

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

#### **3.1. Lokasi Dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Sidoarjo dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan 01 Januari 2024 – 30 Januari 2024.

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

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

Alat yang digunakan seperangkat alat maserasi, rotary evaporator, waterbath, batang pengaduk, pinset, ose, cawan petri, kapas, corong, kertas saring, inkubator, oven, mikroskop, dan jangka sorong.

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

Bahan yang digunakan antara lain jahe merah, tetrasiklin, DMSO, aquadest steril, etanol 96%, biakan bakteri *Salmonella sp.*, media MHA, media SSA, object glass dan kertas cakram.

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

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

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, menggunakan rancangan eksperimental murni (*true experimental design*). Uji efektivitas ekstrak ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var rubrum rhizoma*) terhadap bakteri *Salmonella sp.* dilakukan dengan cara uji in vitro laboratoris.

### 3.3.2. Variabel Penelitian

Variabel bebas yaitu ekstraksi ekstrak jahe merah dengan konsentrasi 50%, 70% dan 90%. Variabel terikat yaitu hasil Uji *Difusi Disk Kirby-Bauer* dan Daya Hambat. Variabel kendali yaitu konsentrasi *Salmonella sp.* Uji antibakteri meliputi 5 perlakuan dengan masing-masing 3 pengulangan yaitu P1: Media MHA + ekstrak jahe merah 50%; P2: Media MHA + ekstrak jahe merah 70%; P3: Media MHA + ekstrak jahe merah 90%; P4: Media MHA + tetrasiklin; P5: Media MHA + DMSO.

### 3.3.3. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel bakteri *Salmonella sp.* yang dibiakkan pada media MHA yang ditambahkan dengan ekstrak jahe merah. Sampel diberikan lima perlakuan berbeda, dengan masing-masing perlakuan diterapkan lima kali pada setiap sampel. Banyaknya sampel yang digunakan adalah 25, berdasarkan rumus Federer dalam Mukromunnisa (2023) sebagai berikut:

Dimana :  $(t - 1)(n - 1) \geq 15$

t = jumlah kelompok perlakuan.

n = Jumlah pengulangan atau jumlah sampel yang diberikan.

Berdasarkan rumus Federer dalam Mukromunnisa (2023), maka dapat ditentukan jumlah sampel perlakuan pada penelitian ini yaitu :

$$(t - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq 4.75 \text{ dibulatkan menjadi } n \geq 5.$$

### **3.4. Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1. Pemeriksaan Pemurnian Isolat *Salmonella sp.***

Bakteri *Salmonella sp.*, yang akan digunakan terlebih dahulu dilakukan proses pemeriksaan pemurnian isolat sebelum dilakukannya penelitian. Hasil dari proses pemurnian media *Salmonella Shigella Agar* antara lain koloni *Salmonella sp.* berbentuk bulat ditandai dengan warna bening dengan titik hitam di tengah, yang membedakan *Salmonella sp.* dengan *Shigella* adalah adanya hidrogen sulfida (H<sub>2</sub>S) yang ditunjukkan dengan warna antara hitam (Prayoga dan Fatmawati, 2018).

*Salmonella sp.* pewarnaan gram menunjukkan Bakteri Gram-negatif, dalam pemeriksaan dibawah mikroskop dengan morfologi berbentuk batang, motil, disertai dengan flagel bertipe peritrik (Samad *et al.*, 2019; Hariyanto dkk., 2023).

Uji biokimia TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) bakteri *Salmonella sp.* menunjukkan bagian slant dan bagian butt acid keduanya menunjukkan alkali. Hal ini dikarenakan *Salmonella sp.* hanya mampu memfermentasi glukosa dan tidak mampu memfermentasi laktosa atau sukrosa; warna hitam yang nampak disebabkan oleh pembentukan hidrogen sulfida (H<sub>2</sub>S) (Anjung, 2016).

Pengujian SIM (*Sulfide Indole Motility*) bakteri *Salmonella sp.* ditandai dengan produksi H<sub>2</sub>S dengan media berwarna hitam, indol negatif tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media, motilitas positif dapat dilihat apabila terjadi kekaburan media (Tuhumury dkk., 2022).

Pengujian SCA (*Simmon Cittrat Agar*) bakteri *Salmonella sp.*, menunjukkan hasil negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna media menjadi biru, artinya bakteri ini tidak menggunakan sitrat sebagai sumber (Abrori dkk., 2022).

Pengujian Urease bakteri *Salmonella sp.* menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak ada perubahan media urea agar di dalam tabung reaksi. Jika hasil tes urease positif, berarti bakteri tersebut menghasilkan enzim urease yang diperlukan untuk pemecahan urea (Satria dkk., 2021).

Pengujian MR (*Methyl Red*) bakteri *Salmonella sp.* menunjukkan hasil perubahan warna menjadi merah bila hasilnya positif; *methyl red* akan menjadi merah pada kondisi asam dan berwarna kuning pada kondisi basa (Muzadin dkk., 2018).

Pengujian VP (*Voges Proskauer*) pada bakteri *Salmonella sp.* tidak adanya cincin merah menunjukkan bahwa bakteri tidak mampu menghasilkan asetil karbonil dan produk akhir non-asam lainnya (Istiqomah dkk., 2023).

#### **3.4.2. Pembuatan Suspensi Bakteri *Salmonella sp.***

Hasil pemurnian koloni *Salmonella sp.* diambil dengan jarum ose, ditambahkan aquadest steril sebanyak 10cc ke dalam tabung reaksi. Suspensi bakteri kemudian dikocok sampai koloni tersebut tercampur dengan aquadest steril hingga terlihat adanya kekeruhan lalu kemudian setarakan dengan standar *McFarland* (McF) 0,5 (Bali dkk., 2019).

#### **3.4.3. Ekstraksi**

Jahe merah ditimbang sebanyak 5 kg disortasi basah, lalu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Setelah ditiriskan, jahe

merah dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C (Abeysekera *et al.*, 2005; Wahyudi, 2023) lalu dilanjutkan dengan maserasi 250gram jahe merah yang sudah kering lalu direndam menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:5. Proses maserasi dilakukan selama 3x24jam dengan memberikan pengadukan setiap 8 jam sekali. Setelah proses maserasi, dilakukan penyaringan untuk memisahkan antara ampas dengan maserat. Perlakuan selanjutnya dilakukan penyaringan, sisa padatan direndam kembali dalam pelarut segar dengan perbandingan 1:5, sama seperti pada prosedur pertama. Hasil dari masing-masing perlakuan kemudian dikentalkan dengan bantuan *rotary evaporator* pada suhu 50°C (Wahyudi, 2023), dilanjutkan dengan diuapkan di atas *waterbath* selama 3 jam pada suhu 40°C (Rahmadani dkk., 2018). Proses berikutnya adalah ditimbang pada masing-masing ekstrak untuk mengetahui berat rendemen dan dihitung % rendemen dan dimasukkan kedalam lemari pendingin sampai akan digunakan (Wahyudi, 2023).

#### **3.4.4. Pembuatan Stok Konsentrasi Ekstrak Jahe Merah**

Variasi konsentrasi ekstrak jahe merah yang digunakan dalam penelitian ini adalah 50%, 70%, 90% (Widhowati dkk., 2022) :

- a. Pembuatan konsentrasi jahe merah 50% yaitu, 0,5 ml ekstrak jahe merah dilarutkan dengan pelarut DMSO sampai 1 ml.
- b. Pembuatan konsentrasi jahe merah 70% yaitu, 0,7 ml ekstrak jahe merah dilarutkan dengan pelarut DMSO sampai 1 ml.
- c. Pembuatan konsentrasi jahe merah 90% yaitu, 0,9 ml ekstrak jahe merah dilarutkan dengan pelarut DMSO sampai 1 ml.

### **3.4.5. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram (*Test Kirby-Bauer*)**

Pada tahap awal uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram (*tes Kirby-Bauer*), bakteri *Salmonella sp.* diinokulasikan pada media MHA sebanyak 0,1 mL yang sudah disetarakan dengan *McFarland* (McF) menggunakan mikropipet. Campuran tersebut kemudian disebarakan secara merata menggunakan batang berbentuk L dan didiamkan selama 3-5 menit pada suhu ruang (Poelongan dkk., 2006; Nurhayati dkk., 2020).

Tahapan berikut kertas cakram dibagi menjadi 3 bagian, kemudian kertas cakram tersebut diletakkan pada masing-masing bagian dengan tiga konsentrasi ekstrak yang berbeda, yaitu 50%, 70% dan 90%. Pada kontrol positif, cakram diberi antibiotik tetrasiklin, sedangkan pada kontrol negatif hanya diberi DMSO tanpa pemberian ekstrak maupun antibiotik. Setelah itu, media MHA yang telah ditemplei cakram diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C; Proses ini dilakukan sebanyak 5 kali untuk setiap perlakuan. Pengamatan dan pengukuran zona hambat dilakukan setelah 1×24 jam (Rohayati, 2022).

### **3.4.6. Perhitungan Zona Hambat**

Setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, dilakukan pengamatan dan pengukuran terhadap zona hambat yang terbentuk dengan menggunakan penggaris. Pengukuran diameter zona hambat menggunakan rumus sebagai berikut (Tiwa dkk., 2017; Falakh dan Mahanani, 2022):

$$D = \frac{Dv+Dh}{2}$$

Keterangan :

D : Rerata diameter zona hambat

Dv : Diameter zona hambat vertikal – Diameter sumuran

Dh : Diameter zona hambat horizontal – Diameter sumuran

#### 3.4.7. Parameter Penelitian

Parameter penelitian adalah pengamatan yang dilakukan pada waktu inkubasi kurang dari 24 jam. Luas zona hambat diukur dari zona bening di sekitar kertas cakram dan menghitung nilai persentase diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dapat menggunakan rumus PIDG (*Percentage Inhibition Of Diameter Growth*) sebagai berikut (Aznita *et al.*, 2011; Widhowati dkk., 2022):

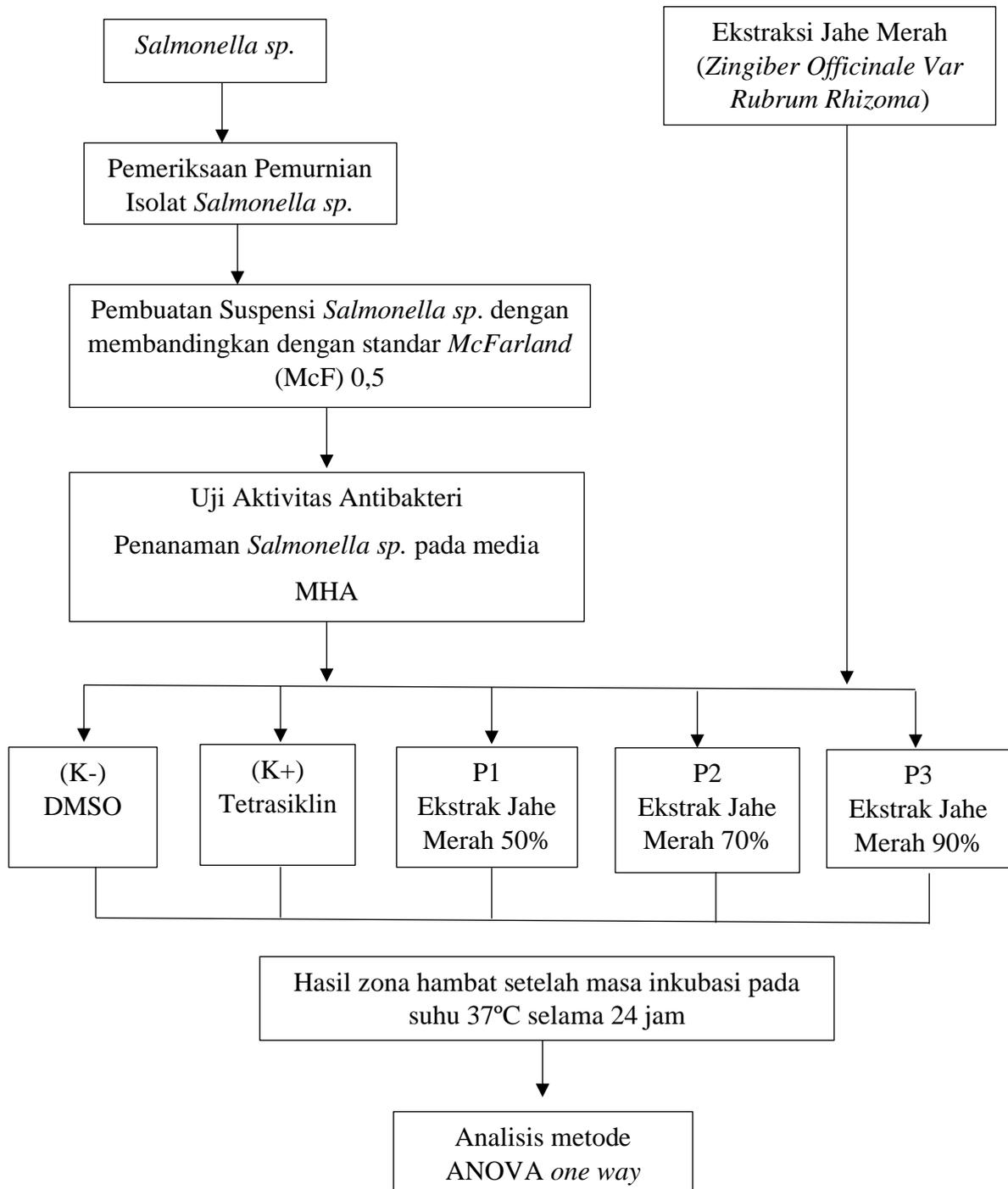
$$\text{PIDG (\%)} = \frac{A - B}{B} \times 100$$

Keterangan :

A = Diameter zona bening

B = Ukuran kertas cakram

### 3.5. Kerangka Operasional Penelitian



### 3.6. Analisis Data

Data kuantitatif dikumpulkan untuk mengukur daya hambat pertumbuhan bakteri *Salmonella sp.* Data kemudian dianalisis menggunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA *one way*) untuk mengetahui efektivitas pada perlakuan penelitian. Adanya perbedaan yang sangat nyata ( $\alpha=0,01$ ) antara kelompok perlakuan ekstrak *Zingiber officinale var rubrum rhizoma* dengan kelompok kontrol terhadap perkembangbiakan bakteri *Salmonella sp.*

Penafsiran dan penyimpulan hasil dilakukan berdasarkan hasil uji ANOVA dari setiap perlakuan untuk dibandingkan hasilnya, sehingga mendapatkan kelompok perlakuan yang paling efektif jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan positif (dengan perlakuan obat generik) dan perlakuan negatif (tanpa terapi).