

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian bersifat eksperimen untuk membandingkan efek perlakuan antara kelompok perlakuan serta kelompok kontrol. Proses yang digunakan dalam mengekstraksi rimpang kunyit hitam dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Prosedur yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri yaitu difusi agar sumuran untuk mengetahui diameter zona hambat dan konsentrasi hambat minimum dari ekstrak etanol rimpang kunyit hitam terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Bahan Alam, Prodi Farmasi, Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Determinasi dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan. Waktu pelaksanaan penelitian adalah bulan Juli hingga Agustus 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi: Dalam penelitian ini adalah kunyit hitam yang diambil dari Desa Pino, RT.1/RW.8, Bendo, Pojok, Kecamatan Mojogedang, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah (-7,5589627, 111,0202437).
2. Sampel: Dalam penelitian ini adalah rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) dan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang didapatkan dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi Yogyakarta, Ngadinegaran, Mantrijeron, Kecamatan Mantrijeron, Daerah Istimewa Yogyakarta.

D. Variabel

1. Variabel Bebas

Konsentrasi ekstrak etanol rimpang kunyit hitam 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100%.

2. Variabel Tergantung

Konsentrasi yang paling efektif dan diameter zona hambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Variabel Terkendali

Media, pelarut ekstraksi, waktu dan suhu inkubasi media uji, bagian seluruh rimpang, sterilisasi alat dan bahan, serta diameter sumuran yang digunakan.

E. Definisi Operasional

1. Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan zat aktif dari suatu padatan maupun cairan dengan menggunakan bantuan pelarut. Ekstrak etanol rimpang kunyit hitam dengan seri konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.
2. Konsentrasi efektif adalah konsentrasi yang daya antibakterinya dikategorikan kuat untuk membentuk zona hambat terbesar.
3. Zona hambat merupakan daerah jernih di sekeliling sumuran dari media pertumbuhan bakteri uji yang tidak ditumbuhi bakteri. Lebar diameter zona hambat diukur secara horizontal, vertikal, dan diagonal dengan menggunakan jangka sorong.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk pengolahan sampel meliputi oven (Memmert UN160), grinder (Fomac), dan ayakan 40 mesh. Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak meliputi toples kaca, kain mori, spatula kayu, wajan, dan kompor listrik. Alat yang digunakan untuk uji fitokimia adalah tabung reaksi dan pipet tetes. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri meliputi gelas beker (50 mL), *bluetip*, jangka sorong, jarum ose, autoklaf (Gea LS-B50L), kertas payung, cork borer, pembakar bunsen, labu

takar 5 mL, pinset, *Hotplate* (IKA HS-7), *magnetic stirrer*, mikropipet 100-1000 μL , lemari pendingin, spektrofotometer UV-Vis, neraca analitik (Ohaus), *beaker glass* (250 mL dan 1000 mL), inkubator (Memmert IN30), *Biological Safety Cabinet* (BSC) (Daihan Labtech), batang-L, labu Erlenmeyer 250 mL (Iwaki), dan gelas ukur (10 mL dan 50 mL).

2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah rimpang kunyit hitam 1500 g dan etanol 70%. Bahan yang digunakan untuk uji fitokimia meliputi akuades, HCL 2 N, Dragendroff, Mayer, Wagner, serbuk Magnesium, besi (III) klorida (FeCl_3) 1%, asam asetat anhidrat, dan asam sulfat (H_2SO_4) 1%. Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri meliputi kultur bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, dimetil sulfoksida (DMSO) 10%, *clindamycin* 300 mg, spiritus, akuades, kapas, *Nutrient Agar* (Merck), kain kasa, *Mueller Hinton Agar* (Merck), *aluminium foil*, barium klorida (BaCl_2) 1%, dan natrium klorida (NaCl) 0,9%.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman Rimpang Kunyit Hitam (*Curcuma caesia* Roxb.)

Determinasi Rimpang kunyit hitam dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta, bertujuan untuk memastikan keaslian dari simplisia yang akan digunakan dalam penelitian.

2. Penyiapan Sampel

a. Pengambilan Sampel

Tanaman kunyit hitam yang diambil adalah bagian rimpang kunyit hitam segar, utuh, tidak rusak yang berasal dari Desa Pino, RT.1/RW.8, Bendo, Pojok, Kecamatan Mojogedang, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah (-7,5589627, 111,0202437).

b. Pengolahan Sampel

Rimpang kunyit hitam diambil sebanyak 1500 gram lalu dicuci dengan alir mengalir kemudian ditiriskan di wadah setelah itu dipotong menjadi

beberapa bagian kemudian dikeringkan selama 24 jam dalam oven pada suhu 40°C hingga menjadi simplisia kering. Tujuan pengeringan adalah untuk menguapkan air dalam sampel. Setelah kering, grinder digunakan untuk menghaluskan simplisia, kemudian serbuk rimpang kunyit hitam dimasukkan ke dalam toples kaca.

c. Pembuatan ekstrak etanol rimpang kunyit hitam

Serbuk rimpang kunyit hitam yang sudah ditimbang 300g lalu diekstraksi melalui metode maserasi. Pelarut yang digunakan yaitu etanol 70% dengan perbandingan 1:10 dan direndam selama 3×24 jam. Wadah yang digunakan untuk maserasi yaitu toples kaca, kemudian ditutup rapat dan disimpan di tempat tertutup dan tidak terpapar sinar matahari. Pengadukan dilakukan setiap 6 jam. Pada hari keempat, penyaringan dilakukan menggunakan kain mori dan didapatkan filtrat 1. Kemudian residu ekstrak etanol rimpang kunyit hitam diremaserasi menggunakan etanol 70% sebanyak 1 L selama 2×24 jam diaduk setiap 6 jam, setelah itu disaring filtrat menggunakan kain mori (filtrat 2). Gabungkan kedua filtrat, dipekatan menggunakan wajan dipanaskan pada kompor listrik suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak kental (Binugraheni *et al.*, 2022). Hasil dari ekstrak kental dilakukan penimbangan serta dihitung nilai rendemennya.

Rendemen ekstrak kental dapat dihitung menggunakan rumus persamaan (2).

$$\text{Rendemen} \left(\% \frac{b}{a} \right) = \frac{\text{Berat Ekstrak (gram)}}{\text{Berat simplisia (gram)}} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

3. Kontrol Kualitas Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam

a. Penetapan organoleptik

Bentuk, bau, warna, dan rasa dari sampel ekstrak etanol rimpang kunyit hitam diidentifikasi secara fisik menggunakan pancaindra.

b. Uji fitokimia

1) Identifikasi alkaloid

Ditimbang 0,2 gram ekstrak dilarutkan dalam 2 mL etanol 70%, dimasukkan ke tabung reaksi A, B, Dan C sebanyak 2 mL lalu tambahkan 1 mL HCl 2N, lalu masukkan reaksi yang berbeda ke dalam 3 tabung. Pada tabung pertama ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 5 tetes, apabila terlihat endapan warna putih, hasil sampel tersebut positif teridentifikasi adanya alkaloid. Pada tabung ke 2 ditambahkan 5 tetes pereaksi Dragendoff, lalu diamati jika terbentuk endapan warna jingga hasil sampel tersebut positif teridentifikasi adanya alkaloid. Tabung ke 3 ditambahkan 5 tetes pereaksi Wagner, jika terlihat adanya endapan warna merah kecoklatan, hasil sampel tersebut positif teridentifikasi adanya alkaloid (Kilis *et al.*, 2022).

2) Identifikasi flavonoid

Dimasukkan 0,2 gram ekstrak kedalam tabung reaksi, lalu dilarutkan dalam 2 mL menggunakan etanol 70%, kemudian ditambahkan 5 tetes HCL pekat dan tambahkan sedikit serbuk magnesium. Hasil positif ditandai apabila terbentuknya warna hitam kemerahan atau merah tua dalam waktu 3 menit, ini menunjukkan bahwa adanya flavonoid (Kilis *et al.*, 2022).

3) Identifikasi saponin

Dimasukkan 0,2 gram ekstrak kedalam tabung reaksi, lalu dilarutkan dalam 2 mL menggunakan etanol 70%, lalu ditambahkan 1 tetes HCl 2N dan gojok kuat tabung reaksi selama 10 detik. Apabila terbentuk busa stabil selama 7 menit maka menunjukkan hasil positif adanya saponin (Kilis *et al.*, 2022).

4) Identifikasi tanin

Dimasukkan 0,2 gram ekstrak kedalam tabung reaksi, lalu dilarutkan dalam 2 mL etanol 70% ditambahkan dengan 10 tetes FeCl_3 10%, apabila menghasilkan warna hijau kehitaman maka hasil menunjukkan positif adanya tannin (Kilis *et al.*, 2022).

5) Identifikasi steroid dan triterpenoid

Ekstrak sebanyak 0,2 gram dilarutkan dalam 2 mL ditambahkan CH_3COOH glasial sebanyak 10 tetes dan H_2SO_4 pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Terbentuknya warna hijau atau biru (triterpenoid), dan merah atau ungu (steroid) menunjukkan hasil positif triterpenoid dan steroid (Kilis *et al.*, 2022).

4. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi dilakukan untuk mencegah kontaminasi. Jika tidak dilakukan bisa menimbulkan kontaminasi alat serta bahan yang digunakan, yang mengganggu pengawasan. Metode sterilisasi panas kering digunakan untuk membersihkan alat selama 1 jam dengan menggunakan oven pada suhu 171°C . Penting untuk membersihkan dan mengeringkan alat sebelum membungkusnya dengan kertas payung alat dan menyiramnya dengan alkohol 70%. Alat-alat logam disterilkan dengan cara dipijarkan pada api Bunsen (Misra, 2012).

Autoklaf digunakan untuk melakukan proses sterilisasi panas basah selama 15 menit pada suhu 121°C . Media harus steril agar bakteri yang akan disembarkan ke dalamnya tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme lain. (Misra, 2012).

b. Pembuatan Media

Media yang digunakan untuk peremajaan bakteri, yaitu *Nutrient Agar* (NA). Media NA sebanyak 1 gram dilarutkan dengan 50 mL akuades menggunakan labu erlenmeyer, setelah itu diaduk dengan bantuan *hot plate* dan *magnetic stirrer* hingga homogen. Kemudian ditutup lubang labu erlenmeyer dengan kapas dan aluminium foil lalu disterilkan menggunakan autoklaf dengan temperatur 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Media yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri, yaitu *Muller Hinton Agar* (MHA). Media MHA sebanyak 38 gram dilarutkan dengan

150 mL akuades menggunakan labu erlenmeyer, setelah itu diaduk dengan bantuan *hot plate* dan magnetic stirrer hingga larut homogen. Kemudian ditutup lubang labu erlenmeyer dengan kapas dan aluminium foil lalu disterilkan menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

c. Peremajaan Bakteri

Bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa*, kultur isolat bakteri didapat dari Balai Laboratorium Kesehatan Dan Kalibrasi Yogyakarta. Setelah menginokulasikan bakteri ke dalam media NA miring, bakteri uji diremajakan. Setelah itu, bakteri disimpan selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C. Bakteri diremajakan dalam tabung reaksi dengan memiringkan media NA, yang membuatnya lebih mudah untuk melihat implantasi bakteri.

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Diambil 2 ose biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* lalu disuspensikan dengan larutan NaCl 0,9% sebanyak 10 mL dilakukan sampai mencapai tingkat kekeruhan sesuai dengan larutan standar *Mc Farland 0,5* atau sebanding dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Jumlah bakteri yang diterima untuk uji kepekaan adalah $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Misra, 2012).

e. Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Uji

Dibuat variasi pada konsentrasi larutan ekstrak etanol rimpang kunyit hitam dengan konsentrasi 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100%. Dilarutkan sebanyak 20 gram ekstrak rimpang kunyit hitam menggunakan 20 mL DMSO 10% untuk larutan stok 100%. Kemudian diencerkan larutan stok sampai menjadi konsentrasi 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100% dengan rumus pengenceran yaitu $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ dalam 5 mL.

f. Pembuatan Kontrol Positif

Larutan kontrol positif menggunakan antibiotik *clindamycin* 150 mg dengan konsentrasi 0,03%. Pembuatan antibiotik dilakukan dengan membuat larutan, caranya yaitu larutkan satu kapsul *clindamycin* 150mg

tambahkan aquades masukan kedalam labu ukur 100ml tanda batas ad homogenkan.

g. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan di ruang kerja laboratorium dengan ventilasi udara yang dirancang untuk melindungi personel yang menangani sampel dari potensi kontaminasi dan mencari perawatan lingkungan jangka panjang di BSC (*Biological Safety Cabinets*). (Biosafety Cabinet, 2021). Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi sumuran. Setelah diinokulasi dengan 0,1 mL atau 100 μ L bakteri uji, pelat medium MHA diratakan menggunakan batang L. Dibuat sumuran pada media dengan diameter 0,5 cm, ketebalan media MHA 0,6 cm, dan jarak sumuran 2 cm. Selama 24 jam, media uji disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C. Menggunakan suhu 37°C karena itu adalah suhu terbaik untuk pertumbuhan bakteri. Selanjutnya, jangka sorong digunakan untuk mengukur diameter zona hambat dengan satuan milimeter (mm) secara horizontal, vertikal, dan diagonal. Uji aktivitas antibakteri melibatkan replikasi 3 kali.

Uji aktivitas antibakteri dikelompokkan menjadi 2, yaitu:

- a. Kelompok kontrol: kontrol positif menggunakan *clindamycin* karena bekerja menghentikan pertumbuhan dan reproduksi bakteri dengan mengubah atau menghentikan sintesis protein (Yesilkaya, 2013). Kontrol negatif menggunakan DMSO karena DMSO tidak memiliki aktivitas antibakteri (Rachmawati *et al.*, 2016) dan bertujuan untuk menunjukkan bahwa tidak ada aktivitas terhadap bakteri uji untuk mencegah pembentukan zona hambat. (Utomo *et al.*, 2018).
- b. Kelompok perlakuan: larutan uji ekstrak etanol konsentrasi 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100%.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

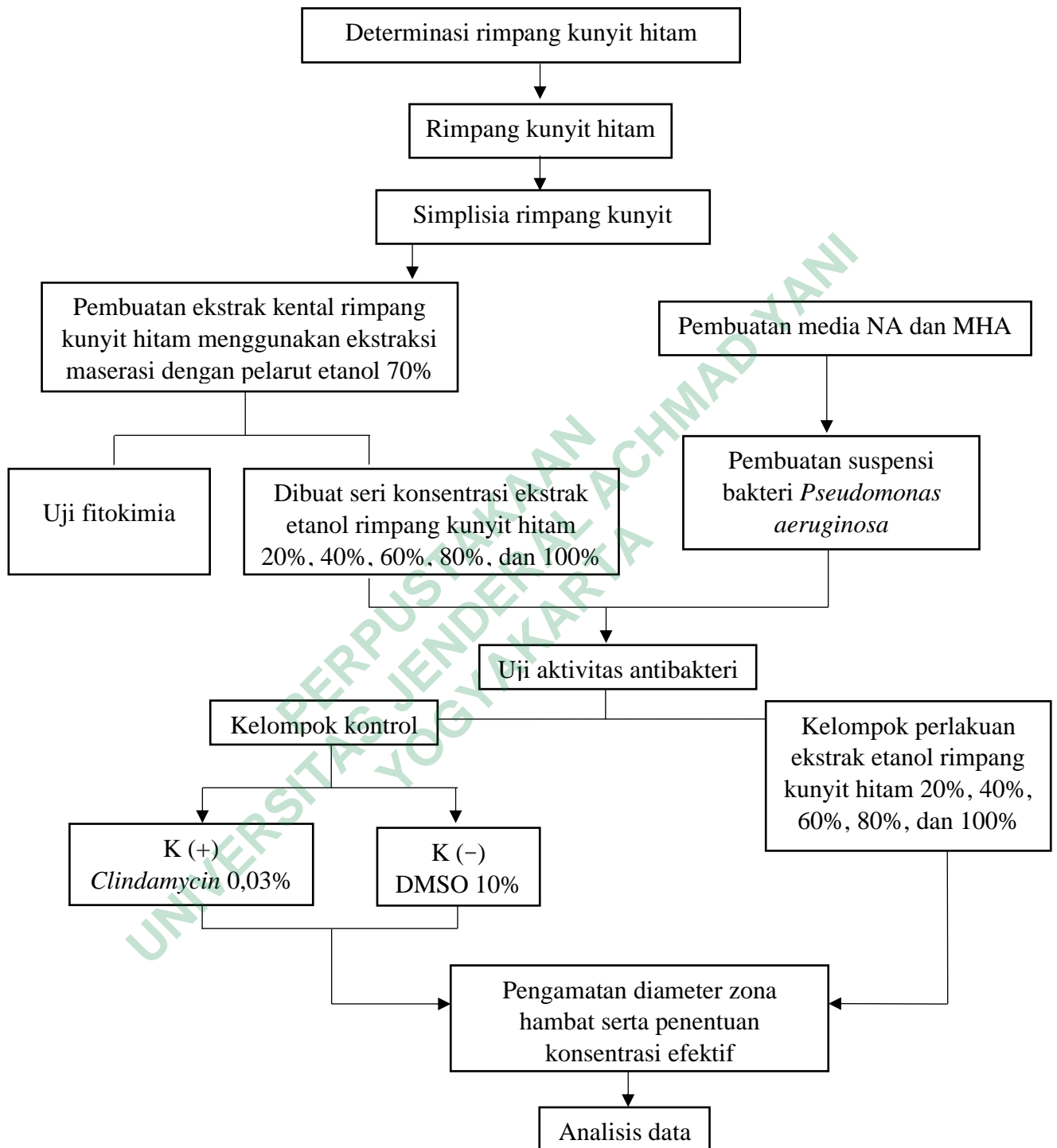
Data zona penghambatan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dianalisis secara deskriptif dan diolah menggunakan perangkat lunak SPSS. Untuk mengetahui normalitas data, statistik *Shapiro-Wilk* digunakan untuk data kurang dari 50. Data tersebut dianggap memiliki distribusi normal jika nilai signifikansi lebih besar dari 0,05. Selanjutnya, analisis homogenitas digunakan untuk memastikan bahwa varian data dari masing-masing kelompok adalah homogen. Data dianggap homogen jika nilai signifikansi lebih dari 0,05.

Pengujian *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dapat dilakukan jika prasyarat homogenitas dan normalitas telah terpenuhi. Jika nilai signifikansi <0,05, maka kelompok perlakuan berbeda atau H_0 ditolak. Setelah itu, uji LSD (*Least Significant Different*) digunakan untuk analisis *Post-Hoc*. Tujuannya adalah untuk menentukan kelompok perlakuan mana yang menunjukkan perbedaan signifikan.

Hasil interpretasi zona hambat, menurut Ardiansyah (2005) dalam penelitian, dikategorikan berdasarkan kekuatan daya antibakteri (Sudrajat dkk, 2012) sebagai berikut:

Tabel 2. Klasifikasi Zona Hambat

Diameter zona hambat (mm)	Kekuatan daya antibakteri
≤ 5	Lemah
6-10	Sedang
11-20	Kuat
≥ 21	Sangat kuat



Gambar 6. Pelaksanaan Penelitian