

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat-alat yang digunakan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah *rotary evaporator*, *waterbath*, autoklaf, inkubator, cawan petri, kertas cakram (kertas saring Whatman no.42, d = 6 mm), jarum ose, termometer dan peralatan laboratorium lainnya yang sesuai dengan prosedur kerja.

3.1.2. Bahan-bahan yang digunakan

Bahan penelitian yang digunakan adalah bunga dari berbagai tanaman dahlia, metanol teknis, etanol 95%, etanol absolut, kloroform beraroma, CHCl_3 , FeCl_3 , HCl pekat, logam Mg, pereaksi *Liebermand-Burchard*, *dragendorf*, *mayer*, *nutrien agar*, *nutrien broth*, alkohol 70 %, aquadest.

3.1.3. Bakteri yang digunakan

Bakteri yang digunakan adalah : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus subtilis*, bakteri yang digunakan diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi ITB.

3.2. Rancangan Penelitian

3.2.1. Penanganan sampel

Sampel yang akan digunakan adalah bunga dahlia yang diambil dari beberapa lokasi yaitu: Bukit Tinggi ($D_x\text{BK}$) , Bandung ($D_x\text{BG}$), Malang ($D_x\text{M}$), dan Berastagi ($D_x\text{BT}$). Bunga terlebih dahulu dikering anginkan dan dijaga agar tidak terkena sinar matahari secara langsung, sampai beratnya konstan. Setelah kering sampel digunting kecil-kecil (sampai halus) dan sampel siap untuk diekstraksi.

3.2.2 Uji fitokimia (Harborne, 1987)

Sampel bunga digunting sampai halus, lalu direndam di dalam etanol 95 % kemudian dipanaskan di atas *waterbath* pada suhu rendah sampai didapat ekstrak kental. Ambil sedikit ekstrak kentalnya ke dalam tabung reaksi besar. Tambahkan sedikit air (\pm 5-10 ml) dan kloroform (\pm 5-10 ml) ke dalam ekstrak kental kemudian dikocok, maka akan terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan air diatas dan lapisan kloroform dibawah.

Dipipet \pm 2 ml dari lapisan air ke dalam 3 tabung reaksi, tabung pertama jika ditambahkan FeCl_3 terbentuk endapan hijau menunjukkan adanya senyawa fenolik, tabung kedua jika dikocok menghasilkan busa yang stabil selama \pm 5 menit menunjukkan adanya senyawa saponin, dan pada tabung ketiga jika ditambahkan logam Mg dan HCl pekat timbul warna merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid terkandung dalam sampel.

Dipipet beberapa tetes dari lapisan kloroform, teteskan pada plat tetes kemudian biarkan beberapa menit sampai kloroformnya habis menguap. Setelah kering tambahkan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (pereaksi *Lieberman-Burchard*) jika terbentuk cincin coklat menunjukkan hasil positif terhadap uji terpenoid tetapi jika yang terbentuk adalah cincin hijau menunjukkan hasil positif terhadap uji steroid.

Uji alkaloid untuk sampel tersebut sebagai berikut; 4 gram sampel digerus dan ditambah CHCl_3 dan 10 ml CHCl_3 beramonia kemudian disaring, filtrat ini ditambah dengan H_2SO_4 2N, dikocok, lapisan asam diuji dengan pereaksi Mayer (bila ada alkaloid akan terbentuk endapan putih) dan Dragendorff (bila ada alkaloid akan terbentuk endapan coklat kemerahan).

3.2.3. Ekstraksi

Sampel yang telah dikeringanginkan, digunting kecil-kecil, lalu direndam dalam pelarut metanol dan dipanaskan di atas *waterbath* pada suhu rendah sampai mendidih, saring dan ambil filtratnya. Kemudian pelarutnya diuapkan lagi dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kentalnya (Lenny, 2006).

3.2.4. Uji aktivitas antibakteri

3.2.4.1. Peremajaan bakteri

Peremajaan bakteri bertujuan untuk mengaktifkan kembali bakteri dari agar miring ke dalam larutan *nutrient broth* (Difco laboratory). Media *nutrient broth* yang disiapkan menurut prosedur kemasan, dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 9 ml, dan ditutup dengan kapas yang telah disterilkan dengan menggunakan autoklaf. Dengan menggunakan jarum ose yang telah disterilkan goreskan pada agar miring yang berisi biakan bakteri. Selanjutnya dicelupkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media *nutrient broth*. Tabung ditutup dengan kapas, kemudian divortex, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 35^o-37^oC selama ± 24 jam. Semua langkah pengerjaan dikerjakan secara aseptik.

3.2.4.2. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi (Harborne, 1991)

Satu ml biakan bakteri yang diremajakan dalam larutan *nutient broth* dipipet ke dalam cawan petri. Kira-kira 15 ml *nutrient agar* yang dipersiapkan pada suhu 50^oC, dimasukkan ke dalam cawan petri. Media *nutrient agar* dibiarkan memadat, di atasnya diletakkan kertas cakram yang telah dicelupkan ke dalam ekstrak yang telah dilarutkan dengan etanol absolut dengan konsentrasi 10% (b/v). Inkubasi pada suhu 37^oC dengan membalikkan cawan petri. Diameter daerah hambatan terhadap pertumbuhan bakteri diukur pada waktu 24 jam. Uji ini dilakukan secara aseptik.