

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain pada penelitian ini yaitu eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas dari jahe merah dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu dengan metode infusa.

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi, Prodi Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan Juni 2023 sampai Agustus 2023.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini menggunakan rimpang jahe merah.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini menggunakan rimpang jahe merah segar utuh. Kemudian disortasi basah untuk memisahkan rimpang dari bahan-bahan asing atau kotoran. Kemudian dirajang kecil dengan tebal 1-6,5 mm dan panjang umumnya 3-4 cm (Kemenkes RI, 2017). Selanjutnya dikeringkan menggunakan oven dengan derajat kering untuk simplisia rimpang yang telah diiris bila diremas mudah dipatahkan (Herawati *et al.*, 2012). Selanjutnya diblender dengan derajat kehalusan untuk rimpang jahe yaitu serbuk dengan mesh nomor 12.

D. Variabel

1. Variabel bebas

Konsentrasi menggunakan sampel infusa rimpang jahe merah.

2. Variabel terikat

Diameter zona hambat pada bakteri *Streptococcus mutans*.

3. Variabel terkontrol

Proses penginkubasian bakteri pada suhu 37°C selama 24 jam.

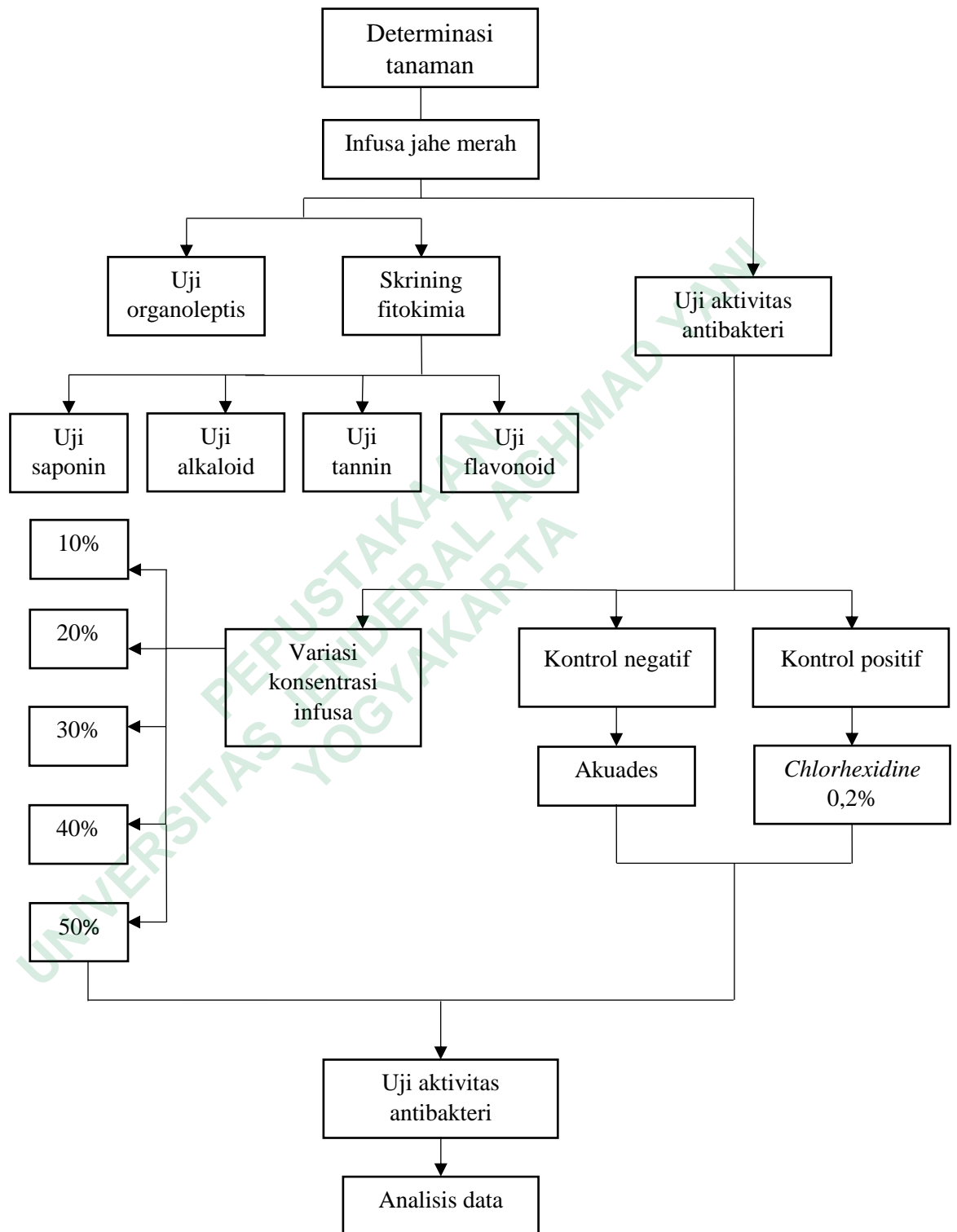
E. Definisi Operasional

1. Infusa rimpang jahe merah dibagi menjadi konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%.
2. Diameter zona hambat merupakan daerah sekeliling kertas cakram yang tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Alat untuk pembuatan serbuk dan infusa jahe merah yaitu: timbangan analitik, panci infusa, termometer air raksa, gelas ukur, penangas air, batang pengaduk, corong, gelas beaker 100 ml dan 250 ml, erlenmeyer 100 ml, 250ml, dan 500 ml, labu ukur 100 ml, oven, mesh 12 dan kertas saring.
 - b. Alat untuk uji fitokimia yaitu: rak tabung, tabung reaksi, gelas beaker 30 ml, pipet tetes, pipet ukur 1ml dan 5 ml, dan lampu bunsen
 - c. Alat untuk uji aktivitas antibakteri yaitu: rak tabung reaksi, ose, *micropipet* 100-1000 *microliter*, *blue tip*, cawan petri, gelas beaker 250 ml, tabung reaksi, bunsen, *hotplate*, *magnetic stirrer*, erlenmeyer 250 ml, spidol, aluminium foil, kertas cakram, jangka sorong, batang L, *cotton bud*, inkubator, pinset, autoklaf dan oven.
2. Bahan
 - a. Bahan untuk pembuatan infusa yaitu: serbuk rimpang jahe merah dan akuades.
 - b. Bahan untuk uji fitokimia yaitu: infusa jahe merah (konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%) ammonia cair, HCl 1%, FeCl₃, H₂SO₄, pereaksi dragendrof, CH₃COOH, H₂SO₄, CHCl₃, pereaksi wagner, pereaksi mayer.
 - c. Bahan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu: bakteri *Streptococcus mutans*, *Nutrient Agar* (Himedia), *Mueller Hinton Agar* (Himedia) dan *Mueller Hinton Agar* (Oxoid), alkohol 70%, akuades, *Chlorhexidine*, NaCl 0,9%, BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1%.

G. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 4. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan Sampel

a. Determinasi tanaman

Dilakukan identifikasi pada rimpang jahe merah di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Identifikasi dilakukan dengan tujuan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan benar tanaman rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var.*rubrum*).

b. Pengumpulan sampel

Tanaman jahe merah (*Zingiber Officinale* var.*rubrum*) diambil dari petani Jahe di kecamatan Gedang Sari Kabupaten Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta, dengan umur panen tanaman jahe merah yaitu 9 bulan.

c. Pembuatan Sampel

Dicuci bersih rimpang jahe merah dan dirajang menjadi potongan kecil. Ditimbang berat basah rimpang jahe merah sebanyak 4000 gram dikeringkan menggunakan oven selama 3 hari dengan suhu 60°C. Rimpang jahe merah dikatakan kering apabila simplisia diremas berubah menjadi serpihan (Herawati *et al.*, 2012), kemudian rimpang jahe merah diblender dan diayak menggunakan mesh nomor 12.

d. Pembuatan Infusa

Ditimbang serbuk jahe merah sebanyak 100 gr dimasukkan kedalam panci infusa. Ditambahkan 100 ml akuades. Panaskan diatas tangas air selama 15 menit dihitung mulai suhu mencapai 90°C sambil sesekali diaduk. Setelah 15 menit dinginkan infusa kemudian disaring menggunakan kertas saring, sehingga diperoleh konsentrasi 100% infusa rimpang jahe merah (Panggabean, 2017).

2. Kontrol Kualitas

a. Uji Organoleptik

Sediaan infusa jahe merah diamati secara visual yaitu seperti warna, bentuk, rasa dan bau.

b. Skrining Fitokimia

1) Uji Alkaloid

Disiapkan infusa rimpang jahe merah konsentrasi 100% sebanyak 5 ml lalu ditambahkan 5 ml HCl 1% kemudian diaduk dan disaring. Diambil 1 ml filtrat dari penyaringan tersebut kemudian ditambahkan ke setiap tabung reaksi 2-3 tetes reagen Meyer, Wagner dan Dragendorff. Positif alkaloid pada pereaksi Mayer apabila terdapat adanya perubahan warna menjadi endapan putih dan warna kuning. Positif alkaloid pada pereaksi Wagner adanya endapan warna coklat. Positif alkaloid pada pereaksi Dragendorff adanya endapan berwarna jingga atau biru kehitaman. Apabila semua pereaksi menunjukkan perubahan yang disebutkan, maka sampel dinyatakan positif mengandung alkaloid (Hammado, 2013).

2) Uji Saponin

Disiapkan infusa sebanyak 5 ml didalam tabung reaksi, tambahkan 5ml akuades dan gojok hingga tercampur sempurna. Apabila sampel terdapat adanya buih, sampel tersebut menunjukan bahwa infusa jahe merah terdapat kandungan saponin (Riaz *et al.*, 2015).

3) Uji Tannin

Disiapkan infusa sebanyak 2 ml didalam tabung reaksi. Ditambahkan 2-3 tetes FeCl_3 , kemudian diamati apakah ada endapan hitam kebiruan atau biru kehijauan. Hal ini menandakan bahwa infusa jahe merah mengandung tannin (Ainia, 2017).

4) Uji Flavonoid

Disiapkan infusa sebanyak 5 ml didalam tabung reaksi kemudian tambahkan 5 ml H_2SO_4 dan disaring dengan menggunakan kertas saring. Ditambahkan dengan 5 ml NH_3 dengan filtrat dari hasil penyaringan tersebut. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi, apabila terdapat warna kuning, menunjukkan bahwa infusa jahe merah mengandung flavonoid (Riaz *et al.*, 2015).

5) Uji Steroid dan Terpenoid

Disiapkan infusa sebanyak 2 ml kemudian ditambahkan 0,5 ml $CHCl_3$ dan 0,5 ml CH_3COOH . Setelah itu ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 . Apabila terjadi perubahan warna hijau atau biru menunjukkan terdapatnya steroid. Apabila terdapat bentuk cincin berwarna kecoklatan menandakan adanya terpenoid (Ainia, 2017).

3. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi peralatan seperti pinset, mulut tabung biakan dan jarum ose menggunakan api secara langsung. Sebelum digunakan alat yang sudah disterilkan tersebut didinginkan terlebih dahulu (Hamzah H *et al.*, 2021).

Sterilisasi alat gelas seperti gelas beaker, cawan petri, dan tabung reaksi menggunakan oven selama 1 jam pada suhu $171^\circ C$ (Hamzah H *et al.*, 2021).

Sterilisasi *Nutrient Agar*, *Mueller Hinton Agar*, $NaCl$ 0,9%, akuades, dan pipet tetes menggunakan autoklaf dengan suhu $121^\circ C$ selama 15 menit pada tekanan 1 atm (Yusriana *et al.*, 2014).

b. Pembuatan Media

1) *Nutrient Agar* (NA) miring untuk peremajaan bakteri

Ditimbang nutrient agar sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambahkan akuades hingga 25 ml.

Selanjutnya dipanaskan sampai mendidih untuk melarutkan media dengan menggunakan *hot plate magnetic stirrer*. Media disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Dituangkan sebanyak 5 ml masing masing pada 5 tabung reaksi steril, kemudian dimiringkan tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil. Media agar miring digunakan untuk inokulum suspensi bakteri uji (Agustin, 2022).

2) Media *Muller Hinton Agar* (MHA) untuk uji aktivitas bakteri

Ditimbang sebanyak 6,46 gram Media *Muller Hinton Agar* dilarutkan dalam 190 ml akuades dipanaskan sampai larut dengan menggunakan *hoteplate magnetic stirrer*. Media disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Kemudian dituang MHA ke cawan petri lalu biarkan hingga padat (Agustin, 2022).

c. Pembuatan Larutan *McFarland* 0,5

Diambil BaCl_2 1% sebanyak 0,05 ml dalam akuades. Ditambahkan H_2SO_4 1% sebanyak 9,95 ml. Disimpan *McFarland* pada tempat tertutup atau yang terhindar dari cahaya matahari secara langsung (S. Nurhayati, 2007). Diukur nilai absorbansi standar *McFarland* dengan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 625 nm, agar mengetahui bahwa larutan standar tersebut memiliki nilai absorbansi 0,08-0,1. Jika hasil yang didapat tidak memenuhi syarat 0,08-0,1 maka dilakukan pengenceran dengan akuades dan diukur kembali dengan spektrofotometer UV-Vis sampai memenuhi syarat. Standar *McFarland* yang akan digunakan yaitu *McFarland* 0,5 artinya perkiraan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Taufouqrrahman & Pijaryani, 2023).

d. Peremajaan Bakteri

Diambil 1 ose koloni bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175, kemudian ditanamkan pada media NA miring dengan cara digores. Bakteri yang sudah digores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Hasanuddin & Salnus, 2020).

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Diambil koloni bakteri pada media NA miring padat sebanyak 1-2 ose dan masukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah diisi dengan larutan NaCl 0,9% steril sebanyak 5 ml. Dibandingkan kekeruhann suspensi bakteri dengan standar *McFarland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) (Nurhayati *et al.*, 2020).

f. Pembuatan larutan sampel konsentrasi infusa dan kontrol positif

Infusa rimpang jahe merah dibuat sebanyak 100 ml dengan cara 100 gr simplisia kering rimpang jahe merah dilarutkan dengan akuades sebanyak 100 ml, sehingga diperoleh larutan induk infusa 100%. Konsentrasi infusa jahe merah yang akan diujikan adalah 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%. Dilakukan pengenceran menggunakan akuades steril dengan rumus :

$$\text{Pengenceran : } V_1.M_1 = V_2.M_2$$

Untuk membuat 25 ml infusa rimpang jahe merah 10%, dibuat dengan cara pengenceran dari infusa rimpang jahe merah 100% yaitu $V_1.M_1 = V_2.M_2$

$$V_1 \cdot 100\% = 25 \cdot 10\%$$

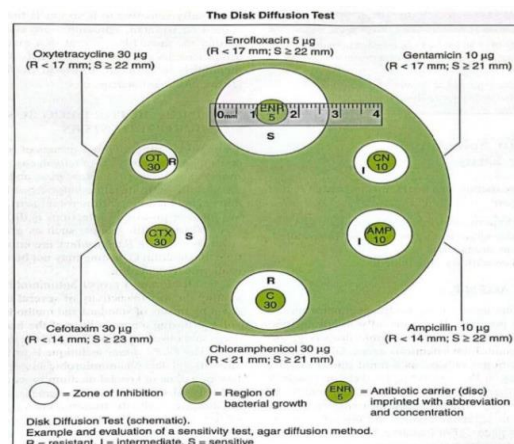
$$V_1 = 2,5 \text{ ml}$$

Maka pipet 2,5 ml infusa rimpang jahe merah 100%, tambahkan akuades hingga 25 ml. Lakukan hal yang sama untuk konsentrasi selanjutnya (Panggabean, 2017).

Kontrol positif menggunakan *Chlorhexidine* 0,2% murni yang di dapatkan dari Laboratorium MMT, Rumah Sakit Gigi dan Mulut, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

g. Pengujian Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Cakram

Pada penelitian ini langkah pertama disterilkan terlebih dahulu semua alat dan bahan yang digunakan. Diletakan suspensi bakteri sebanyak 0,1 mL kemudian diratakan suspensi bakteri menggunakan metode *spread plate* dengan batang L dan *cotton bud* diatas media MHA. Disiapkan kertas cakram steril dengan ukuran diameter 6 mm, direndam masing-masing kertas cakram pada infusa rimpang jahe merah sesuai dengan konsentrasi yang dibuat (10%, 20%, 30%, 40% dan 50%) dan kontrol negatifnya yaitu akuades dan kontrol positifnya yaitu *Chlorhexidine* 0,2% selama 5 menit. Kertas cakram yang sudah direndam kemudian diletakkan masing-masing di atas permukaan media MHA secara aseptis dengan menggunakan pinset dan ditandai atau diberi label. Diinkubasi cawan petri pada suhu 37°C selama 24 jam dalam posisi terbalik. Diamati dan diukur zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong yang ditandai dengan terdapatnya zona bening disekitar kertas cakram (Prayoga, 2013). Zona bening diukur tiga sisi secara horizontal, vertikal, dan diagonal, cara pengukuran diameter zona dapat dilihat pada Gambar 5. Setelah dapat nilai zona hambatnya, dihitung rata-rata dari zona hambat tersebut dan ditentukan klasifikasinya.



Gambar 5. Diameter Zona Hambat (Taralo, 2005)

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Hasil data yang diperoleh dari penelitian ini yaitu nilai zona hambat yang akan ditunjukkan dalam satuan mm. Zona hambat yang terbentuk dari konsentrasi yang digunakan dianalisis untuk mengetahui perbedaannya signifikan atau tidak. Sebelum dilakukan analisis secara statistik, data yang sudah diperoleh harus dicek normalitas dan homogenitas terlebih dahulu. Untuk menentukan normalitas data digunakan uji *Shapiro-wilk*. *Shapiro-wilk* dipakai apabila jumlah data < 50 . Jika tingkat signifikansi $> 0,05$ maka datanya dinyatakan terdistribusi dengan normal. Tujuan dilakukan uji homogenitas guna untuk melakukan pengujian varian data semua kelompok yaitu menggunakan uji *Lavene's*. Data dapat dikatakan homogen apabila menghasilkan nilai signifikansi $> 0,05$. Setelah data normalitas dan homogenitas telah memenuhi syarat selanjutnya data tersebut dianalisis menggunakan aplikasi SPSS dengan metode *Analysis of Varians* (ANOVA) *One Way* dengan persentase kepercayaan yaitu 95%.