

C3 = konsentrasi 40%

C4 = konsentrasi 60%

C5 = konsentrasi 80%

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Preparasi Sampel

Sampel rimpang bangle dibersihkan dan dikeringkan dengan menggunakan cahaya matahari. Sampel kemudian ditimbang sebanyak 200 gram dan dihaluskan lalu disaring menggunakan saringan berukuran 40 mesh.

3.4.2 Ekstraksi rimpang Bangle

Metode ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah metode maserasi dengan pelarut etil asetat. Simplisia rimpang bangle dimaserasi selama 3x24 jam dengan penggantian pelarut setiap 24 jam. Hasil maserasi disaring menggunakan corong *Buchner*, kemudian ekstrak dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* untuk memperoleh ekstrak pekat etil asetat rimpang bangle.

3.4.5 Pembuatan Suspensi

Pembuatan suspensi dengan mengambil koloni murni bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang sudah dikultur murni pada media NA. Masing-masing satu ose bakteri biakan disuspensi didalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml aquades dengan tingkat kekeruhan 10°CFU.

3.4.6 Uji Antibakteri

Hasil Ekstrak rimpang bangle dibuat dengan konsentrasi 0%, 20%, 40%, 60% dan 80% dengan pengenceran digunakan DMSO. Suspensi biakan dalam tabung inokulum diambil menggunakan kapas lidi steril. Kapas lidi kemudian dioleskan secara merata pada

permukaan media *Multi Hilton Agar* (MHA). Selanjutnya *blank disc* dimasukkan kedalam masing-masing konsentrasi ekstrak rimpang bangle kemudian langsung diletakkan diatas permukaan media MHA sesuai dengan konsentrasinya. Media lalu diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu ruang.

3.4.7 Pengukuran Diameter Zona Hambat

Pengukuran diameter zona hambat ekstrak terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yaitu dengan melihat zona jernih pada diameter *disc* masing-masing konsentrasi. Jika terbentuk zona jernih disekitar *disc*, maka mengindikasikan bahwa ekstrak rimpang bangle dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Diameter zona hambat diukur dengan menggunakan jangka sorong (Metode *Kirby-baurier of Susceptibility Test*).

3.4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian adalah diameter zona jernih masing-masing konsentrasi ekstrak etilasetat rimpang bangle terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Data akan di analisis secara statistik menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari lima perlakuan dan lima ulangan, Hasil data dianalisis dengan menggunakan sidik ragam atau ANOVA untuk mengetahui signifikansi pengaruh ekstrak terhadap bakteri yang di uji. Hasil ANOVA dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%. DMRT digunakan untuk mengetahui konsentrasi yang terbaik dari uji ekstrak terhadap bakteri.

H0 diterima apabila tidak ada perbedaan signifikan antar perlakuan, sedangkan apabila terdapat perbedaan yang signifikan maka H1 di terima H0 ditolak.

