

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimen, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat aktivitas ekstrak etanol dari *black garlic* yang beredar di pasaran terhadap bakteri *E. coli*. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap, yaitu tahap menyiapkan bahan, pengujian aktivitas ekstrak etanol *black garlic* terhadap *E. coli*, dan tahap akhir dalam penelitian adalah pengelolaan data, analisis data dan pembuatan kesimpulan.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah 2 produk *black garlic* yang beredar di pasaran. Sedangkan sampelnya adalah ekstrak *black garlic* dari 2 merk produk yang beredar di pasaran yaitu merk A dan B. Sampel diujikan terhadap bakteri *E. coli*.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Waktu penelitian pada bulan Mei 2019 sampai Juni 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Pada penelitian ini terdapat dua variabel, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah beberapa produk *black garlic*

yang digunakan sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dan zona bening yang terbentuk disekitar sumuran pada media.

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel penelitian	Definisi Operasional	Hasil ukur	Alat Ukur	Skala Ukur
Ekstrak <i>Black garlic</i> yang beredar di pasaran	Hasil ekstrak <i>black garlic</i> yang diperoleh melalui metode ekstraksi maserasi	Ekstrak etanol <i>black garlic</i> 100%	Timbangan	Nominal
Aktivitas Antibakteri	Kemampuan suatu senyawa dapat memberikan efek bagi mikroorganisme	Diameter zona bening di sekitar sumuran	Jangka sorong	Nominal

3.5 Instrumen Penelitian

Dalam penelitian ini, instrumen yang digunakan meliputi:

1. Alat

Cawan petri, batang pengaduk, jarum ose, erlenmayer, beaker glass, tabung reaksi, bunsen, kasa asbes, kaki tiga, spektrofotometri, *blue tip*, mikro pipet, oven, inkubator, *autoclav*, *vortex*, *Laminar Air Flow (LAF)*, kertas saring, timbangan analitik, botol coklat untuk maerasi, cawan porselin/cawan penguap, mortir dan stamper, penangas air, karet gelang, kertas bungkus coklat, perkamen, sudip, corong kaca, gelas ukur, kapas.

2. Bahan

Bahan-bahan dalam penelitian ini yaitu: *Black garlic* dari 2 merk (merk A dan B), serbuk Mg, HCl(p), pereaksi magner, pereaksi mayer, HCl 2N, FeCl₃ 1%, media EMBA, aguadest, ethanol 70%, spiritus, larutan NaCl 0,9% dan bakteri *Escherichia coli*.

3.6 Prosedur Kerja/Pengumpulan Data.

3.6.1 Pembuatan Ekstrak.

Menurut Waluyo, 2010, maserasi *black garlic* menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10 (1 gram *black garlic* dilarutkan dengan 10 mL etanol 70%). Maserasi dilakukan dalam waktu 3 hari sambil sesekali dikocok (Ansel, 1989). Cara pembuatan ekstrak *black garlic* yaitu:

1. Diambil *black garlic* merk A dan B masing-masing sebanyak 100 gram kemudian diiris tipis-tipis atau dihancurkan dengan cara digerus.
2. Dimasukkan ke dalam botol coklat
3. Dimaserasi dengan 1.000 mL etanol 70% selama 3 hari sambil sesekali dikocok.
4. Disaring kemudian diuapkan dengan alat evaporator dengan suhu 70⁰-80°C.
5. Dikentalkan dengan pemanasan di atas penangas air untuk mendapatkan ekstrak kental.

3.6.2 Skrining Fitokimia Ekstrak *Black garlic*

Skrining fitokimia ekstrak *black garlic* dilakukan untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak *black garlic*. Skrining fitokimia meliputi:

1.6.2.1 Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara:

1. 2 mL ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
2. Ditambah 3-4 biji Mg dan 1 mL larutan HCl pekat.

3. Diamati perubahan warna yang terjadi. Perubahan warna menjadi kuning, orange, merah menunjukkan adanya flavonoid (Depkes RI, 1980).

1.6.2.2 Uji Alkaloid

Uji Alkaloid dilakukan dengan cara:

1. 5 mL ekstrak sampel ditambah dengan HCl 2 N kemudian larutan dibagi dalam 3 tabung reaksi.
2. Larutan dalam tabung pertama ditambah 2-3 tetes pereaksi dragendorff. Diamati perubahan yang terjadi. Apabila terbentuk endapan jingga, menunjukkan adanya alkaloid.
3. Larutan dalam tabung reaksi kedua ditambah dengan 2-3 tetes pereaksi mayer. Diamati perubahan yang terjadi. Apabila terbentuk endapan putih, menunjukkan adanya alkaloid.
4. Larutan dalam tabung reaksi ketiga ditambah dengan 2-3 tetes pereaksi wagner. Diamati perubahan yang terjadi. Apabila terjadi endapan berwarna coklat, menunjukkan adanya alkaloid (Depkes RI, 1980).

1.6.2.3 Uji Saponin

Uji Saponin dilakukan dengan cara:

1. Diambil 2 mL ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 10 mL air panas, dinginkan.
2. Dikocok dengan kuat larutan dalam tabung reaksi selama 10 menit.
3. Diamati perubahan yang terjadi. Apabila terdapat buih setinggi 1-10 cm tidak hilang selama 10 menit menunjukkan adanya saponin.

1.6.2.4 Uji Tanin

Uji Tanin dilakukan dengan cara:

1. Ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah 2 mL aquadest dan 3 tetes larutan FeCl_3 1%.
2. Diamati perubahan yang terjadi. Apabila timbul warna biru kehitaman dan hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Robinson, 1991).

3.6.3 Sterilisasi alat dan bahan.

Alat yang terbuat dari kaca disterilkan dengan sterilisasi kering yaitu dengan menggunakan oven. Alat dicuci bersih lalu dikeringkan dan dibungkus dengan kertas coklat, setelah itu alat disterilkan dengan menggunakan oven dengan suhu 150°C selama 15 menit, alat yang terbuat dari gelas serta bluetip ditutup dengan kapas dan kertas coklat kemudian di sterilkan di autoclav dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Ose yang digunakan untuk menanam bakteri disterilkan dengan cara dibakar sampai memijar (FKUI, 1994).

3.6.4 Pembuatan Media

Media EMBA dilarutkan dengan aquadest dalam erlenmeyer dengan ukuran 37,5 gram dalam 1 liter aquadest dan dipanaskan sampai larut atau sampai mendidih. Setelah agak dingin, sebagian larutan media dipindah ke tabung reaksi untuk membuat media miring. Larutan media dalam tabung reaksi dan erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas coklat kemudian disterilkan dalam *autoclav*.

3.6.5 Peremajaan Bakteri

Diambil biakan bakteri *E. coli* sebanyak satu ose diinokulasi ke dalam medium agar miring secara aseptis di *Laminary Air Flow (LAF)* dengan meletakkan jarum ose yang mengandung bakteri pada dasar kemiringan agar yang sudah beku dan ditarik dengan gerakan zig zag. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Amati pertumbuhan koloni pada media.

3.6.6 Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri dibuat dengan cara mencampur NaCl 0,9% dengan bakteri yang diambil dari biakan pada media miring kemudian diamati nilai transmitannya dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 580nm. Dilakukan pengujian hingga didapatkan nilai transmittan sebesar 25%.

3.6.7 Uji Potensi Antibakteri Dengan Metode Difusi Sumuran

Dimasukan 1 ml suspensi bakteri ke dalam cawan petri, kemudian dituang media agar, goyang dengan arah angka delapan, tunggu sampai memadat. Setelah memadat dibuat diameter sumuran menggunakan alat pelubang dan diisi dengan ekstrak *black garlic*. Kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C. Setelah 24 jam, diamati dan diukur diameter zona hambatnya yang berupa zona bening disekeliling sumuran menggunakan jangka sorong.

3.6.8 Metode Analisa Data

Data yang diperoleh yaitu data apakah terdapat aktivitas antibakteri ekstrak etanol *black garlic* yang beredar di pasaran terhadap bakteri *E. coli* dengan

mengamati zona bening yang terbentuk disekitar lubang sumuran pada cawan petri.