

### **III. MATERI DAN METODE**

#### **3.1. Lokasi dan Waktu**

Proses pembuatan ekstrak jahe merah dan uji zona hambat dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo selama 1 bulan, terhitung mulai tanggal 1 s/d 31 Januari 2024.

#### **3.2. Materi Penelitian**

##### **3.2.1. Alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jangka sorong digital, ose, pipet, autoklaf, *evaporator soxhlet*, inkubator, oven, api bunsen, pisau, *grinder*, spatula, pinset, timbangan digital dan box.

##### **3.2.2. Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat murni *Escherichia coli*, jahe merah, etanol 70%, aquades, kertas cakram kosong (*blank disk*) berdiameter 6 mm, kertas cakram antibiotik tetrasiklin, kapas swab steril, *plastic wrap*, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media *nutrient agar*, *dimethyl sulfoxide* (DMSO), standar larutan Mc. Farland 0,5, *tissue*, *glove*, masker dan alat tulis.

#### **3.3. Metode Penelitian**

##### **3.3.1. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang akan dilaksanakan adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana

media dan bahan percobaan seragam dan teknik pengambilan sampel secara acak, dengan tiga perlakuan dan masing-masing perlakuan diberikan ulangan tiga kali. Kelompok perlakuan yang akan dilakukan yaitu kelompok kontrol negatif menggunakan DMSO, kelompok kontrol positif menggunakan tetrasiklin dan kelompok perlakuan menggunakan ekstrak jahe merah konsentrasi 100%.

### **3.3.2. Variabel Penelitian**

Penelitian dilakukan dengan menggunakan beberapa variabel antara lain variabel bebas yaitu konsentrasi dan jenis ekstrak jahe merah, variabel tergantung yaitu zona hambat, dan variabel kendali yaitu teknik maserasi, asal tumbuhan jahe merah, dan isolat *Escherichia coli*.

## **3.4. Prosedur Penelitian**

### **3.4.1. Pengambilan Sampel**

Penelitian ini menggunakan sampel *Escherichia coli* yang terdapat pada media *nutrient agar* dan dibiakkan kembali pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA), dengan metode difusi kertas cakram (*Kirby-bauer*) dengan melakukan tiga kelompok perlakuan dan tiga kali pengulangan pada masing-masing sampel, sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah sembilan cawan petri. Pengambilan data dilakukan pada akhir periode penelitian dengan mengukur zona hambat pertumbuhan *Escherichia coli*.

### **3.4.2. Pembuatan Ekstrak Jahe Merah**

Jahe merah dikupas dan dicuci bersih dengan air mengalir selanjutnya diiris melintang lalu dikeringkan dengan oven pengering suhu 25°C hingga kering. Jahe merah kering kemudian digrinder hingga menjadi serbuk halus. Serbuk jahe merah dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:4. Maserasi

dilakukan tiga kali dan maserat diuapkan pada suhu 69°C menggunakan *evaporator soxhlet* (Buchi R-100; Soxhlet, Buchi, Indonesia). Penguapan dilakukan sampai mendapatkan ekstrak jahe merah yang kental. Ekstrak kental yang diperoleh disimpan dalam lemari es bersuhu 4°C (Prakoso dan Kurniasih, 2018).

#### **3.4.3. Peremajaan Bakteri *Escherichia coli***

Peremajaan *Escherichia coli* dilakukan dengan menggunakan media *nutrient agar* yang sudah dibuat. Secara perlahan ambil koloni bakteri dengan menggunakan ose yang telah disterilkan di api bunsen, kemudian digoreskan (*streak*) pada media *nutrient agar* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Suryani dkk., 2014).

#### **3.4.4. Pembuatan Suspensi Bakteri *Escherichia coli***

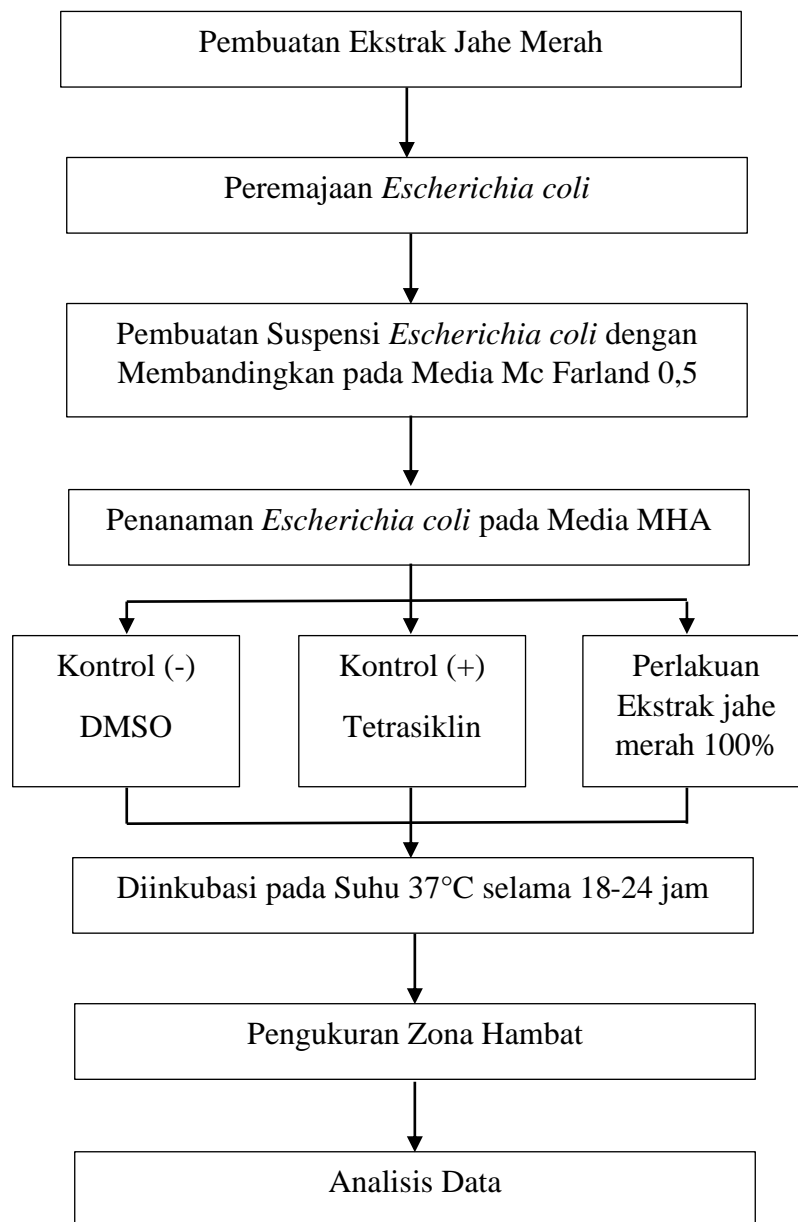
Isolat murni *Escherichia coli* yang ditumbuhkan pada media *nutrient agar* akan dibuat menjadi suspensi dalam media cair. Suspensi dibuat dengan mencampurkan koloni *Escherichia coli* ke dalam tabung reaksi yang berisi *buffer pepton water*, setelah itu dihomogenkan dengan menggunakan ose steril secara perlahan, tutup dengan kapas steril dan suspensi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil inkubasi dibandingkan kekeruhannya dengan Mc Farland 0,5 (Oktavia dkk., 2018).

#### **3.4.5. Uji Daya Hambat Metode Difusi Kirby-Bauer (Kertas Cakram)**

Pengujian daya hambat dilakukan dengan menginokulasikan suspensi bakteri pada media MHA dengan menggunakan kapas swab steril yang telah dicelupkan pada suspensi *Escherichia coli* dan diratakan secara perlahan, serta didiamkan hingga kering. Tempatkan kertas cakram yang telah direndam selama 15 menit kontrol negatif DMSO, kontrol positif tetrasiklin dan perlakuan ekstrak jahe merah 100% pada permukaan media MHA serta sisakan ruang diantara masing-masing kertas cakram untuk

memudahkan pengukuran diameter zona hambat. Media yang sudah diberikan kertas cakram diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pada setiap kontrol dan konsentrasi. Setelah inkubasi, ukur zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong (Utomo, dkk., 2018).

### 3.5. Kerangka Penelitian



**Gambar 3.1** Kerangka Penelitian

### **3.6. Analisis Data**

Data yang berdistribusi normal dan homogen dari hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan menggunakan Software SPSS versi 26. Jika uji *One way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p \leq 0,05$ ) maka dilanjutkan dengan *Bonferroni Post Hoc Test*.