatkan ekstrak kental etanol rimpang kunyit. Rendemen dapat dihitung berdasarkan ekstrak kental yang diperoleh. Perhitungan rendemen dapat dilakukan dengan menggunakan persamaan (1)

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

b. Skrining Fitokimia

1) Uji Flavonoid

Ekstrak sampel 0.1 gram ditambah dengan 0.1 mg serbuk Magnesium, lalu dimasukkan amil alkohol sebanyak 0.4 mL, dan dimasukkan sebanyak 4 mL etanol 70% lalu digojog. Jika berwarna merah, kuning atau jingga maka artinya positif flavonoid (Udayani *et al.*, 2013).

2) Uji Saponin

Sampel yang sudah diencerkan pada konsentrasi 1000 ppm diambil sebanyak 3 mL ditambahkan dengan 10 mL air panas. Didinginkan dan dikocok selama 10 detik. Jika terbentuk busa dalam waktu 10 menit dan tidak hilang pada saat ditetaskan dengan HCL (Udayani *et al.*, 2013).

3) Uji Tanin

Ekstrak 0,1 g ditambahkan dengan 10 ml aquadest, kemudian disaring. Didiamkan selama 5 menit. Ditetaskan FeCl₃ 1% sebanyak 5 tetes. Adanya warna hitam dan biru hasil positif mengandung tannin (Udayani *et al.*, 2013).

4) Uji Triterpenoid atau Steroid

Sampel yang telah diencerkan pada konsentrasi 1000 ppm diambil sebanyak 5 mL lalu ditambahkan dengan 2 ml kloroform. Digojog hingga tercampur dengan sempurna. Ditambahkan H₂SO₄ beberapa tetes. Steroid ditandai dengan warna hijau, sedangkan warna ungu atau merah menunjukkan adanya triterpenoid (Udayani *et al.*, 2013).

5) Uji Alkaloid

Sebanyak 2 mL sampel yang telah diencerkan ditetesi dengan HCl 1% selanjutnya ditetesi beberapa tetes pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendroff. Untuk pereaksi Mayer didapatkan endapan putih, dan pada pereaksi Wagner dihasilkan endapan coklat sedangkan untuk pereaksi Dragendroff didapatkan hasil endapan jingga (Udayani *et al.*, 2013).

c. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Dilakukan uji KLT yang bertujuan untuk mengetahui secara kualitatif kandungan senyawa flavonoid didalam kunyit hitam. Untuk uji KLT digunakan fase diam yaitu *silica gel* 60 F₂₅₄ dengan fase gerak n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 2 : 8. Bejana yang berisi fase gerak dijenuhkan selama 24 jam. Fase diam yang berukuran 5 x 10 cm dengan tepi bawah dan atas berjarak 1 cm kemudian ditotolkan ekstrak etanol rimpang kunyit hitam dengan konsentrasi 50.000 ppm, serta standar kuarsetin sebagai pembanding dengan konsentrasi 0,1%.

Plat kemudian dimasukkan kedalam bejana yang sudah jenuh, kemudian dibiarkan plat terelusi sampai tanda batas. Bercak yang muncul diamati dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Nilai Rf uji KLT dapat dihitung dengan menggunakan persamaan (2)

$$R_f = \frac{\text{Jarak bercak dari tempat penotolan}}{\text{Jarak elusi}} \dots\dots(2)$$

d. Pengujian Daya Hambat Antibakteri

1. Sterilisasi Alat dan Media

Sebelum dilakukan uji aktivitas antibakteri, disterilisasi dahulu alat-alat yang akan digunakan. Alat gelas dan media yang dipakai disterilisasi dengan alat *autoclave* disuhu 121°C selama 15 menit. Pinset serta jarum ose disterilkan menggunakan api bunsen. Cawan petri, tabung reaksi, dan batang L disterilisasi menggunakan oven pada suhu 171°C selama 1 jam (Lusi dkk, 2016).

2. Pembuatan Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)

Media *Muller Hinton Agar* (MHA) digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri. Dibuat dengan menimbang terlebih dahulu MHA sejumlah 10,54 gram, kemudian media dimasukkan kedalam labu erlenmeyer dengan dicampurkan aquadest hingga sampai volume 310 mL. Dipanaskan dan dihomogenkan. Disterilisasi media menggunakan autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media dituangkan kedalam cawan petri hingga 25 mL lalu didiamkan sampai memadat (Nurhayati *et al.*, 2020).

3. Pembuatan media Nutrient Agar (NA)

Dilarutkan 1,2 gram bubuk media NA dengan aquadest 60 mL dalam erlenmeyer. Dipanaskan sampai bubuk benar-benar larut menggunakan hotplate. Disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Media dipindahkan kedalam tabung reaksi dalam posisi miring. Nutrient agar ini berfungsi untuk peremajaan bakteri (Fatmariza *et al.*, 2017).

4. Peremajaan Kultur Murni Bakteri

Masing-masing bakteri uji berupa biakan murni *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 diambil satu ose kemudian diinokulasi pada media NA dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

5. Pembuatan Larutan Standar Mc Farland 0,5

Larutan H_2SO_4 1% sejumlah 9,95 mL dicampur menggunakan larutan $BaCl_2$ 1% sejumlah 0,05 mL ke erlenmeyer yang setara dengan kepadatan bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Digojog hingga membentuk larutan berwarna keruh yang setara dengan 0,5 larutan Mc Farland lalu diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm (Taufiqurrahman *et al.*, 2023).

6. Persiapan Suspensi Bakteri Uji

Diambil satu ose koloni uji yang berasal dari media Nutrient Agar yang padat kemudian dicampurkan dengan larutan NaCl 5 mL ke dalam tabung reaksi. Distandarisasi kekeruhan suspensi koloni menggunakan standar 0,5 McFarland (sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU / mL) (Nurhayati *et al.*, 2020).

7. Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam

Ditimbang 15 gram ekstrak kental, dilarutkan dalam etanol sebanyak 15 mL didalam erlenmeyer. Larutan stok dibuat dalam konsentrasi 100%. Larutan yang digunakan dalam pengujian dibuat menjadi 4 konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75% dan 100%.

8. Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Ditimbang sediaan obat kapsul kloramfenikol 250 mg sebanyak 2 gram. Serbuk dilarutkan dalam etanol 2 mL untuk memperoleh larutan stok kloramfenikol. Dibuat kontrol positif dalam beberapa konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75% dan 100%. Di ultrasonifikasi larutan kontrol kontrol positif selama 10 menit pada suhu 40°C.

9. Pembuatan Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan pada penelitian ini yaitu etanol 70%, dengan cara membuat larutan stol etanol dengan mengambil 5 mL etanol, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 10 mL. Ditutup dengan menggunakan alumunium foil. Kontrol negatif digunakan sebagai pembanding dan pelarut untuk pembuatan larutan kontrol positif dan pembuatan larutan uji.

10. Pengujian Antibakteri dengan Metode Sumuran

Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah terisi media *Mueller Hinton Agar* dengan cara mengambil 100 μL menggunakan mikropipet dan diratakan dengan batang L. Tiap cawan petri dibagi menjadi 4 bagian dengan cara dilobangi menggunakan alat *cork borer* pada diameter 6 mm. Dimasukkan ekstrak etanol rimpang kunyit hitam dengan berbagai konsentrasi kedalam sumuran yang telah dibuat sebanyak 20 μL menggunakan mikropipet.

Selain itu pada 1 cawan petri dibagi menjadi 2 bagian untuk kontrol positif dengan konsentrasi 25% dan 100% lalu 50% serta 75%. Dimasukkan larutan kloramfenikol sebanyak 20 μL kedalam sumuran yang telah dibuat. Dilakukan 3 kali perlakuan pada masing-masing cawan. Dimasukkan etanol 70% sebanyak 20 μL sebagai kontrol negatif yang dilakukan pada 1 cawan berisi 3 sumuran. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dan diamati zona bening di sekitar sumuran (Nurhayati *et al.*, 2020).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan Aktivitas Antibakteri

Perhitungan zona hambat bakteri merupakan salah satu aktivitas dalam menentukan zona bening dan untuk mengetahui adanya daya hambat yang dibentuk oleh agen bakteri tersebut. Alat yang akan digunakan untuk menghitung zona hambat pada bakteri yaitu jangka sorong analitik. Perhitungan zona hambat pada cawan dilakukan dengan 3 arah yaitu horizontal, vertikal dan diagonal. Menurut Davis dan Stout dalam (Pangow *et al.*, 2020) klasifikasi zona hambat dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Tabel 2. Klasifikasi Zona Hambat Bakteri

Diameter zona terang	Respon hambat pertumbuhan
>20 mm	Sangat Kuat
11-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
<5 mm	Kurang

2. Analisis Data

Data yang didapatkan dari penelitian ekstrak etanol rimpang kunyit hitam pada variasi konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75%, dan 100% selanjutnya dianalisis menggunakan program SPSS versi 29. Uji ini dilakukan untuk menentukan data setiap konsentrasi ekstrak berbeda signifikan atau tidak. Untuk uji normalitas digunakan rumus *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas digunakan rumus dari *Levene Test* data homogen apabila nilai signifikan $>0,05$. Hasil dari pengujian terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 selanjutnya dianalisa dengan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) *one way* dengan taraf kepercayaan 95%, yang mana ANOVA *one way* ini akan digunakan untuk mengetahui variasi konsentrasi antibakteri yang dilihat dari angka signifikansi.