

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1 Pengumpulan dan Determinasi Bahan Baku

Bahan berupa rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Roscoe var. *sunti* Val.), dan buah cabai jawa (*Piper retrofractum* Vahl) diperoleh dari Kebun Manoko Lembang. Determinasi tanaman dilakukan di *Herbarium Bandungense*, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

4.2 Pengolahan Bahan

Pengolahan bahan meliputi sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering, pengepakan dan penyimpanan. Sortasi basah dilakukan terhadap tumbuhan segar untuk memisahkannya dari kotoran dan bahan asing seperti tanah, kerikil rumput, bagian tanaman yang rusak serta kotoran lainnya yang tidak diinginkan. Pada akhirnya diambil bagian yang diinginkan saja. Pencucian dilakukan untuk membersihkan bahan simplisia dari kotoran-kotoran yang melekat. Pengeringan dilakukan pada bahan simplisia yang sudah bersih sehingga simplisia dapat disimpan dalam waktu lama. Pengeringan dilakukan pada cahaya matahari.

4.3 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Masing-masing dari simplisia rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Roscoe var. *sunti* Val.) dan buah cabai jawa (*Piper retrofractum* Vahl) ditimbang, kemudian diekstraksi dengan cara maserasi selama 3 hari menggunakan pelarut etanol 95%. Maserat ditampung setiap hari dan pelarut diganti. Hasil ekstraksi kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

4.4 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan pada serbuk simplisia ekstrak dari tumbuhan uji berupa rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Roscoe var. *sunti* Val.), dan buah cabai jawa (*Piper retrofractum* Vahl).

4.4.1 Tanin dan Polifenol

Serbuk simplisia dalam tabung reaksi dipanaskan dengan air di atas penangas air, kemudian disaring. Pada filtrat ditambahkan larutan gelatin 1%. Adanya endapan putih menunjukkan adanya tanin. Sebagai filtrat diuji ulang dengan ditambah larutan pereaksi besi (III) klorida. Terbentuknya warna biru hitam menunjukkan adanya tanin dan polifenol.

4.4.2 Saponin

Sejumlah serbuk simplisia ditambahkan dengan air panas kemudian didihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dikocok kuat-kuat. Adanya senyawa saponin ditandai

dengan terbentuknya busa dengan tinggi 1 cm dan tetap stabil selama 10 menit.

4.4.3 Flavonoid

Cara mengidentifikasi flavonoid adalah sejumlah serbuk simplisia, ditambahkan dengan air panas lalu dicampur dengan serbuk magnesium (Mg) dan asam klorida (HCl) 2N kemudian campuran dididihkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan amil alkohol setelah itu dikocok kuat - kuat dan biarkan sampai memisah. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol.

4.4.4 Alkaloid

Sampel serbuk atau ekstrak dibasahkan dengan amonia kemudian ditambahkan kloroform, digerus kuat-kuat. Lapisan kloroform dipipet sambil disaring, lalu ke dalamnya ditambahkan larutan asam klorida 2 N, campuran dikocok kuat hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan asam dipipet kemudian dibagi menjadi 2 bagian :

- a. Kepada bagian pertama ditambahkan pereaksi Mayer. Terjadi endapan atau kekeruhan diamati. Bila terjadi kekeruhan atau endapan berwarna putih berarti dalam sampel kemungkinan terkandung alkaloid.
- b. Kepada bagian kedua ditambahkan pereaksi Dragendorf. Terjadinya endapan atau kekeruhan diamati. Bila terjadi kekeruhan atau endapan berwarna jingga-kuning berarti dalam sampel kemungkinan terkandung alkaloid.

4.4.5 Monoterpen dan Seskuiterpen

Serbuk simplisia digerus dengan eter, kemudian sari eter dipipet sambil disaring. Filtrat dituang dalam cawan penguap, kemudian diuapkan hingga kering. Ke dalam hasil pengeringan filtrat ditambahkan larutan vanilin-asam sulfat melalui tepi cawan. Terjadinya warna-warna menunjukkan adanya monoterpenoid dan seskuiterpenoid.

4.4.6 Kuinon

Serbuk simplisia dalam tabung reaksi ditambah air dan dipanaskan di atas penangas air, kemudian disaring. Ke dalam filtrat ditambahkan larutan KOH 5%. Terjadinya warna kuning-merah menunjukkan adanya kuinon.

4.4.7 Steroid dan Triterpenoid

Serbuk simplisia digerus dengan eter, kemudian dipipet dan disaring. Filtrat dituang dalam cawan dan dibiarkan menguap sampai kering. Ke dalam hasil pengeringan ditambahkan pereaksi *Liebermann-Burchard* melalui tepi cawan. Terjadinya warna ungu menunjukkan adanya triterpenoid sedangkan terjadinya warna hijau biru menunjukkan adanya steroid.

4.5 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan cara sterilisasi basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan untuk alat-alat tertentu dengan cara dibakar pada nyala api Bunsen.

4.6 Penyiapan Bakteri Uji

Penyiapan mikroba uji meliputi pembuatan inokulum bakteri. *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diinokulasikan dalam media pertumbuhan NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

4.7 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Jahe Merah dan Cabai Jawa Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Ekstrak rimpang jahe merah dan cabai jawa masing-masing diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan menggunakan metode cakram kertas dengan diameter 6 mm. Ekstrak dibuat dengan konsentrasi masing-masing 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, dan 0,5%. Ekstrak dari rimpang jahe merah dan cabai jawa sebelumnya dilarutkan dalam larutan dimetil sulfoksida (DMSO). Sampel dilarutkan dalam DMSO karena DMSO dapat melarutkan secara sempurna ekstrak etanol, selain itu juga DMSO tidak mempunyai aktivitas antibakteri.

Bakteri ditanam pada media pertumbuhan nutrisi agar (NA) miring dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian bakteri yang akan diuji disuspensikan menggunakan media NB yang telah disterilisasi, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

4.8 Penetapan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum)

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak rimpang jahe merah dan buah cabai jawa ditentukan dengan metode difusi agar dengan menggunakan cakram kertas. Ekstrak dibuat dalam satu seri konsentrasi dengan masing-masing

konsentrasi 0,5%; 1%; 2%; 5%; 10% dan 20% dalam DMSO (5%) kemudian diuji. Cakram kertas steril diletakkan dalam inokulum kemudian ditetaskan larutan ekstrak, dibiarkan selama 30-60 menit (prainkubasi) dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

4.9 Penetapan Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Rimpang Jahe Merah dan Buah Cabai Jawa

Pada pengujian kombinasi kedua ekstrak, konsentrasi yang dipakai dengan menggunakan tiga perbandingan yaitu 1:1, 1:2 dan 1: $\frac{1}{2}$ dari masing-masing ekstrak. Dua buah pita kertas steril dicelupkan ke dalam dua larutan ekstrak yang berbeda, setelah tidak menetes lagi lalu diletakkan pada inokulum padat secara tegak lurus, dibiarkan selama 30-60 menit (prainkubasi) dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

4.10 Uji Aktivitas Antibakteri Kombinasi Antibiotik Pembanding

Dua buah pita kertas steril dicelupkan ke dalam dua larutan antibiotik yang berbeda. Antibiotik yang digunakan adalah kloramfenikol, tetrasiklin dan ampisilin, dengan konsentrasi masing-masing 200 µg/ml. Ketiga antibiotik tersebut dikombinasi secara bergantian untuk menghasilkan efek sinergis, aditif dan antagonis. Setelah tidak menetes lagi lalu diletakkan pada inokulum padat secara tegak lurus, dibiarkan selama 30-60 menit (prainkubasi) dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.



