

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah beras hitam yang diperoleh dari Trenggalek, Jawa Timur.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini beras hitam dari Trenggalek yang dipilih secara acak dengan kondisi masih baik.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol beras hitam yang diperoleh dari hasil remaserasi dengan pelarut etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variable utama pada penelitian memuat identifikasi dari semua yang diteliti langsung. Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

**2.1 Variabel bebas.** Variable bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari beras hitam dengan berbagai konsentrasi.

**2.2 Variabel tergantung.** Variabel tergantung merupakan variabel akibat dari variabel utama. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari beras hitam.

**2.3 Variabel terkendali.** Variable terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kemurnian isolat bakteri, media tumbuh

bakteri, tempat tumbuh tanaman, metode ekstraksi, waktu panen, kondisi laboratorium meliputi kondisi inkas, sterilitas alat dan bahan.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, beras hitam adalah beras hitam yang masih baik dan tidak rusak yang diperoleh dari Malang, Jawa Timur.

Kedua, serbuk beras hitam adalah beras hitam yang sudah dikeringkan dan dibuat serbuk menggunakan ayakan no 60.

Ketiga, ekstrak beras hitam adalah ekstrak kental yang dihasilkan dari metode ekstraksi berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia berupa remaserasi dengan 10 bagian pelarut etanol selama 2 hari, kemudian hari ke-3 dengan 5 bagian pelarut etanol.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah residu yang tertinggal saat penguapan pelarut *n*-heksana yang didapat dengan melarutkan ekstrak beras hitam menggunakan pelarut *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat adalah residu yang tertinggal saat penguapan pelarut etil asetat yang didapat dengan fraksinasi ekstrak beras hitam menggunakan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah residu yang tertinggal saat penguapan pelarut air yang didapat dengan fraksinasi ekstrak beras hitam menggunakan pelarut air.

Ketujuh, bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi untuk menentukan zona hambat bakteri, metode dilusi untuk menentukan nilai KHM dan KBM dari berbagai konsentrasi yang telah dibuat.

## **C. Bahan dan Alat**

### **1. Bahan.**

**1.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah beras hitam yang diperoleh dari Malang, Jawa Timur.

**1.2 Bahan kimia.** Pelarut yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol beras hitam adalah etanol, medium *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mueller-Hinton Agar* (MHA) larutan kristal violet (Gram A), lugol iodine (Gram B), etanol 70% - aseton (1:1) (Gram C), safranin (Gram D), minyak imersi, asam sitrat, larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, kalium telurit 1%, Mc Farland 0.5. reagen kimia meliputi: etanol, *n*-heksana, aquades steril, FeCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, CH<sub>3</sub>COOH, larutan mayer, sebuk magnesium, DMSO 7%.

**1.3 Bakteri uji.** Bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.

## 2. Alat

Alat untuk membuat simplisia seperti mesin penggiling, ayakan no 60 dan blender. Alat untuk ekstraksi dan fraksinasi antara lain, rotary evaporator, oven gelas ukur, corong kaca, gelas beker, kain flanel, dan botol berwarna gelap, neraca analitik, dan alat-alat gelas. Alat untuk pengujian terdiri dari, mikroskop, object glass, erlenmeyer, lampu spiritus, tabung reaksi, batang pengaduk, rak tabung, gelas ukur, pipet mikro, inkas, jarum ose, pinset, *sterling-bidwell*, plat KLT, detector UV 254 dan UV 366, autoklav, cawan petri, inkubator, cawan penguap.

## 3. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan suatu tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah kering, penggunaan sinar gelombang pendek seperti sinar-X, sinar  $\alpha$ , sinar gamma dan sinar UV. Sterilisasi secara kimia yaitu dengan penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu dengan menggunakan saringan atau filter untuk bahan yang akan mengalami perubahan atau penguraian akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi. Bahan atau pelarut yang digunakan dalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan mengganggu atau merusak media atau mengganggu kehidupan dalam proses yang sedang dikerjakan (Suriawiria 2008).

Media yang digunakan dalam proses sterilisasi terlebih dahulu dimasukkan kedalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan cara dimasukkan kedalam oven pada suhu 170°C-180°C selama 2 jam, alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan menggunakan pemanasan api langsung. Sterilisasi inkas menggunakan formalin. Lama waktu sterilisasi yang dibutuhkan bahan dipengaruhi oleh retensi mikroorganismenya, dan enzim terhadap panas, kondisi pemanasan, pH bahan, ukuran wadah atau kemasan yang disterilkan serta keadaan fisik bahan.

#### **D. Jalannya Penelitian**

##### **1. Identifikasi beras hitam**

Identifikasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil agar menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Dalam penelitian ini menggunakan sampel beras hitam yang akan dilakukan determinasi di laboratorium biologi Universitas Sebelas Maret, Jawa Tengah.

**1.1. Pengambilan sampel.** Pengambilan sampel beras hitam dilakukan pada beras hitam yang segar dari daerah Trenggalek, Jawa Timur. Beras hitam kemudian dibersihkan untuk membersihkan dari kotoran dan debu yang menempel pada beras.

**1.2. Pembuatan serbuk beras hitam.** Beras hitam digiling untuk dipisahkan dari kulitnya. Beras hitam pecah kulit kemudian dibersihkan dari kotoran atau bahan asing yang menempel, kemudian dikeringkan selama satu hari. Beras yang sudah kering digiling dan diblender dengan ukuran yang dikehendaki dan dikeringkan dengan suhu 30°C sampai 45°C (Depkes 1985). Pengeringan bertujuan mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu lama. Hasil pembuatan serbuk beras hitam kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 60, dihitung persentase bobot kering terhadap bobot basah (Depkes 2011).

## 2. Pembuatan ekstrak etanol beras hitam

Ekstraksi serbuk beras hitam dilakukan dengan metode remaserasi, serbuk beras hitam sebanyak 800 g dimasukkan dalam botol coklat dengan menambahkan 8000 ml pelarut etanol. Proses perendaman dilakukan selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam dan terlindung dari cahaya. Setelah 18 jam maserat disaring dengan kain flanel. Ampas dilakukan maserasi kembali dengan cara yang sama yaitu ditambah 4000 ml pelarut etanol. Semua maserat dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental. Menghitung rendemen yang diperoleh dihitung persentase bobot (b/b) antara rendemen dan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan (Depkes 2000).

Penetapan persen rendemen diperoleh dengan menimbang hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk beras hitam kering dan dikalikan 100%

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat serbuk beras hitam}} \times 100\%$$

## 3. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak beras hitam

Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak beras hitam menggunakan metode destilasi. Sebanyak 20 g serbuk beras hitam dan 10 g ekstrak beras hitam masing-masing ditimbang dimasukkan labu, kemudian ditambahkan toluene yang sudah dijenuhkan. Setelah itu labu didihkan sampai didapatkan tetesan air dalam tabung yang memisah sempurna dengan pelarut toluene (Depkes 2000)..

## 4. Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak beras hitam

Penetapan susut pengeringan dengan menimbang 2 g serbuk atau ekstrak beras hitam lalu dimasukan dalam *moisture balance*. Kemudian dilakukan pemanasan pada suhu 105°C hingga diperoleh bobot konstan (Depkes 2000).

## 5. Penetapan bobot jenis ekstrak beras hitam

Penetapan bobot jenis ekstrak etanol beras hitam menggunakan konsentrasi ekstrak 5% kemudian dituang ke dalam piknometer kering dan sudah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air. Bobot jenis ekstrak cair didapatkan dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air dalam piknometer dalam suhu ruang (Depkes 2000).

## 6. Identifikasi senyawa kimia ekstrak beras hitam.

Identifikasi senyawa kimia seperti flavonoid, tanin, alkaloid dan saponin dengan menggunakan beberapa pereaksi kimia khusus sehingga akan menghasilkan perubahan warna sesuai ciri khas masing-masing senyawa.

**6.1 Flavonoid.** Sejumlah tertentu ekstrak ditambahkan dengan 100 ml air panas kemudian dididihkan selama 5 menit, disaring dan diambil filtratnya 5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan serbuk magnesium secukupnya, 1 ml asam klorida dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan positif flavonoid (Sarker *et al.* 2006).

**6.2 Tanin.** Untuk pengujian tanin sebanyak 0,5 g ekstrak disari dengan 10 ml air suling, disaring lalu filtratnya diencerkan dengan air suling sampai tidak berwarna. Diambil 2 ml larutan lalu ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Apabila timbul warna biru atau kehitaman kerarti menunjukkan positif (+) adanya tanin. Akan tetapi apabila warna biru atau kehitaman tidak muncul, maka sampel menunjukkan hasil negatif (-) untuk senyawa tanin (Depkes 1995).

**6.3 Alkaloid.** Sebanyak 0,5 g ekstrak ditimbang kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan diambil 3 tetes filtrat lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, diambil 3 tetes filtrat lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat, diambil 3 tetes filtrat lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff. Apabila terjadi endapan paling sedikit dua dari tiga percobaan di atas, maka positif (+) mengandung senyawa alkaloid, akan tetapi apabila endapan tersebut tidak muncul, maka sampel menunjukkan hasil negatif untuk senyawa alkaloid (Depkes 1995).

**6.4 Saponin.** Sebanyak 0,05 g ekstrak ditambah air kemudian dididihkan selama beberapa menit. Larutan disaring dan filratnya dikocok kuat-kuat. Timbulnya buih yang stabil selama 10 menit setelah pengocokan menunjukkan terdapatnya saponin (Depkes 1995).

**6.5 Triterpenoid dan steroid.** Sebanyak 0,05 g ekstrak ditambah asam asetat glasial dan HCL pekat. Kemudian diaduk dan didiamkan beberapa menit. Hasil positif steroid ditandai cincin warna hijau, sedangkan pada triterpenoid ditandai oleh terbentuknya cincin berwarna biru (Nugrahani *et al* 2016).

## **7. Fraksinasi ekstrak beras hitam**

Ditimbang ekstrak etanol beras hitam 10 g disuspensikan dengan aquades sebanyak 100 ml kemudian dipartisi dengan corong pisah dengan *n*-heksana sebanyak 100 ml dengan replikasi 3 kali. Hasil fraksi *n*-heksana dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C. Residu dari fraksi air kemudian dipartisi dengan etil asetat 75ml dengan replikasi 3 kali. Hasil fraksi etil asetat dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C. Residu dari fraksi etil asetat dipekatkan dengan waterbath pada suhu  $\pm 50^{\circ}\text{C}$  dan ditimbang untuk dinyatakan sebagai fraksi air.

## **8. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus***

Sebanyak 10 ml tabung reaksi yang mengandung media cair (BHI), ditambahkan isolat bakteri dengan mengambil beberapa ose. Kemudian divortex untuk menghomogenkan larutan tersebut dan diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan membandingkan turbiditas suspensi bakteri pada media BHI dengan standar Mc Farland 0,5. Sebelum menggunakan larutan standar Mc Farland terlebih dahulu harus dikocok atau divortex untuk memastikan bahwa barium sulfat ( $\text{BaCl}_2$ ) tercampur di seluruh larutan. Standar yang paling umum digunakan di laboratorium mikrobiologi klinik adalah Standard McFarland 0.5, yang digunakan untuk pengujian kerentanan antimikroba dan pengujian kinerja media kultur (Whitman & MacNair 2004).

Keuntungan dari penggunaan standar Mc Farland adalah tidak dibutuhkannya waktu inkubasi yang cukup untuk memperoleh jumlah kepadatan bakteri yang diinginkan. Sedangkan kerugiannya, akan terjadi perbedaan

pandangan setiap individu untuk menilai tingkat kekeruhan dari sel bakteri, sehingga ketepatan jumlah bakteri pada sampel dengan baku Mc Farland belum bisa dipastikan dalam jumlah yang sama (Sutton 2011).

## **9. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus***

Identifikasi untuk mengetahui kebenaran isolat bakteri *Staphylococcus aureus* bisa menggunakan metode pewarnaan dan biokimia. Morfologi *Staphylococcus aureus* pada pengamatan di bawah mikroskop berbentuk kokus atau bulat menggerombol seperti anggur. *Staphylococcus aureus* dapat memfermentasi karbohidrat antara lain: glukosa, dekstrosa, manitol, sukrosa, dan laktosa serta dapat menghasilkan asam tetapi tidak menghasilkan gas. *Staphylococcus aureus* juga menghasilkan enzim koagulase dan enzim katalase yang bersifat hemolitik, mereduksi nitrat menjadi nitrit.

**9.1. Identifikasi pada media selektif.** Inokulasi bakteri *Staphylococcus aureus* ke dalam media VJA yang telah ditetesi kalium telurit 1% sebanyak 3 tetes dalam cawan petri dan diinokulasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif ditandai dengan warna hitam karena *Staphylococcus aureus* mengubah telurit menjadi metalik telurit yang berwarna hitam. Adanya fermentasi mannitol menyebabkan perubahan phenol red pada agar yang berubah dari merah menjadi berwarna kuning (Jawetz *et al.* 2007). Bakteri yang tumbuh pada media VJA kemudian diambil dan dilakukan perbanyakan melalui media BHI.

**9.2. Identifikasi biokimia.** Identifikasi secara biokimia dibagi menjadi 2 metode uji, yaitu uji katalase dan koagulase. Uji katalase menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada inokulasi bakteri pada media agar. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya gelembung udara. Uji koagulase dapat menggunakan plasma darah hewan atau manusia dengan diberi asam sitrat encer 1:5 ditambah 1 ose isolat bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C. Hasil positif ditunjukkan gumpalan plasma melekat pada dinding tabung (Jawetz *et al.* 2007).

**9.3. Pewarnaan Gram.** Pewarnaan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan mengambil beberapa ose isolat bakteri. Isolat diratakan di atas kaca preparat dan dipijar hingga kering. Larutan kristal violet (Gram A) ditetaskan sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Preparat dibersihkan dengan

dialirkan air mengalir lalu dikeringkan. Larutan lugol iodine (Gram B) diteteskan dan dibiarkan selama 1 menit. Lalu dicuci dengan air mengalir. Larutan alkohol (Gram C) diteteskan selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir. Larutan safranin (Gram D) diteteskan selama 20 detik dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* positif sebagai Gram positif apabila berwarna ungu, berbetuk bulat dan koloni bergerombol.

#### **10. Pengujian antibakteri beras hitam secara difusi**

Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari beras hitam yang diperoleh diuji secara mikrobiologi dengan bakteri *Staphylococcus aureus*. Pengujian antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi. Metode uji yang digunakan yaitu metode difusi cakram dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat dan diinokulasikan ke media MHA dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Pada kertas cakram yang sudah ditambahkan fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, ciprofloksasin sebagai kontrol positif dan DMSO 7% sebagai kontrol negatif kemudian diletakkan diatas media MHA menggunakan pinset.

Konsentrasi ekstrak dan fraksi masing-masing 20%, 15% dan 10% menggunakan pelarut DMSO 7%. Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan dilakukan pengukuran diameter zona hambat sekitar sumuran yang menandakan adanya aktivitas antibakteri. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

#### **11. Pengujian antibakteri beras hitam secara dilusi**

Metode dilusi menggunakan 10 tabung reaksi steril. Larutan stok ekstrak etanol fraksi teraktif dibuat seri konsentrasi pengenceran 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.3125%. Suspensi bakteri pada media BHI yang sudah disetarakan dengan standar Mc Farland dimasukkan 0.5 ml ke dalam masing-masing tabung uji (kecuali tabung pertama) secara aseptis. Tabung pertama (kontrol negatif) ditambahkan DMSO 7%. Tabung kedua ditambahkan 0.5ml larutan stok lalu dikocok, diambil 0.5 ml dimasukkan kedalam tabung ketiga dan

begitu seterusnya sampai tabung terakhir. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam dan diamati kekeruhannya. Nilai KHM yaitu konsentrasi terkecil dari tabung media yang jernih atau yang memebrikan hasil negative. Penentuan konsentrasi KBM dengan cara menginokulasi sediaan dari tabung uji pada media diferensial. Nilai KBM ditunjukan apabila pada media diferensial tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan replikasi 3 kali.

## **12. Identifikasi golongan senyawa pada fraksi teraktif secara Kromatografi Lapis Tipis**

Fraksi teraktif ditotolkan menggunakan pipa kapiler diatas lempeng kromatografi kemudian dielusikan dengan jarak pengembang 5 cm. KLT mula-mula dilakukan dengan cara menjenuhkan fase gerak di dalam bejana atau chamber yang dindingnya telah dilapisi kertas saring sehingga atmosfer di dalam bejana dijenuhi fase gerak. Dan dilakukan elusi sampai fase gerak mencapai batas elusi. Setelah pengembangan, lempeng KLT dikeringkan, dilakukan deteksi bercak di bawah sina UV dan pereaksi lainnya. Bercak yang dideteksi ditentukan harga RF dan penampakan warnanya. Fase diam yang diganakan adalah lempeng silika GF<sub>254</sub> dengan ukuran 10 x 10cm.

**12.1 Identifikasi flavonoid.** Fase gerak yang digunakan klorofom dan eetanol (1:1) dengan pereaksi semprot sitroborat. Hasil positif bila dengan UV 254 nm memberikan peredaman, UV 366 nm berflouresensi biru, kuning, ungu gelap (Harborne 1987).

**12.2 Identifikasi alkaloid.** Fase gerak yang digunakan toluene, etil asetat dan dietilamin (7:2:1). Hasil positif bila dengan pereaksi semprot dagendorf terdapat bercak berwarna jingga sampai merah tua (Harborne 1987).

**12.3 Identifikasi tanin.** Fase gerak yang digunakan *n*-heksana dan etil asetat (3:7) dengan pereaksi semprot FeCl<sub>3</sub> 1%. Hasil positif bila di bawah sinar UV 254 berwarna gelap dan UV 366 berwarna biru hitam (Robinson 1995).

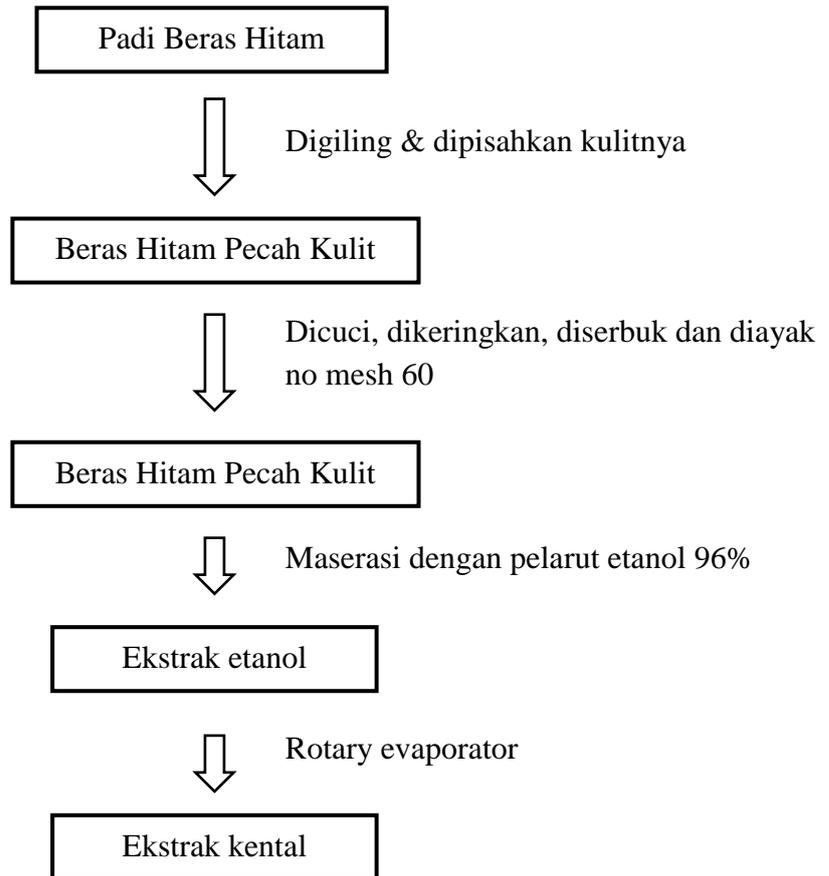
**12.4 Identifikasi triterpenoid dan steroid.** Fase gerak yang digunakan *n*-heksana : etil asetat (7:3) dengan pereaksi semprot anisaldehyd asam sulfat. Hasil positif bila di bawah sinar UV 366 berwarna biru hitam dan berwarna ungu setelah penyemprotan (Risnafiani *et al* 2015).

#### **E. Analisis Data**

Pengujian aktivitas antibakteri beras hitam terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi dinyatakan dengan nilai zona hambat yang terbentuk. Analisis data yang diperoleh menggunakan SPSS untuk melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Data yang terdistribusi normal dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji post hoc untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pada masing-masing perlakuan. Apabila data tidak terdistribusi normal ( $p < 0.05$ ), maka dilakukan metode uji non parametrik.

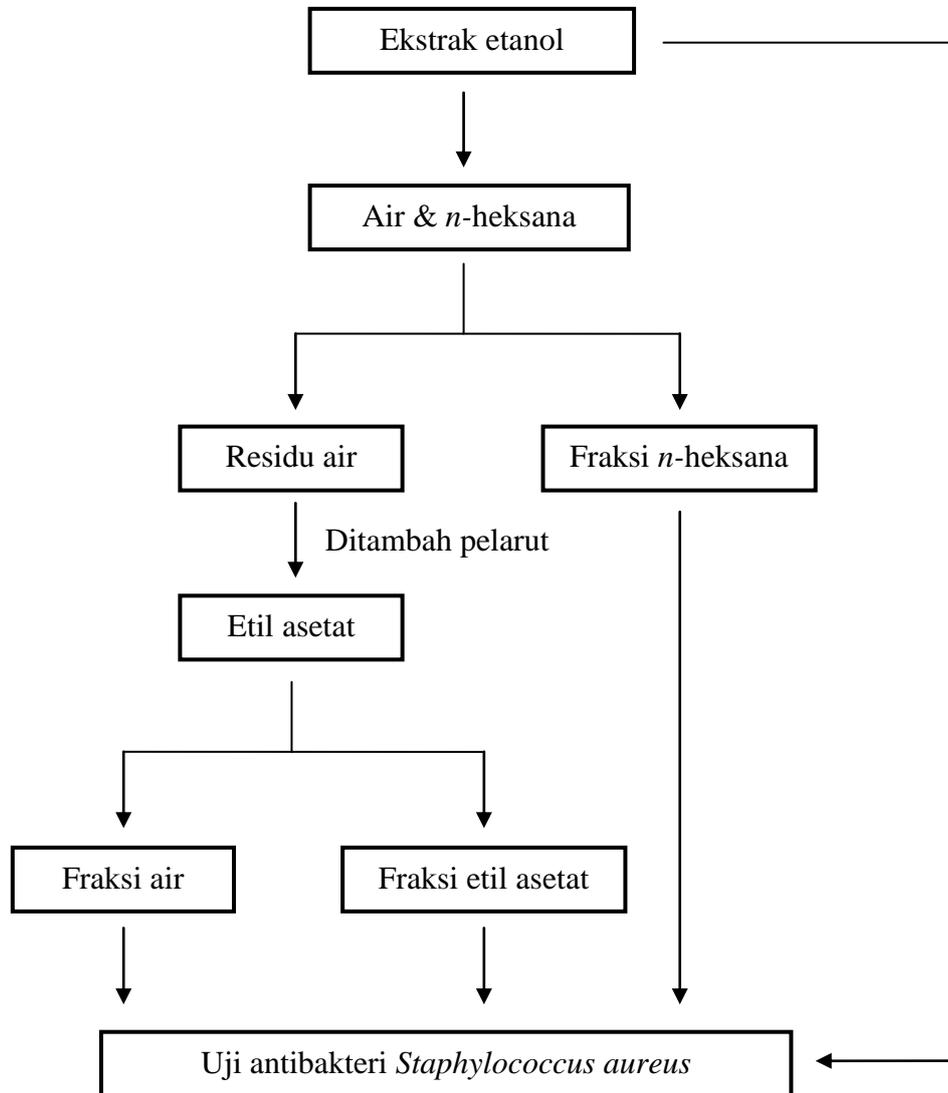
## F. Skema Jalannya Penelitian

### 1. Ekstraksi beras hitam



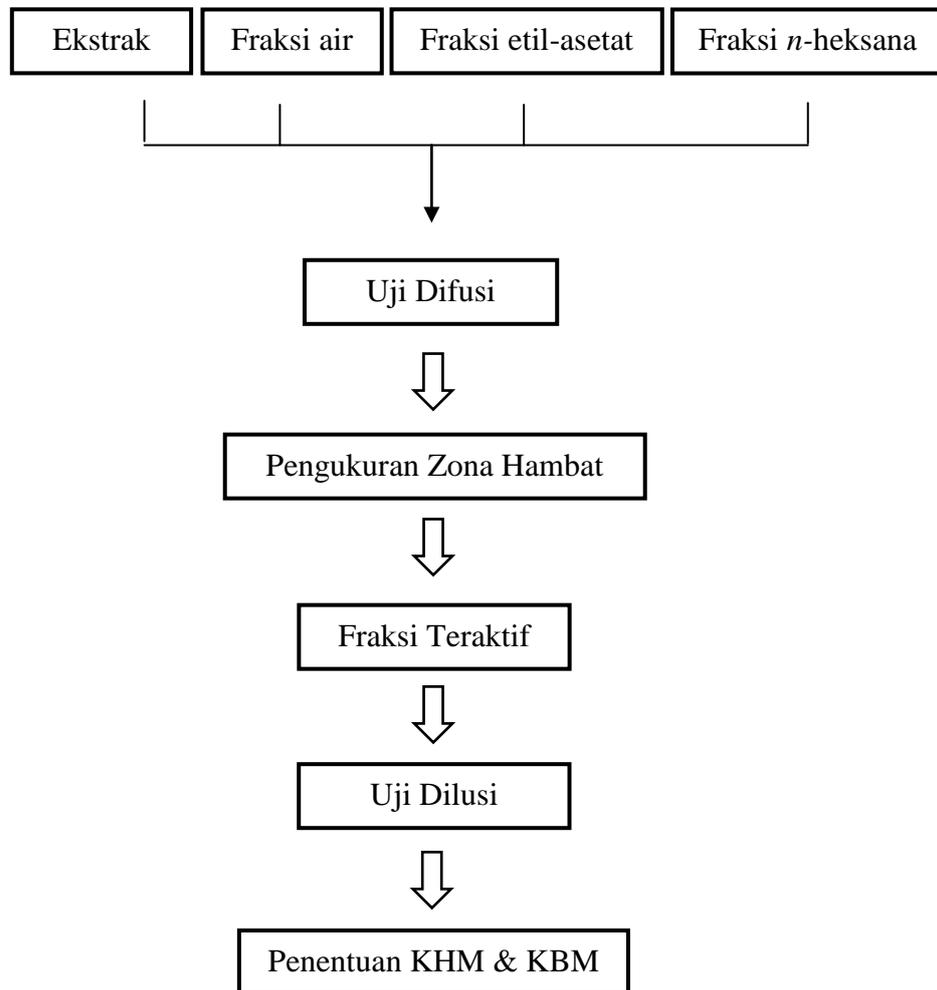
Gambar 2. Ekstraksi beras hitam.

## 2. Fraksinasi ekstrak etanol beras hitam



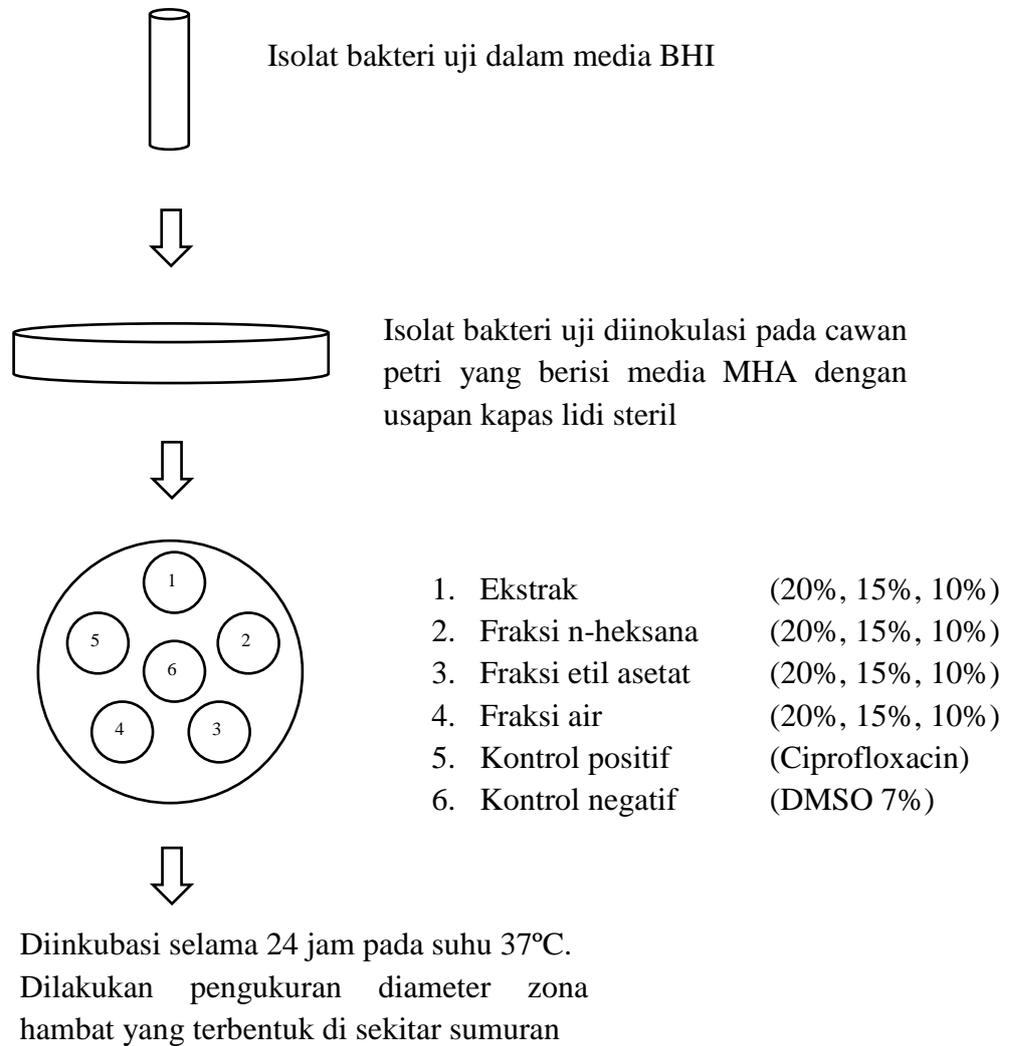
Gambar 3. Fraksinasi ekstrak etanol beras hitam.

### 3. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dan dilusi



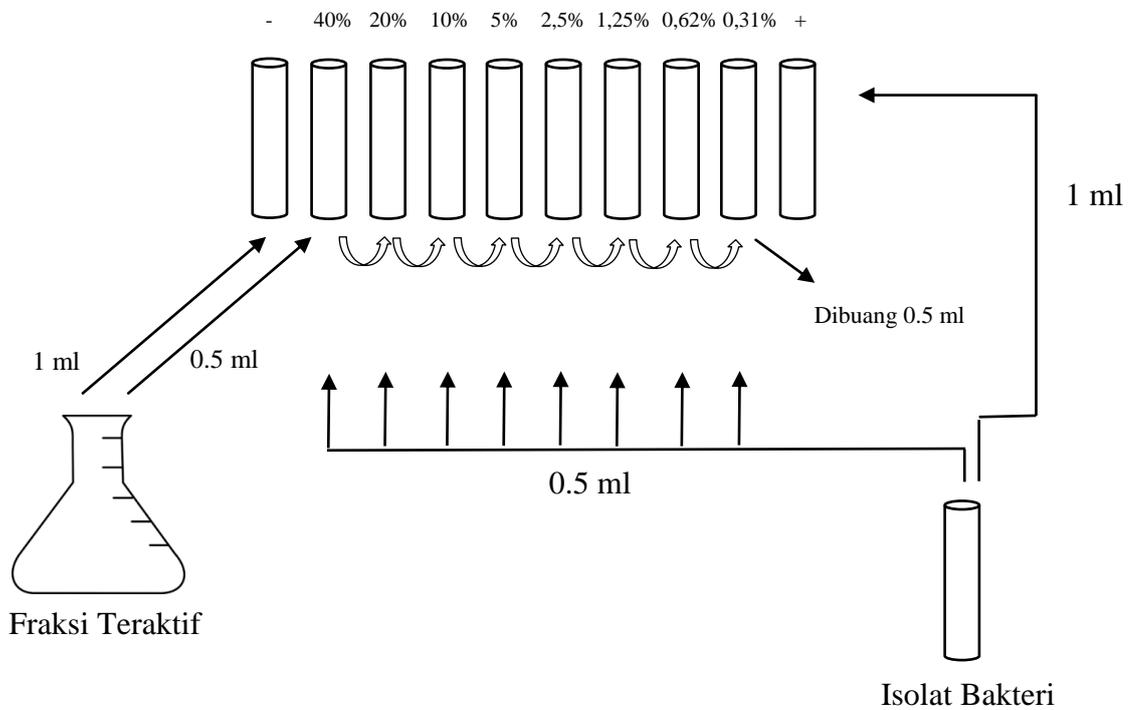
Gambar 4. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dan dilusi.

#### 4. Uji aktivitas antibakteri metode difusi



**Gambar 5. Uji aktivitas antibakteri metode difusi.**

## 5. Uji aktivitas antibakteri metode dilusi



Semua tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk diamati kekeruhannya dan dari tabung yang jernih didapatkan nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum)



Tabung yang jernih, diinokulasikan pada media VJA selama 24 jam pada suhu 37°C. Diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan ditentukan nilai KBM (Konsentrasi Bunuh Maksimum)

**Gambar 6. Uji aktivitas antibakteri metode dilusi.**