

BAB III METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro Semarang. Penelitian ini dibagi dalam dua tahap yaitu sintesis MRP dan uji aktivitas MRP terhadap pertumbuhan *Salmonella typhimurium*.

3.1. Parameter penelitian

3.1.1 Parameter konstan

Parameter yang dibuat konstan adalah konsentrasi MRP yang diuji terhadap pertumbuhan *Salmonella typhimurium*.

3.1.2 Parameter bebas

Parameter bebas dalam penelitian ini adalah lebar zona hambatan (mm) yang akibat penambahan MRP terhadap pertumbuhan *Salmonella typhimurium* dan *E.coli* dari masing-masing perlakuan pada seliap cawan petri.

3.2 Peralatan dan Bahan-bahan

3.2.1 Peralatan yang digunakan

Alat-alat yang digunakan meliputi seperangkat alat-alat gelas, set refluks, neraca analitik, Vacuum Rotavapor RE 111 (BUCHI), pengering vakum, Jarum ose, Autoklav medikal, Shaker, pH meter, spreader, inkubator, termometer 100 °C, pipet mikro 50 µL (Nichriyo).

3.2.2 Bahan-bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan adalah glisin p.a, glukosa p.a, buffer fosfat pH 7, pepton (Conda), yeast (Conda), bakto agar (Conda), NaCl (Merck), beef ekstrak (Conda). Akuades, Spirtus (Brataco), Etanol 95% (Brataco). Ampicillin, sampel bakteri *Salmonella typhimurium* dari balai POM Semarang. Sampel bakteri *E.coli* dari Lab. Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Sintesis MRP

Pembuatan MRP mengikuti metode Aminin (2003), yaitu dilakukan dengan mencampurkan 1 mol glisin dan 1 mol glukosa yang dilarutkan dalam 250 mL aquades dengan pH 7,0. Larutan ditempatkan dalam labu bulat yang dihubungkan dengan kondensor dan direfluks pada 100 °C disertai dengan pengadukan, selama 5 jam. Larutan MRP hasil refluks dikeringkan dengan menggunakan pengering vakum pada tekanan 61 cmHg. Kemudian dimasukkan ke dalam desikator vakum. MRP padatan yang diperoleh ditimbang kemudian dilarutkan dalam akuades. Variasi konsentrasi MRP yang dibuat 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 mg/mL.

3.3.2 Uji Antibakteri

1). Preparasi Media *Nutrient Agar* (NA)

Media NA (*Nutrient Agar*) dibuat dari resep yeast 0,2 g, pepton 0,5 g, NaCl 0,5 g, Agar 1,5 g, beef ekstrak 0,1 g yang dicampur dalam 100 mL akuades, pH larutan 7 ± 2 (Atlas, 1990).

Larutan media NA tersebut kemudian disterilisasi. Kemudian dituangkan ke dalam cawan petri yang telah disterilisasi, dan dibiarkan hingga memadat. Proses penuangan media dilakukan secara aseptik untuk menjaga kondisi ruang steril. Media NA padat diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam untuk menguji sterilitas media.

2). **Preparasi Media *Nutrient Broth* (NB)**

Media NB (*Nutrient Broth*) dibuat dari resep yeast 0,2 g; pepton 0,5 g; NaCl 0,5 g; beef ekstrak 0,1 g yang dicampur dalam 100 mL akuades, pH larutan 7 ± 2 . (Atlas, 1990). Larutan media NB tersebut kemudian disterilisasi, lalu didinginkan.

3). **Inokulasi Bakteri**

Biakan bakteri *Salmonella typhimurium* ditanam pada NA padat pada kondisi steril dalam cawan petri dan diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Satu ose dari biakan tersebut diinokulasikan ke dalam medium NB kemudian diinkubasi pada suhu kamar dengan pengocokan selama 24 jam.

4). **Pengujian Antibakteri**

Pengujian antibakteri secara *in vitro* (di luar sel) dilakukan terhadap pertumbuhan *Salmonella typhimurium* dan sebagai pembanding digunakan *E. coli* menggunakan metode cakram kertas dengan diameter cakram 5,5 mm secara tetes. Seratus mikroliter suspensi bakteri diinokulasikan pada media NA yang telah disterilisasi dan memadat. Kemudian diratakan sampai kering. Cakram kertas berdiameter 5,5 mm

dilewatkan diatas lampu spirtus dan diletakan pada permukaan media NA yang telah diinokulasi suspensi bakteri. Sepuluh mikroliter MRP menggunakan mikropipet diteteskan pada permukaan cakram kertas. Pada setiap cawan petri diletakan 4 cakram kertas dengan konsentrasi MRP yang berbeda. Variasi konsentrasi MRP yang digunakan untuk pengujian 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 mg/mL. Sebagai perbandingan luas zona inhibisi yang dihasilkan dari MRP, digunakan antibiotik Ampicillin konsentrasi 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 2; 3; 4 mg/mL. Setelah itu diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 18-24 jam (Pelczar dan Chan, 1988).

