

## **METODE PENELITIAN**

### **A. Desain penelitian**

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental, yaitu menentukan diameter zona hambat dengan konsentrasi ekstrak terpurifikasi jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) yang bervariasi. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi cakram, dimana dalam teknik ini media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri kemudian dimasukan kertas cakram yang sudah direndam senyawa uji.

### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### 1. Lokasi

- a. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
- b. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).

#### 2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan november 2019-januari 2020.

### **C. Variabel Penelitian**

#### 1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau sebab perubahan timbulnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kasar jahe merah dan ekstrak terpurifikasi jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) 0,5% b/v, 1% b/v, 1,5% b/v, 2%

b/v, kontrol positif amoksisilin, kontrol negatif DMSO dan kontrol media.

## 2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah variabel yang berubah karena variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat terhadap bakteri.

## 3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol adalah variabel yang keadaannya merupakan prasyarat bagi bekerjanya suatu variabel bebas terhadap variabel tergantung. Dalam penelitian ini variabel terkontrol merupakan alat, bahan, suhu, pencampuran bahan dan kondisi laboratorium.

## **D. Alat dan Bahan**

### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca digital, gelas ukur (Pyrex), beaker glass (Pyrex), cawan petri (Iwaki), erlenmeyer (Pyrex), anak timbangan gram, jarum ose, inkubator, autoclaf, kertas cakram (Conda), aluminium foil, jangka sorong, oven, blender, batang pengaduk, ayakan 30 mesh, corong pisah (Pyrex), kain flannel, toples kaca, *rotary evaporator*, waterbath (Iwaki), pipet tetes, obyek glass (Pyrex), deglass, lampu spiritus, tabung reaksi (Pyrex), mikroskop, chamber (Iwaki), penjepit tabung, cawan porselin, spatula, rak tabung reaksi, mikropipet.

### 2. Bahan

a. Bahan uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*)

b. Bahan Kimia

aquadest, Nutrient Agar (NA), etanol 96%, n-heksan, dimetilsulfoksida 1% (DMSO), NaCl, amoksisilin, FeCl<sub>3</sub>, Magnesium, amil alkohol.

c. Bahan Mikrobiologi

Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

## E. Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini yaitu:

1. Ekstrak kasar

Ekstrak kasar adalah sediaan kering, kental atau cair diperoleh dengan mengekstrak zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai diluar pengaruh cahaya matahari langsung.

2. Ekstrak terpurifikasi jahe merah

Ekstrak terpurifikasi jahe merah adalah ekstrak yang diperoleh melalui metode maserasi, kemudian dipurifikasi (dimurnikan) dengan pelarut n-heksan menggunakan corong pisah.

3. Daya hambat ekstrak terpurifikasi jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*)

Daya hambat adalah kemampuan suatu senyawa yang dihasilkan oleh suatu bahan dan dalam konsentrasi untuk menghambat bahkan membunuh proses pertumbuhan bakteri. Dalam penelitian ini daya hambat ekstrak terpurifikasi jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan mengukur diameter zona bening yang terdapat disekitar cakram.

## **F. Prosedur Penelitian**

### **1. Pembuatan Ekstrak Etanol Jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*)**

#### **a. Determinasi**

Tahap pertama penelitian ini adalah identifikasi tanaman, dalam tahap penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel jahe merah yang berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis dan mencocokkan morfologis yang ada dalam tanaman yang akan diteliti terhadap kepustakaan.

#### **b. Pembuatan serbuk simplisia jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*)**

Jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) yang masih segar dicuci dengan air yang mengalir dan dilakukan sortasi basah, kemudian dilakukan perajangan pada jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) dan dikeringkan dibawah sinar matahari tidak langsung ditutupi dengan kain hitam. Hal ini bertujuan untuk menghindari kerusakan senyawa kimia yang terkandung dalam jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) setelah kering, dilakukan sortasi

kering untuk menyingkirkan bahan-bahan yang rusak. Jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) yang telah kering dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus kemudian diayak dengan ayakan No.30 mesh dan disimpan dalam wadah bersih tertutup rapat.

b. Pembuatan ekstrak etanol jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*)

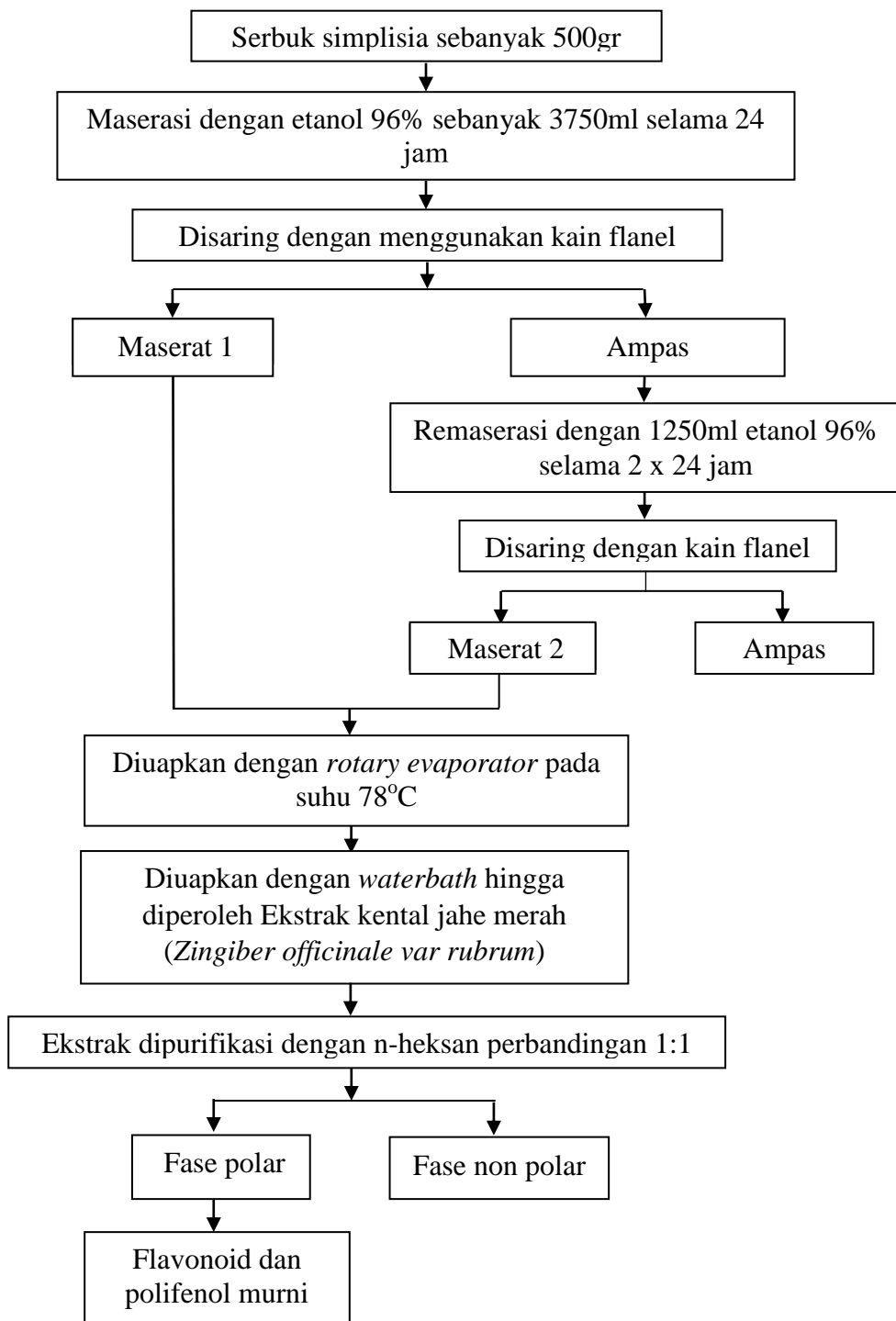
Pembuatan ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) yaitu dengan metode maserasi, menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan satu berbanding sepuluh (1:10). Diukur etanol 96% sebanyak 5000ml, kemudian ditimbang sebanyak 500gr serbuk jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) direndam pada pelarut etanol 96% sebanyak 3750ml dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu ruang sambil diaduk berulang-ulang agar zat aktif terekstraksi sempurna. Setelah 1 hari ekstrak disaring menggunakan kain flanel, kemudian residu diremaserasi kembali dengan etanol 96% sebanyak 1250ml. Bejana ditutup dan disimpan pada suhu ruang terlindung dari cahaya selama 2 x 24 jam lalu disaring menggunakan kain flanel. Ekstrak yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 78°C, kemudian dikentalkan dengan waterbath pada suhu 78°C hingga diperoleh ekstrak kental jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*). Ekstrak kemudian ditimbang untuk mengetahui berat dan persentase ekstrak.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

c. Pembuatan ekstrak terpurifikasi jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*)

Ditimbang 20 gram ekstrak kental jahe merah kemudian dilarutkan dengan 100ml etanol 96%. Ekstrak terpurifikasi dibuat dengan perbandingan satu berbanding satu (1:1) yaitu, 100ml ekstrak etanol jahe merah yang sudah terlarut dimasukkan kedalam corong pisah, kedalam larutan tersebut ditambah 100ml n-heksan. Corong digojok secara terus-menerus kemudian dидiamkan hingga terbentuk 2 lapisan dan diambil yang bagian etanol. Purifikasi dilakukan hingga pelarut n-heksan bening kira-kira 3-4 kali pengulangan. Kemudian ekstrak dikentalkan dengan waterbath pada suhu 78°C untuk mendapat ekstrak kental terpurifikasi.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak terpurifikasi}}{\text{bobot ekstrak kasar}} \times 100\%$$



**Gambar 3.1 Skema Pembuatan Purifikasi Ekstrak Etanol Jahe Merah (*Zingiber officinale var rubrum*)**

d. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan pada ekstrak terpurifikasi dan ekstrak kasar jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*). Pengujian ini dilakukan untuk menguji adanya golongan senyawa metabolit sekunder flavonoid, polifenol.

1) Flavonoid

Ekstrak ditambah logam Mg secukupnya dan ditetaskan HCl pekat kemudian ditambahkan amil alkohol lalu dikocok akan terbentuk warna merah kecoklatan mengindikasikan adanya senyawa flavonoid.

2) Polifenol

Ekstrak ditetesi dengan 3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$ . Terbentuknya warna hitam kebiruan mengindikasikan adanya senyawa fenol.

2. Pembuatan konsentrasi

Persentase berat per volume (% b/v) adalah jumlah gram zat terlarut dalam tiap 100 ml larutan.

a. Konsentrasi ekstrak terpurifikasi dan ekstrak kasar jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*)

Pada penelitian ini perbandingan seri konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 0,5% b/v, 1% b/v, 1,5% b/v dan 2% b/v dimana larutan yang digunakan adalah dimetilsulfoksida 1% (DMSO). Persentase berat per volume (% b/v) adalah jumlah gram zat terlarut dalam tiap 100 ml larutan.



Konsentrasi 0,5% b/v = 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam DMSO 1% ad 100 ml.

Konsentrasi 1% b/v = 1 gram ekstrak dilarutkan dalam DMSO 1% ad 100 ml.

Konsentrasi 1,5% b/v = 1,5 gram ekstrak dilarutkan dalam DMSO 1% ad 100 ml.

Konsentrasi 2% b/v = 2 gram ekstrak dilarutkan dalam DMSO 1% ad 100 ml.

b. Pembuatan kontrol positif

Amoksisilin 0,5 gram dilarutkan dalam DMSO 1% ad 100 ml.

c. Pembuatan kontrol negatif

DMSO 1%

3. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan 2 cara yaitu sterilisasi panas kering untuk alat-alat berupa kaca dan sterilisasi panas basah. Sterilisasi panas kering dengan oven pada suhu 100°C selama 1 jam untuk alat-alat kaca, sedangkan sterilisasi panas basah dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk alat-alat plastik dan media. Alat-alat lain seperti jarum ose disterilisasi dengan cara dipanaskan di atas api lampu spiritus sebelum digunakan (Sari, 2013).

4. Pembuatan Medium Nutrient Agar

Nutrient agar ditimbang sebanyak 10 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, ditambahkan dengan add aquadest 500 ml, lalu dipanaskan di

atas *hot plate* hingga mendidih selama 10-15 menit sambil diaduk sampai homogen (Suriawiria, 2005). Pembuatan agar miring NA dilakukan dengan memasukan media yang telah disterilkan kedalam tabung reaksi sebanyak  $\pm 5$  ml, tabung disumbat dengan kapas steril dan diletakan miring  $\pm 45^\circ$  ditunggu hingga setengah memadat. (Alexander, 2007)

#### 5. Peremajaan bakteri

Bakteri uji dari stok kultur diremajakan dengan cara menggores 1-2 jarum ose biakan mikroba pada media agar miring NA, lalu diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 30-37°C.

#### 6. Identifikasi bakteri uji

Pewarnaan bakteri uji yang dilakukan adalah pewarnaan Gram. Pewarnaan bakteri dilakukan untuk identifikasi dan untuk memastikan tidak ada kontaminan pada kultur kerja. Kaca obyek yang akan digunakan terlebih dahulu dibersihkan dengan alkohol 70% dan dikeringkan. Dibuat lingkaran dengan pensil warna di bagian bawah kaca obyek untuk menandai tempat bakteri. Identifikasi bakteri uji dilakukan dengan teknik pewarnaan Gram menggunakan Gram A, B, C dan D. Perbedaan klasifikasi antara Gram positif dan negatif adalah didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri (Jawetz *et al.*, 2001). Bentuk dan warna sel bakteri dalam preparat diamati secara mikroskopik pada perbesaran 40 x.

## 7. Pembuatan suspensi bakteri

Dalam pembuatan suspensi bakteri menggunakan metode bidang miring dengan alat tabung. Langkah pertama pembuatan Nutrien Agar dengan tambahan aquadest lalu dilarutkan, setelah larut NA dituang didalam tabung yang sudah di sterilisasi dengan memiringkan tabung ditunggu sampai setengah memadat lalu pengambilan bakteri menggunakan ose digoreskan zig-zag di permukaan NA yg sudah setengah memadat. Setelah itu dilakukan penuangan NaCl hingga mencapai batas ujung NA ditutup rapat dan disimpan dalam inkubator dengan suhu ruang 37°C selama 24 jam. (Lopez, 2003; Widiastomo, 2013).

## 8. Uji aktivitas antibakteri

### a. Uji antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan pada masing-masing konsentrasi ekstrak terpurifikasi dan ekstrak kasar jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) yaitu 0,5% b/v, 1% b/v, 1,5% b/v, 2% b/v, kontrol positif amoksisilin, kontrol negatif DMSO dan kontrol media yang hanya berisi media Nutrien Agar (NA). Pengujian ini dilakukan dengan metode Krybe-bauer yang dikenal sebagai metode cakram kertas. Kertas cakram steril dengan diameter 6 mm ditetaskan ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) yaitu 0,5% b/v, 1% b/v, 1,5% b/v, 2% b/v, kontrol positif amoksisilin, kontrol negatif DMSO masing-masing 50µL. Secara aseptis, cakram kertas diletakkan pada permukaan medium yang telah berisi bakteri uji. Kontrol media

Dalam 1 cawan petri berisi 3 buah kertas cakram dalam satu konsentrasi dengan 3 refleksi, dan masing-masing jarak antar cakram diatur supaya tidak terlalu dekat. Pengujian dilakukan dengan menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus*. Setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dilakukan pengukuran diameter daerah hambat yang ditandai dengan terbentuknya daerah bening disekitar cakram.

b. Pengukuran daya hambat

Zona hambat yang terbentuk pada jam ke-24 diukur menggunakan jangka sorong dan diinterpretasikan kekuatan zona hambatnya. Adanya aktivitas penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* yang ditandai terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram berwarna bening atau bersih yang mengandung larutan uji.

Pengukuran zona dilakukan dengan cara meletakkan jangka sorong pada batas luar kertas saring sampai dengan batas terpanjang dan batas terpendek daerah hambat yang terbentuk sehingga diperoleh jari-jari zona hambat terpanjang dan jari-jari zona hambat terpendek dengan rumus berikut :

$$R = \frac{p+q}{2}$$

Keterangan :

R : diameter zona penghambatan (mm)

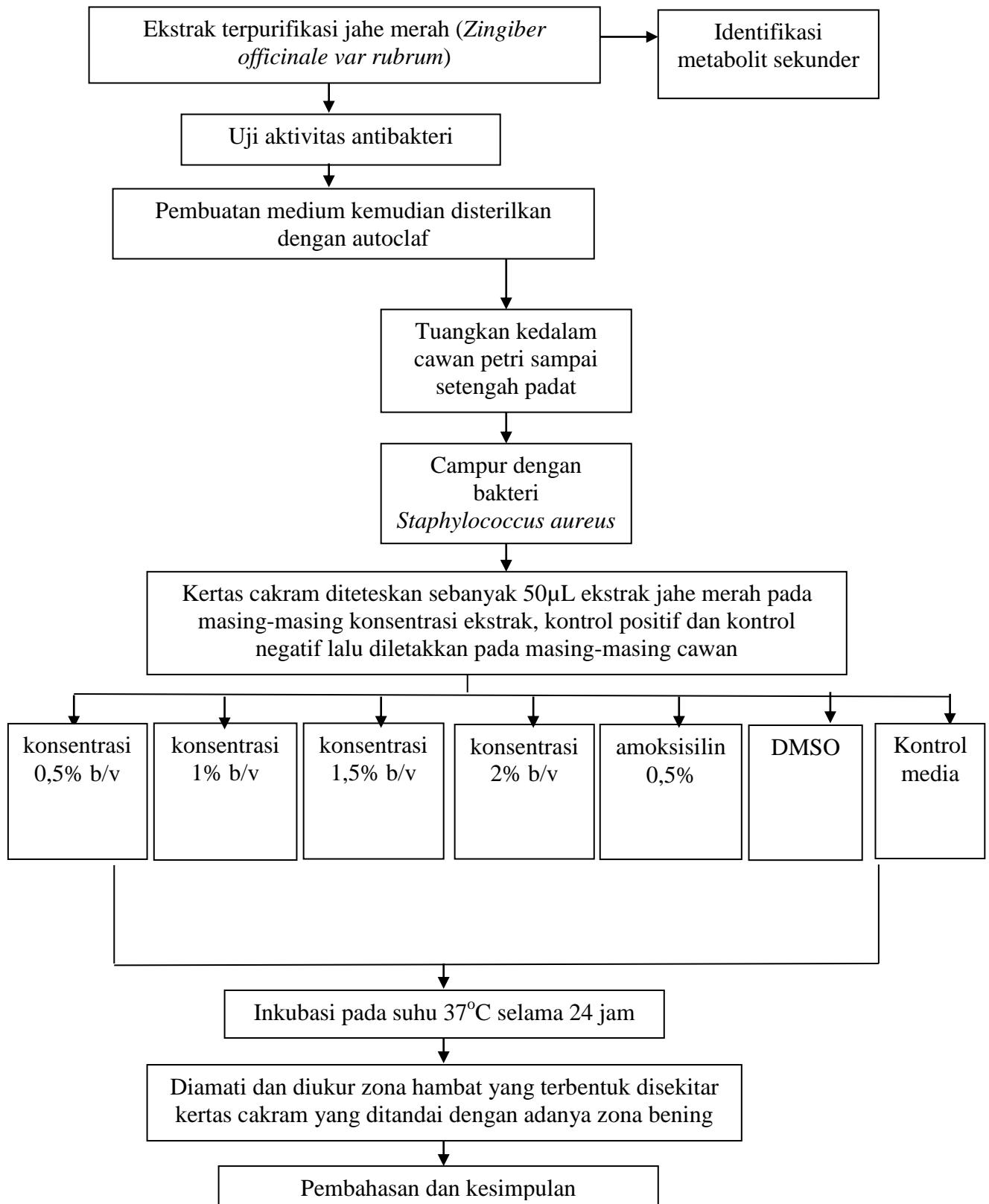
p : diameter zona penghambatan terpanjang (mm), dan

q : diameter zona penghambatan terpendek (mm)

c. Kelompok perlakuan

- 1) Kelompok I : Konsentrasi 0,5% b/v ekstrak terpurifikasi jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) terhadap cawan petri berisi media NA dan bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 2) Kelompok II: Konsentrasi 1% b/v ekstrak terpurifikasi jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) terhadap cawan petri berisi media NA dan bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 3) Kelompok III: Konsentrasi 1,5% b/v ekstrak terpurifikasi jahe merah (*Zingiber officinale*) terhadap cawan petri berisi media NA dan bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 4) Kelompok IV: Konsentrasi 2% b/v ekstrak terpurifikasi jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) terhadap cawan petri berisi media NA dan bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 5) Kelompok V: Konsentrasi 0,5% b/v ekstrak kasar jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) terhadap cawan petri berisi media NA dan bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 6) Kelompok VI: Konsentrasi 1% b/v ekstrak kasar jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) terhadap cawan petri berisi media NA dan bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 7) Kelompok VII: Konsentrasi 1,5% b/v ekstrak kasar jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) terhadap cawan petri berisi media NA dan bakteri *Staphylococcus aureus*.

- 8) Kelompok VIII: Konsentrasi 2% b/v ekstrak kasar jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) terhadap cawan petri berisi media NA dan bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 9) Kelompok kontrol positif : Amoksisilin terhadap cawan petri berisi media NA dan bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 10) Kelompok kontrol negatif : DMSO terhadap cawan petri berisi media NA dan bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 11) Kontrol media : Cawan petri berisi media NA dan bakteri *Staphylococcus aureus*.



**Gambar 3.2 Skema kerja penelitian**

## **G. Analisis Data**

Dalam penelitian ini dilakukan analisis Uji aktivitas antibakteri ekstrak terpurifikasi jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum*) data yang diperoleh yaitu besarnya diameter zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Hasil pengukuran diameter daerah hambat dianalisis secara statistik menggunakan program SPSS (*Statistical product and service solution*). Data dikatakan terdistribusi normal jika  $p > 0,05$  dan data dikatakan tidak terdistribusi normal jika  $p < 0,05$ . Kemudian dilanjutkan dengan uji *Levene's test* yaitu untuk mengetahui homogenitas data. Data dikatakan homogen jika  $p > 0,05$  dan data dikatakan tidak homogen jika  $p < 0,05$ . Data yang terdistribusi normal dan varietasnya homogen dianalisis menggunakan uji statistik *One Way Anova* (*Analysis Of Varians*) dengan taraf kepercayaan 95%. Data yang tidak memenuhi syarat tersebut maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*. Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji *Tukey LSD* lalu dilanjutkan uji *T-Test* untuk mengidentifikasi perbedaan antar kedua ekstrak yang digunakan