

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Pengambilan Sampel

Dilakukan pengambilan sampel Madu Manuka dan Madu Rahmi sebanyak 50 g, dimana masing-masing madu tersebut diambil dari satu wadah yang sama sebanyak satu kali pengambilan.

4.2. Analisis Parameter Standar Madu Manuka dan Madu Rahmi

4.2.1. Organoleptis

a. Bau

Analisis parameter bau dilakukan dengan cara menempatkan madu pada wadah bersih dan kering. Kemudian dicium baunya dengan menggunakan panca indera hidung (BSN, 2013:5).

b. Rasa

Analisis parameter rasa dilakukan dengan mengecap rasa madu menggunakan lidah (BSN, 2013 :5).

c. Warna

Analisis parameter warna dilakukan dengan melihat warna madu menggunakan paca indera mata.

4.2.2. Keasaman

Analisis parameter keasaman dilakukan dengan memasukkan 10 gram madu dalam Erlenmeyer 25 mL kemudian dilarutkan dengan aquades sebanyak 75 mL dan ditambahkan indikator fenolftalein sebanyak 4-5 tetes. Dilakukan titrasi asam-basa dengan menggunakan NaOH 0,1 N hingga larutan berubah warna selama 10 detik.

$$\text{Keasaman (mL N NaOH/kg)} = \frac{a \times b}{c} \times 1000 \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan :

a = volume NaOH yang digunakan titrasi

b = normalitas NaOH (N)

c = bobot madu (g)

(BSN, 2013 :13)

4.2.3. Kadar air dan indeks bias

Dicelupkan sampel madu dalam alat Refraktometer pada suhu 20°C. Setelah didapat angka pada alat, kemudian dibandingkan dengan tabel kadar air yang telah ditentukan SNI sehingga diketahui kadar air dan indeks biasnya (BSN. 2013 :11).

4.3. Penyiapan Media Nutrien Agar

Ditimbang 23 gram nutrien agar (23 gram/L), kemudian dimasukkan dalam Erlenmeyer dan ditambahkan aquades hingga 1 L. Pelarutan dilakukan dengan bantuan plat pemanas dan disterilkan dengan menggunakan autoklaf.

4.4. Penyiapan Biakan dan Pembuatan Suspensi Bakteri

4.4.1. *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasikan pada 5 mL media nutrisi agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah terbentuk koloni bakteri, biakan bakteri dikumpulkan dari permukaan media agar miring dan dimasukkan dalam 10 mL NaCl fisiologis (0,9%) sehingga didapat suspensi bakteri.

4.4.2. *Bacillus subtilis*

Bakteri *Bacillus subtilis* diinokulasikan pada 5 mL media nutrisi agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah terbentuk koloni bakteri, biakan bakteri dikumpulkan dari permukaan media agar miring dan dimasukkan dalam 10 mL NaCl fisiologis (0,9%) sehingga didapat suspensi bakteri.

4.4.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diinokulasikan pada 5 mL media nutrisi agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah terbentuk koloni bakteri, biakan bakteri dikumpulkan dari permukaan media agar miring dan dimasukkan dalam 10 mL NaCl fisiologis (0,9%) kemudian dilakukan pengukuran transmittansi pada panjang gelombang 580 nm sehingga didapat suspensi bakteri dengan transmittansi 25% (Departemen Republik Indonesia, 1995 :897).

4.4.4. *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* diinokulasikan pada 5 mL media nutrisi agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah terbentuk koloni bakteri, biakan bakteri dikumpulkan dari permukaan media agar miring dan dimasukkan dalam 10 mL NaCl fisiologis (0,9%) sehingga didapat suspensi bakteri.

4.5. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Madu Manuka dan Madu Rahmi

Metode yang digunakan untuk Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah metode lempeng silinder dengan menggunakan cakram kertas. Konsentrasi Madu Manuka dan Madu Rahmi yang digunakan adalah 10, 30, 50, 70, 90 dan 100 % b/v. Setiap cawan diisi dengan 0,4 mL suspensi bakteri dan ditambahkan 20 mL Nutrien Agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukkan cakram kertas yang telah direndam dengan konsentrasi madu tertentu. Pre-inkubasi dilakukan selama satu jam dilanjutkan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah masa inkubasi dapat diukur diameter hambat yang dihasilkan madu. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) madu yang diperoleh digunakan pada uji potensi antibakteri dengan antibiotik pembanding.

4.6. Konsentrasi Antibiotik Pemanding

4.6.1. Kloramfenikol

Untuk menentukan konsentrasi kloramfenikol yang akan digunakan, maka terlebih dahulu dilakukan orientasi konsentrasi. Konsentrasi yang diperoleh dari orientasi tersebut selanjutnya digunakan sebagai konsentrasi tengah (S3), kemudian konsentrasi tersebut dinaikan dengan mengalikannya dengan 1,25 sehingga didapat S4 dan S5. Untuk mendapatkan S1 dan S2, maka konsentrasi S3 diturunkan dengan membaginya dengan 1,25.

4.6.2. Tetrasiklin HCl

Untuk menentukan konsentrasi tetrasiklin HCl yang akan digunakan, maka terlebih dahulu dilakukan orientasi konsentrasi. Konsentrasi yang diperoleh dari orientasi tersebut selanjutnya digunakan sebagai konsentrasi tengah (S3), kemudian konsentrasi tersebut dinaikan dengan mengalikannya dengan 1,25 sehingga didapat S4 dan S5. Untuk mendapatkan S1 dan S2, maka konsentrasi S3 diturunkan dengan membaginya dengan 1,25.

4.7. Uji Potensi Antibakteri Madu Manuka dan Madu Rahmi

Pengujian potensi antibakteri Madu Manuka dan Madu Rahmi dilakukan secara aseptis dan dilakukan sebanyak dua kali pengulangan pada setiap bakteri uji.

4.7.1. Madu Manuka dan Antibiotik Kloramfenikol

a. *Staphylococcus aureus*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Manuka sesuai KHM dan antibiotik kloramfenikol pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

b. *Bacillus subtilis*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Bacillus subtilis* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Manuka sesuai KHM dan antibiotik kloramfenikol pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

c. *Pseudomonas aeruginosa*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Manuka sesuai KHM dan kloramfenikol pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama

24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

d. *Escherichia coli*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Escherichia coli* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Manuka sesuai KHM dan antibiotik kloramfenikol pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

4.7.2. Madu Manuka dan Antibiotik Tetrasiklin HCl

a. *Staphylococcus aureus*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Manuka sesuai KHM dan antibiotik tetrasiklin HCl pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

b. *Bacillus subtilis*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Bacillus subtilis* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan

hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Manuka sesuai KHM dan antibiotik tetrasiklin HCl pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

c. *Pseudomonas aeruginosa*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Manuka sesuai KHM dan tetrasiklin HCl pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

d. *Escherichia coli*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Escherichia coli* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Manuka sesuai KHM dan antibiotik tetrasiklin HCl pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

4.7.3. Madu Rahmi dan Antibiotik Kloramfenikol

a. *Staphylococcus aureus*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Rahmi sesuai KHM dan antibiotik kloramfenikol pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

b. *Bacillus subtilis*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Bacillus subtilis* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Rahmi sesuai KHM dan antibiotik kloramfenikol pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

c. *Pseudomonas aeruginosa*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Rahmi sesuai KHM dan antibiotik kloramfenikol pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi

selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

d. *Escherichia coli*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Escherichia coli* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Rahmi sesuai KHM dan antibiotik kloramfenikol pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

4.7.4. Madu Rahmi dan Antibiotik Tetrasiklin HCl

a. *Staphylococcus aureus*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Rahmi sesuai KHM dan antibiotik tetrasiklin HCl pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

b. *Bacillus subtilis*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Bacillus subtilis* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan

hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Rahmi sesuai KHM dan antibiotik tetrasiklin HCl pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

c. *Pseudomonas aeruginosa*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Rahmi sesuai KHM dan antibiotik tetrasiklin HCl pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

d. *Escherichia coli*

Disiapkan lima cawan petri, masing – masing dimasukkan 0,4 mL suspensi bakteri *Escherichia coli* dan ditambahkan 20 mL media nutrien agar biarkan hingga memadat. Kemudian dimasukan 6 buah cakram kertas yang telah direndam konsentrasi Madu Rahmi sesuai KHM dan antibiotik tetrasiklin HCl pada konsentrasi tertentu. Dilakukan pre-inkubasi selama 1 jam, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°-37°C. Setelah masa inkubasi, dapat diukur diameter hambat yang terbentuk.

Dengan dilakukannya uji aktivitas antibakteri ini akan didapat diameter hambat suatu antibakteri yang dapat dilihat dengan adanya zona bening pada media nutrien agar yang telah diinokulasi oleh bakteri pada cawan petri.

4.8. Analisis Data Uji Potensi

Untuk mendapatkan nilai uji potensi, maka diambil data log konsentrasi S3 antibiotik pembanding dan disubstitusikan ke dalam persamaan regresi linear yang didapat dari data diameter hambat. Nilai y yang didapat dari persamaan regresi linear tersebut digunakan untuk menghitung dosis sampel madu dengan rumus;

$$Y_u = \{y + (U - S_{3u})\} \dots\dots\dots (2)$$

U adalah rata-rata diameter zona hambat sampel uji (madu) dan S_{3u} adalah rata-rata diameter zona hambat dosis tengah uji baku pembanding. Dari persamaan tersebut diperoleh nilai Y_u madu, dimana nilai Y_u madu disubstitusikan kembali pada persamaan regresi linear yang didapat, sehingga diperoleh nilai X_u (antilog) madu.