

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Formula Penelitian

Penelitian yang telah dilakukan merupakan eksperimental. Ekstrak etanol dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% . Sampel pada penelitian yaitu jahe gajah yang dikeringkan dan dihaluskan terlebih dahulu agar dapat diekstraksi.

B. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi Prodi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober-Desember 2021

C. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah ekstrak jahe gajah (*Z. officinale* var. *Officinarum*) yang dibuat di laboratorium bahan alam Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta dan bakteri *E.coli* yang didapat dari Laboratorium Biologi Universitas Gadjah Mada

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*independent variable*)

Konsentrasi ekstrak etanol jahe gajah (*Z. officinale* var. *Officinarum*) menggunakan metode difusi cakram untuk mengetahui zona hambat terhadap bakteri *E.coli*.

2. Variabel terikat (*dependent variable*)

Zona hambat pada ekstrak *etanol* Jahe Gajah (*Z. officinale* var. *Officinarum*) merupakan variabel terikat dalam penelitian ini.

3. Variabel terkontrol

- a. Waktu inkubasi selama 24 jam pada suhu inkubasi (37°C)
- b. Lama penyimpanan ekstrak jahe gajah yaitu 5 hari saat maserasi.
- c. Waktu 7 hari untuk pengeringan jahe gajah.
- d. Pelarut etanol 70% *grade* p.a.

E. Definisi Operasional

1. Bakteri *Escherichia coli* yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Universitas Gadjah Mada.
2. Jahe gajah (*Z. var. Officinarum*) yang didapat dari petani langsung yang ada di Sleman, Kecamatan Ngaglik. Yogyakarta.
3. Ekstrak jahe gajah (*Z. officinale* var. *Officinarum*) yang sudah dikeringkan menggunakan sinar matahari, kemudian dimaserasi.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-Vis*), cawan petri, tabung reaksi (*Iwaki Pyrex*), *beaker glass*, bunsen, autoklaf (*Bea*), inkubator (*Memmert*), pipet ukur, jarum ose, batang L, bunsen, pipet tetes, pinset, *vortex (D-lab)*, penggaris, timbangan (*Ohaus*), Erlenmeyer (*Iwaki Pyrex*), pipet mikro, *grinder (Apr)*, labu takar, *hotplate*, *magnetic stirrer*, gelas bejana, wajan, kompor listrik, termometer, batang pengaduk.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Jahe gajah, pelarut etanol 70%, bakteri *E coli*, media *Plate Count Agar (PCA)*, media *Nutrient Agar (NA)* (*Merck*), NaCl 0,9%, akuades, asam sulfat pekat, HCl pekat, larutan heksana,

kertas label, kertas pembungkus, kapas, kasa, tissue, alumunium foil, serbuk magnesium, kain saring, asam asetat glasial, butanol, sulfat 1%, barium klorida 1%, asam anhidrat, *quersetin(Sigma-aldrich)*, kloroform, plat silika gel 60 (*Merck Germany*), *whitetip*, kertas cakram antibiotik, kertas cakram kosong, metanol,

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Sampel Jahe Gajah (*Z. Officinale* var. *Officinarum*)

Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan taksonomi Jahe Gajah (*Z. officinale* var. *Officinarum*) yang digunakan dalam penelitian ini. Determinasi dilakukan di Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.

2. Penyiapan Sampel

a. Pengolahan dan Pembuatan Sampel

Rimpang jahe gajah sebanyak 2 kg dicuci dengan air mengalir. Setelah dicuci, rimpang jahe gajah dipotong tipis-tipis, lalu dikeringkan selama 7 hari hingga kering. Waktu pengeringan ini adalah modifikasi dari penelitian yang dilakukan Tandanu & Rambe, (2020)

b. Ekstraksi Sampel

Jahe gajah yang sudah dikeringkan kemudian dihaluskan dengan alat *Grinder*. Serbuk jahe gajah kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 70%. Ekstrak direndam selama 5 hari dan disimpan dalam ruangan tertutup agar terlindung dari cahaya sinar matahari. Hasil dari ekstraksi yang sudah didapat kemudian dilakukan penyaringan. Residu yang dihasilkan kemudian diremaserasi 1 kali dengan pelarut etanol 70 %. Hasil dari maserasi dan remaserasi kemudian diuapkan menggunakan wajan dengan suhu dibawah 70°C hingga diperoleh ekstrak etanol kental jahe gajah.

c. Kontrol Kualitas Ekstrak

1) Uji organoleptik

Pengujian ini melakukan uji ekstrak terhadap jahe gajah yaitu dicium baunya, diamati warna, teksturnya dan rasa.

2) Identifikasi saponin

Dimasukkan 0,5 gr ekstrak kental jahe gajah dan ditambahkan air panas sebanyak 10 mL ke tabung reaksi. Kemudian didinginkan dahulu lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hingga berbentuk busa 1-10 cm yang bertahan selama 10 menit, kemudian ditambahkan asam klorida 2 N, buih tidak menghilang.

3) Identifikasi triterpenoid dan steroid

Ditimbang ekstrak kental sebanyak 0,5 gr kemudian ditambah 2 mL etanol 70% di dalam cawan porselen yang diuapkan di atas air mendidih. Residu yang sudah diuapkan kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan kloroform dan 2 mL larutan asam asetat anhidrat, kemudian ditetesi asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Setelah itu diamati jika terjadi triterpenoid maka ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan, sedangkan jika terjadi adanya steroid ditandai dengan terbentuknya cincin biru kehijauan.

4) Identifikasi flavonoid

Ditimbang ekstrak kental 500 mg dalam cawan yang dicampur dengan etanol 70% sebanyak 2 mL etanol 70% sambil diaduk hingga tercampur, kemudian ditambahkan serbuk magnesium 0,5 gr dan beri 3 tetes HCl pekat. Jika hasil menunjukan warna kuning kemerahan maka positif mengandung senyawa flavonoid.

5) Identifikasi KLT

Identifikasi KLT pada penelitian ini menggunakan fase gerak hasil modifikasi dari penelitian yang dilakukan Sugiarti dkk., 2017. Fase gerak yang digunakan pada penelitian adalah butanol: asam asetat : air dengan perbandingan 6:2:2. Fase diam yang digunakan adalah plat KLT silika gel 60 diberi garis batas atas dan bawah menggunakan pensil. Ekstrak kental jahe gajah dan larutan standar Kuersetin ditotolkan menggunakan *whitetip* pada plat KLT yang telah diberi tanda batas dan masukkan ke dalam bejana

yang berisi fase gerak, kemudian didiamkan sampai fase gerak mencapai garis tanda batas. Fase gerak yang diperoleh kemudian diamati menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Bercak kemudian dihitung sebagai nilai Rf. Berikut rumus perhitungan Rf.

$$Rf = \frac{\text{Jarak elusi sampel}}{\text{Jarak perambatan fase gerak}}$$

3. Uji Antimikroba

a. Sterilisasi Alat

Pada penelitian aktivitas antibakteri diawali dengan proses sterilisasi yang dilakukan dengan mensterilkan alat gelas menggunakan oven selama 1 jam pada suhu 170°C, sedangkan jarum ose dan pinset sterilisasinya dibakar di atas api bunsen.

b. Sterilisasi Bahan

Bahan yang harus disterilkan antara lain *blue tip*, NaCl 0,9 %, dan media agar. Sterilisasi dilakukan dengan metode sterilisasi basah yaitu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Pembuatan Suspensi Standar *Mc.Farland*

Larutan *Mc Farland* dibuat dengan mencampurkan asam sulfat (H₂SO₄) 1% 9,95 mL dan 0,05 mL barium klorida (BaCl₂) 1%. *Mc Farland* digunakan sebagai standar untuk kepekatan terhadap suspensi sampel bakteri yang akan digunakan (Handrianto, 2016). Standar *Mc Farland* yang akan digunakan adalah *Mc Farland* 0,5 artinya perkiraan jumlah suspensi bakteri 1,5 x 10⁸.

d. Pembuatan Media

Pembuatan media PCA dilakukan dengan cara menimbang media PCA sebanyak 4,05 gr dilarutkan dalam 90 mL akuades, didihkan di atas *hotplate* dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*, kemudian di sterilkan di autoklaf. Media steril tersebut dituang ke masing-masing cawan petri dan diratakan hingga memadat.

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri uji berupa *E coli* yang berasal dari biakan murni, masing-masing diambil 1 ose, kemudian dinokulasi dengan cara digoreskan pada medium dengan metode goresan, selanjutnya diinkubasi menggunakan suhu 37°C selama 24 jam.

Bakteri yang sudah dibiakan, diambil menggunakan jarum ose yang sudah dibakar di atas api bunsen, kemudian disuspensikan menggunakan larutan NaCl 0,9% sebanyak 5 mL, lalu divortex agar bakteri dapat tercampur secara merata. Diamati dan dibandingkan kekeruhan suspensi bakteri dengan standar *Mc Farland* 0,5. Kekeruhan juga dapat dilihat menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis.

f. Pembuatan Larutan Uji

Masing-masing ekstrak ditimbang menggunakan neraca analitik dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Pembuatan Larutan stok 100% dengan menimbang 5 gram ekstrak kental yang dilarutkan dalam 5 mL akuades. Konsentrasi tersebut dimodifikasi dari penelitian yang dilakukan Handrianto, (2016).

g. Uji Aktivitas Antibakteri

Pada penelitian ini dilakukan uji dengan metode difusi cakram. Bakteri uji yang digunakan adalah *E.coli*. Suspensi bakteri diambil 0,1 mL kemudian diinokulasikan ke atas media dan diratakan menggunakan batang L. Kertas cakram secara aseptis direndam dalam larutan sampel sesuai konsentrasi yang digunakan selama 10 menit. Kertas cakram kemudian diletakan di atas permukaan agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona hambat yang terlihat di sekitar kertas cakram diukur diameternya menggunakan jangka sorong dari sisi horizontal, vertikal, dan diagonal. Semakin luas area zona bening yang terlihat maka semakin kuat aktivitas antibakteri.

H. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan teknik pengumpulan data dengan metode eksperimental dan pengamatan. Adapun dalam penelitian ini yang diamati yaitu aktivitas antibakteri ekstrak jahe gajah sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dengan mengukur uji zona hambat. Zona hambat diukur menggunakan penggaris dengan satuan millimeter (mm). Berdasarkan zona hambat dapat digolongkan sebagai berikut :

Tabel 4. Golongan zona hambat

No	Ukuran zona hambat	Golongan
1.	Zona hambat <5 mm	antibakteri tergolong lemah
2	Zona hambat 5-10 mm	antibakteri tergolong sedang
3	Zona hambat 10-20 mm	antibakteri tergolong kuat
4	Apabila zona hambat antar > 20 mm	antibakteri tergolong sangat kuat

Data yang sudah diperoleh dari ekstrak etanol jahe gajah yaitu penetapan organoleptik, skrining fitokimia, dan pemisahan senyawa menggunakan KLT yang dianalisis secara deskriptif dalam bentuk tabel dan foto. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol jahe gajah yang diukur berdasarkan diameter zona hambat pada bakteri *E.coli*. Pengolahan data diameter zona hambat pada perlakuan dan kontrol dianalisis secara statistik menggunakan uji *One-Way* ANOVA.