

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi Universitas Buana Perjuangan Karawang, Penelitian dilakukan dari mulai bulan September 2018 sampai dengan Februari 2019.

3.2 Bahan dan Alat yang digunakan

3.2.1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain :

- 1) Bahan pembuatan ekstrak : Etanol 96%
- 2) Bahan yang di uji : Rimpang jahe
- 3) Sampel Bakteri : Bakteri *Staphylococcus aureus* “ATCC6538”, *Bacillus subtilis* “ATCC6633” dan *Pseudomonas aeruginosa* “ATC9027” yang diisolasi pada media agar dan di inkubasi selama 24 jam
- 4) Bahan penelitian : *Nutrient agar* “oxoid”, aquadest steril “Widatra”, DMSO “Merck”, tablet eritromisin, NaCl 0,9% “Otsu”.

3.2.2. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari :

1. Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak yaitu, blender, timbangan analitik, pisau, cawan penguap, botol kaca, aluminium foil, batang pengaduk, spatula, kertas saring (Whatman no.1), corong *buchner*, beaker glass “Pirex”, gelas ukur “Pirex”, *rotary evaporator* “Eyela”, *waterbath* “Memmert”.

2. Alat yang digunakan untuk inokulasi bakteri yaitu, *petri disk*, bunsen, Erlenmeyer “Pirex”, batang pengaduk, kompor listrik, *autoclave* “All American”, oven, pipet tetes, jarum ose, kapas steril, incubator, tabung reaksi, *laminar air flow* “CV Quadrant”, batang sumuran, jangka sorong “Tricle Brand”, mikropipet “Fisherbrand Elite”.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1. Determinasi Tanaman

Dilakukan determinasi tanaman jahe utuh di Laboratorium Sekolah Ilmu Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung untuk diidentifikasi kebenarannya.

3.3.2. Proses Pembuatan Simplisia Rimpang Jahe

Sebanyak 7 kg rimpang jahe segar disortasi basah pada rimpang jahe segar untuk menghilangkan kotoran-kotoran dari bagian yang tidak digunakan, kemudian rimpang dicuci dan ditimbang, kemudian dilakukan proses perajangan untuk mempermudah proses pengeringan dan setelah itu dikeringkan dibawah sinar matahari sampai setengah kering kurang lebih 1 hari, kemudian dilanjutkan dengan cara diangin-angin kurang lebih selama 4 hari. Setelah rimpang kering dilakukan sortasi kembali untuk memisahkan rimpang rimpang yang rusak pada proses pengeringan. Setelah itu disimpan dalam wadah tertutup rapat dan beri silika gel.

3.3.3. Proses Pembuatan Ekstrak Rimpang Jahe Dengan Menggunakan *Refluks*

Ekstraksi dilakukan dengan mencampurkan simplisia rimpang jahe sebanyak 50 g dimasukan kedalam labu alas bulat ditambahkan 250 ml pelarut etanol 96% dan direfluks sampai mendidih setelah mendidih tunggu hingga 2 jam. Ekstrak yang dihasilkan disaring dan

dilakukan pengentalan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan dipekatkan kembali dengan menggunakan *waterbath*.

3.3.4. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui dan mengidentifikasi senyawa kimia yang terkandung dalam simplisia maupun ekstrak jahe, skrining fitokimia yang dilakukan yaitu uji flavonoid, fenol, terpenoid, alkaloid, saponin, steroid dan tanin. Berikut langkah langkah skrining fitokimia.

1. Flavonoid

a) Simplisia

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia ditambahkan NaOH 10%, tunggu beberapa saat, apabila terbentuk warna kuning, oranye atau merah menunjukan adanya flavonoid (Marpaung, 2017).

b) Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 1 ml ditambahkan 3 ml etanol 70% dan dikocok, dipanaskan dalam penangas air kemudian disaring, filtrat kemudian ditambahkan pita Mg sebanyak 0,1 g dan 2 tetes HCl pekat. Uji positif adanya senyawa flavonoid ditandai dengan adanya warna merah (Harbone, 1987 dalam Wardana *et al.*, 2016).

2. Fenol

Satu milligram ekstrak dilarutkan dalam etanol dan ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Hasil positif ditandai dengan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam (Harborne, 1987 dalam Wardana *et al.*, 2016).

3. Alkaloid

Ekstrak jahe sebanyak 1ml ditambahkan 2 ml HCl 2N dan dikocok. Campuran dibagi 2 dalam tabung berbeda, masing-masing tabung ditetesi reagen, tabung satu ditetesi reagen Mayer dan tabung

dua ditetesi Dragendorf. Adanya senyawa alkaloid pada reagen Mayer terbentuk endapan kuning, dan pada penambahan reagen Dragendorf terbentuk endapan merah (Tiwari *et al.*, 2011)

4. Terpenoid

a) Simplisia

Sebanyak 2 ml kloroform ditambahkan dengan 1 ml infusa rimpang jahe lalu ditambahkan dengan 3 ml $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{p})$. Lapisan dipermukaan atau antarmuka berwarna coklat kemerahan menunjukkan adanya terpenoid (Riaz *et al.*, 2015).

b) Ekstrak

Ambil sebanyak 2 ml sampel, kemudian tambahkan 3 tetes HCl pekat 1 tetes H_2SO_4 pekat, jika larutan terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid (Septianingsih, 2013 dalam Ergina, 2014).

5. Saponin

Sebanyak 5 ml infusa rimpang jahe ditambahkan dengan 5ml aquadest, lalu dikocok atau diaduk. Adanya buih menunjukkan adanya saponin (Riaz *et al.*, 2015).

6. Tanin

10 ml ekstrak ditambahkan 3 ml etanol. Lalu dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit kemudian disaring. Untuk mengetahui adanya tanin dilakukan dengan dua pereaksi, yaitu pereaksi FeCl_3 dan gelatin. Ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1 % beberapa tetes dalam filtrat. Adanya tanin ditunjukkan dengan adanya warna hijau kehitaman (Rasyidi *et al.*, 2015 dalam Habibi, 2017).

7. Steroid

2 ml sampel yang telah diekstraksi ditambahkan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Jika terbentuk warna hijau maka positif mengandung steroid (Septrianingsih, 2013 dalam Ergina, 2014).

3.3.5. Proses Pengujian Aktivitas Antimikroba

A. Tahap Persiapan

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Dicuci bersih semua alat yang akan digunakan, lalu keringkan dan bungkus dengan kertas coklat, kemudian lakukan sterilisasi dengan menggunakan *autoclave* selama 15 sampai 30 menit pada suhu 121°C dan untuk alat yang terbuat dari karet disterilkan dengan cara direndam dalam etanol 70%. Simpan alat yang telah di sterilisasi pada *laminar air flow*.

2. Pembuatan Stok Bakteri

Dibuat stok bakteri dilakukan dengan metode goresan, dengan cara menginokulasikan masing-masing 1 ose biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dalam masing- masing tabung reaksi yang berisi media agar miring, kemudian diinkubasi didalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C (Nurhayati, 2011).

3. Pembuatan Media Agar (*Nutrient agar*)

Media agar dibuat dengan melarutkan *Nutrient agar* dengan aquadest didalam erlenmeyer. Kemudian panaskan sampai mendidih dan disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

4. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Dimasukkan 5 ml NaCl 0,9% kedalam masing masing tabung reaksi, ambil bakteri uji yang telah diinokulasikan dengan menggunakan jarum ose steril dan suspensikan dengan kedalam tabung yang berisi NaCl 0,9% hingga memperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan *Mc. Farland* 0,5%.

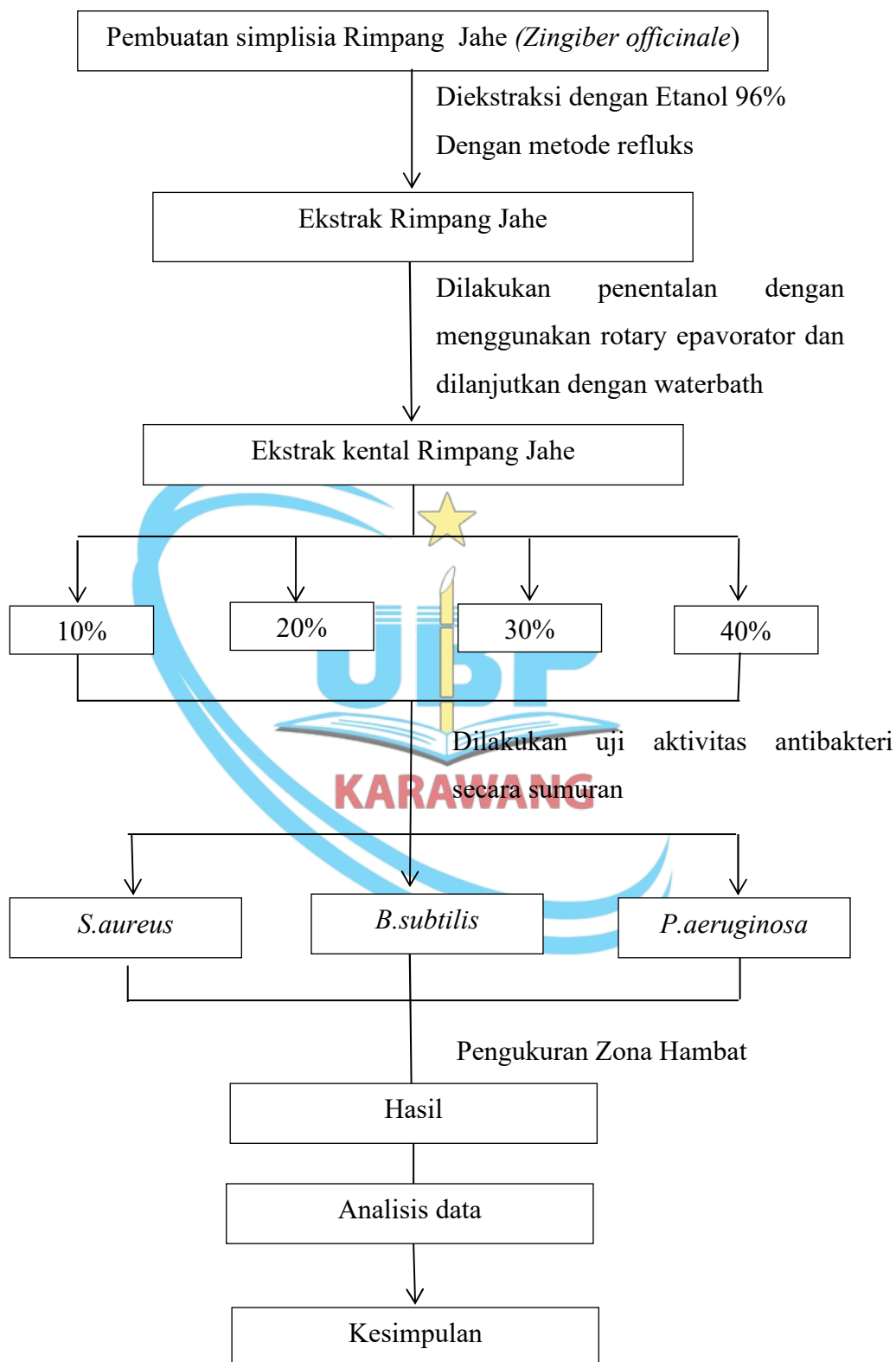
5. Pembuatan Stok Variabel Konsentrasi

Stok ekstrak jahe akan dibuat dalam beberapa konsentrasi 10%, 20%, 30% dan 40%, DMSO sebagai kontrol negatif dan antibiotik eritromisin sebagai kontrol positif. Untuk 10% ditimbang 0,1 g dalam 1 ml DMSO, untuk 20% ditimbang 0,2 g dalam 1 ml DMSO, untuk 30% ditimbang 0,3 g dalam 1 ml DMSO dan untuk 40% ditimbang 0,4 g dalam 1 ml DMSO.

B. Tahap Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Jahe

Dimasukkan suspensi bakteri yang telah dibuat kedalam media agar yang telah memadat. Konsentrasi ekstrak jahe kemudian dimasukkan kedalam masing-masing lubang sumuran, dengan beberapa konsentrasi 10%, 20%, 30% dan 40% di atas permukaan media pertumbuhan yang telah dicampurkan dengan suspensi bakteri dengan menggunakan pinset dilakukan dalam *laminar air flow*. Media agar kemudian di inkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat.

3.4 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3. 1 Diagram alir Penelitian Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Jahe (*Zingiber officinale* Roscoe) Terhadap *S.aureus*, *B.subtilis* dan *P.aeruginosa*