

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

A. 1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi FMIPA, UNDIP dan Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta.

A.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli s.d. September 1999.

B. Materi dan Alat Penelitian

B.1. Materi Penelitian

Bahan utama yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah rimpang jahe yang sudah cukup tua (kira-kira berumur 6 bulan), biakan murni *E. coli* dan *S. aureus*, pelarut n-heksan, kloroform, etanol, akuades, tween-80, media Nutrien Agar (NA), media Nutrien Broth (NB), cakram kertas.

B.2. Alat Penelitian

Penelitian ini membutuhkan berbagai macam peralatan yang meliputi, pisau, alas pemotong, autoklaf, inkubator, tabung reaksi, cawan petri, gelas piala, evaporator, penumbuk porselen/blender, lampu bunsen, "Laminar Air Flow", jarum inokulasi (ose),

timbangan analitik, mikroskop, cakram kertas/paper disk berdiameter 1 cm, spektrofotometer, perkolator, oven, corong.

C. Cara Kerja

C. 1. Pembuatan Ekstrak Jahe

Rimpang jahe (*Zingiber officinale* Rosc) dicuci bersih dan dipotong kecil-kecil, dikeringanginkan lalu ditumbuk halus, dan disaring dengan ayakan mekanik, sehingga didapatkan ukuran serbuk yang homogen.

Satu kilogram serbuk jahe dimaserasi dalam perkolator dengan pelarut n-heksan selama 3x24 jam pada suhu kamar. Sebelum dimaserasi dengan pelarut N-heksan serbuk jahe dibasahi dengan N-heksan sebanyak 1/40 kali masa serbuk yaitu 25 ml pelarut. Fraksi N-heksan cair yang dihasilkan ditampung dalam erlenmeyer. Maserat kemudian diuapkan dengan menggunakan rotasi evaporator atau rotavapor pada suhu 50°C untuk memisahkan senyawa dari pelarutnya. Fraksi ekstrak murni didapatkan bila tidak tercium lagi uap pelarut N-heksan, sehingga diperoleh fraksi ekstrak N-heksan kental yang merupakan fraksi ekstrak nonpolar.

Residu dari hasil ekstraksi dengan pelarut n-heksan dimaserasi dengan pelarut kloroform selama 3x24 jam pada suhu kamar. Maserat yang dihasilkan ditampung dalam erlenmeyer dan kemudian diuapkan dengan menggunakan rotavapor pada suhu 50°C sehingga diperoleh fraksi ekstrak kloroform kental yang merupakan fraksi ekstrak semipolar.

Dengan cara yang sama, dilakukan pula fraksinasi terhadap residu dari fraksi kloroform dengan menggunakan pelarut etanol, sehingga diperoleh fraksi ekstrak etanol kental yang merupakan fraksi ekstrak polar.

Masing-masing fraksi ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya akan digunakan sebagai bahan uji (Harborne, 1987).

C.2. Pembuatan Stok Kultur Murni

Kultur murni *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* diinokulasikan pada medium NA miring dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Kemudian 1 ose dari biakan diinokulasikan lagi ke dalam medium NB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

C.3. Pembuatan inokulum Bakteri

Suspensi bakteri yang digunakan dalam 'bioassay' antibakteri mempunyai kerapatan $10^7 - 10^8$ bakteri/ml, yang ditentukan dengan spektrofotometer Spectronic-20 pada panjang gelombang 640 nm.

C4. Pembuatan Larutan Ekstrak

Dari masing-masing fraksi ekstrak yang diperoleh ditimbang sesuai dengan konsentrasi yang diujikan 1, 5, 10) % (b/v) (Nursal dkk, 1998), kemudian dilarutkan dengan akuades. Sebelumnya fraksi ekstrak dilarutkan dengan tween-80 agar semua ekstrak terlarut dalam akuades (Supraptiningsih, 1998).

C.5 Pengujian Antibakteri

Satu mililiter suspensi bakteri uji dengan kerapatan 10^7 - 10^8 bakteri/ml ditanam pada medium 15 ml NA dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Dengan pinset steril 'paper disk' berdiameter 1 cm diambil dan dicelupkan dalam larutan fraksi ekstrak N-heksan, kloroform, dan etanol pada konsentrasi 1% b/v, 5% b/v, 10% b/v selama 2 detik, setelah itu diangkat. Kertas selanjutnya dilewatkan diatas lampu bunsen, kemudian diletakkan diatas permukaan yang telah diinokulasi dengan suspensi bakteri. Pada setiap cawan petri diletakkan 3 buah 'paper disk' dari konsentrasi dan fraksi ekstrak yang sama.

D. Parameter

Parameter yang diamati adalah lebar daerah hambatan (dalam cm) dari masing-masing perlakuan yang diukur dengan menggunakan jangka sorong (Collins, 1970).

E. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dua faktor. Faktor pertama jenis fraksi ekstrak dan faktor kedua macam konsentrasi. Kedua faktor diperlakukan pada bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Variabel bebas : K1 (konsentrasi 1%)	F1 (fraksi N- heksan)
K2 (konsentrasi 5%)	F2 (fraksi kloroform)
K3 (konsentrasi 10%)	F3 (fraksi etanol)

Variabel tergantung : lebar zona bening (cm).

Masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Data yang diperoleh diuji normalitas dan homogenitasnya, selanjutnya dianalisa dengan analisis sidik ragam (ANOVA) kemudian dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) jika hasilnya berbeda nyata.

Bentuk Rancangan Percobaan:

Jenis Fraksi	Lebar zona hambatan (cm)		
	K1	K2	K3
F1	F1K1	F1K2	F1K3
F2	F2K1	F2K2	F2K3
F3	F3K1	F3K2	F3K3

Keterangan :

K1 : Konsentrasi 1%(b/v)

K2 : Konsentrasi 5%(b/v)

K3 : Konsentrasi 10%(b/v)

F1 : Fraksi ekstrak jahe N-heksan

F2 : Fraksi ekstrak jahe kloroform

F3 : Fraksi ekstrak jahe etanol

