

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen kuantitatif. Metode penelitian eksperimen merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh *treatment* (perlakuan) tertentu. Metode penelitian kuantitatif dapat diartikan sebagai metode penelitian yang berlandaskan pada filsafat positivisme, digunakan untuk meneliti pada populasi atau sampel tertentu, teknik pengambilan sampel pada umumnya dilakukan secara *random*, pengumpulan data menggunakan instrumen penelitian, analisis data bersifat kuantitatif/statistik dengan tujuan untuk menguji hipotesis yang telah ditetapkan (Sugiyono, 2016, hlm. 11-14).

B. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan sebuah penelitian eksperimental dengan menggunakan desain penelitian RAL (Rancangan Acak Lengkap). Rancangan Acak Lengkap ini adalah rancangan paling sederhana memiliki syarat yaitu media/ bahan percobaan homogen/ seragam (di laboratorium dan rumah kaca), penempatan perlakuan secara acak (*random*) dengan undian atau lort (Suhaerah, 2013, hlm.70).

Perlakuan yang digunakan adalah menggunakan konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30%, 35% dan kontrol dengan menggunakan larutan Dimetil Sulfoksida (DMSO) 10% yang akan dilakukan melalui *uji in vitro*.

Dalam menentukan berapa pengulangan yang harus dilakukan dengan menggunakan rumus Federer (Suhaerah, 2013, Hlm. 73).

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

Keterangan:

15 = derajat kebebasan umum

R = pengulangan

T = perlakuan, dalam hal ini ada 6 perlakuan (15%, 20%, 25%, 30%, 35% dan kontrol dengan menggunakan larutan DMSO 10%.

Sehingga perhitungan pengulangan uji efektivitas ekstrak jahe merah sebagai berikut:

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

$$(r-1)(6-1) \geq 15$$

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r = 4$$

Jadi banyak pengulangan yang dilakukan dalam uji efektivitas ekstrak jahe merah adalah sebanyak 4 kali. Maka berdasarkan dari hasil tersebut jumlah keseluruhan sampel yang digunakan sebanyak 24 sampel, dengan penempatan perlakuan yang dilakukan secara acak pada seluruh pengulangan. Sedangkan pengulangan pada uji efektivitas obat sirup jahe merah sebagai ialah:

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

Keterangan:

15 = derajat kebebasan umum

R = pengulangan

T = perlakuan, dalam hal ini ada 4 perlakuan (obat sirup ekstrak jahe merah konsentrasi 20%, obat sirup ekstrak perasan jahe merah konsentrasi 50%, ampisilin sebagai kontrol positif, dan basis obat sirup sebagai kontrol negatif).

Sehingga perhitungan pengulang uji efektivitas obat sirup jahe merah sebagai berikut:

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

$$(r-1) (4-1) \geq 15$$

$$(r-1) (3) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r = 6$$

Jadi banyak pengulangan yang dilakukan dalam uji efektivitas obat sirup jahe merah adalah sebanyak 6 kali. Maka dari hasil tersebut jumlah keseluruhan sampel yang digunakan sebanyak 24 sampel dengan penempatan perlakuan yang dilakukan secara acak pada seluruh pengulangan.

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini yaitu bakteri *Escherichia coli* penyebab diare serta manusia.

2. Objek Penelitian

Objek pada penelitian ini yaitu penghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* serta penerimaan produk di masyarakat.

3. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Pasundan yang terletak di Jalan Tamansari No. 6-8 Bandung, Jawa Barat 400116 serta di Laboratorium Riset Bioteknologi UPI yang terletak di Jalan Doktor Setiabudhi No. 229, Isola, Sukasari, Kota Bandung, Jawa Barat 40154. Penelitian dilakukan selama satu bulan terhitung mulai dari bulan Juni 2018 sampai bulan Juli 2018. Untuk uji efektivitas ekstrak jahe merah dan efektivitas obat sirup jahe merah masing-masing dilakukan selama 1 hari, sedangkan dengan uji organoleptik, uji pH, dan uji homogenitas dilakukan selama 1 hari.

4. Populasi Penelitian

Pada penelitian ini populasi penelitian terbagi menjadi dua berdasarkan subjek yang diamati:

- 1) Jumlah populasi dari subjek *Escherichia coli* adalah total luas bakteri *Escherichia coli* yang terdapat di tempat biakan NB yaitu sebanyak 7,5 mililiter (ml).
- 2) Jumlah populasi dari subjek manusia adalah mahasiswa dari Universitas Pasundan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Program Studi Pendidikan Biologi angkatan 2014, yang berjumlah 147 orang.

5. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi dua berdasarkan objek yang diamati:

- 1) Bakteri *Escherichia coli* yang akan digunakan sebagai sampel yaitu sebanyak luas 100 mikromili (µm) biakan bakteri *Escherichia coli* per tiap cawan petri yang akan diamati dikali jumlah pengulangan.
- 2) Mahasiswa yang dijadikan sebagai sampel yaitu mahasiswa yang memenuhi kriteria panelis, adapun kriteria panelis yang diajukan adalah sebagai berikut: merupakan mahasiswa Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Pasundan angkatan 2014, jenis kelamin laki-laki atau perempuan, memiliki pengalaman pernah menggunakan obat sirup diare, rentang umur 20-22 tahun. Adapun dalam penentuan panelis dipilih secara acak, dengan jumlah panelis yang akan dijadikan sampel yaitu 15% dari jumlah populasi, sehingga total sampelnya yaitu 22 orang mahasiswa.

D. Pengumpulan Data dan Instrumen Penelitian

1. Teknik Pengumpulan Data

Pada penelitian ini, teknik pengumpulan data yang digunakan adalah observasi, teknik observasi atau pengamatan langsung adalah kegiatan pengumpulan data dengan melakukan penelitian langsung terhadap kondisi

lingkungan objek penelitian yang mendukung kegiatan penelitian, sehingga didapat gambaran secara jelas tentang kondisi objek penelitian tersebut (Siregar, 2017, hlm. 42).

Teknik pengumpulan data dengan cara mengamati langsung objek yang diteliti, pada uji efektivitas ekstrak jahe merah yaitu diameter zona hambat dari ekstrak jahe merah terhadap bakteri *Escherichia coli* yang terdapat pada biakan NB yang telah tercampur dengan ekstrak jahe merah dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, dan kontrol dengan larutan DMSO 10%, satuan pengamatan dalam centimeter (cm). Sedangkan teknik pengumpulan data yang digunakan pada uji efektivitas obat sirup jahe merah, parameter yang diamati adalah diameter zona hambat dari obat sirup jahe merah terhadap potensi pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi yang digunakan 20% pada obat sirup ekstrak jahe merah dan 50% pada obat sirup ekstrak perasan jahe merah, satuan pengamatan dalam centimeter (cm). Menurut Sutrisno Hadi (1986) mengemukakan bahwa, observasi merupakan suatu proses yang kompleks, suatu proses yang tersusun dari berbagai proses biologis dan psikologis. Dua diantara yang terpenting adalah proses-proses pengamatan dan ingatan (Sugiyono, 2016, hlm. 203).

Sedangkan pengumpulan data pada uji organoleptik dilakukan dengan cara penyebaran angket pada panelis dengan parameter yang diukur adalah respon penerimaan dan kesukaan konsumen terhadap produk obat sirup jahe merah, dilakukan selama 1 hari.

2. Instrumen Penelitian

Menurut Emory (1985) mengemukakan bahwa pada prinsipnya meneliti adalah melakukan pengukuran terhadap fenomena sosial maupun alam. Karena pada prinsipnya meneliti adalah melakukan pengukuran, maka harus ada alat ukur yang baik. Alat ukur dalam penelitian biasanya dinamakan instrumen penelitian. Jadi instrumen penelitian adalah suatu alat yang digunakan mengukur fenomena alam maupun sosial yang diamati.

Secara spesifik semua fenomena ini disebut variabel penelitian (Sugiyono, 2016, hlm. 147-148). Pada penelitian ini instrumen yang digunakan adalah penggaris. Berikut tabel instrumen penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1. Instrumen Penelitian Uji Efektivitas Ekstrak Jahe Merah

Pengulangan	Perlakuan					
	Larutan DMSO 10%	Konsentrasi 15%	Konsentrasi 20%	Konsentrasi 25%	Konsentrasi 30%	Konsentrasi 35%
1						
2						
3						
4						
Rata-rata						

Tabel 3.2. Instrumen Penelitian Uji Efektivitas Produk Obat Sirup Jahe Merah

Pengulangan	Perlakuan			
	Obat Sirup Ekstrak Jahe Merah 20%	Obat Sirup Ekstrak Perasan Jahe Merah 50%	Kontrol + (Ampisilin)	Kontrol – (Basis obat sirup)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Rata-rata				

Tabel 3.3. Instrumen Penelitian Organoleptik Obat Sirup Jahe Merah

Sifat	Isilah nilai sesuai dengan apa yang teramati dalam kolom respon									
	Obat Sirup Ekstrak Jahe Merah				Respon	Obat Sirup Ekstrak Perasan Jahe Merah				Respon
1. Sifat Kenampakan	Nilai					Nilai				
Warna	1	2	3	4		1	2	3	4	
2. Sifat Aroma	Nilai					Nilai				
Sensasi Bau	1	2	3	4		1	2	3	4	
Perasaan di Hidung	1	2	3	4		1	2	3	4	
3. Sifat Rasa	Nilai					Nilai				
Sensasi Rasa	1	2	3	4		1	2	3	4	

Keterangan :

Warna : 1. Sangat tidak menarik
 2. Tidak menarik
 3. Menarik
 4. Sangat menarik

Sensasi Bau : 1. Bau tidak enak dan menyengat
 2. Bau tidak enak dan tidak menyengat
 3. Berbau enak dan menyengat
 4. Berbau enak dan tidak menyengat

Perasaan di Hidung : 1. Panas
 2. Cukup panas
 3. Hangat
 4. Cukup hangat

Sensasi Rasa : 1. Sangat tidak disukai
 2. Tidak disukai

3. Disukai

4. Sangat disukai

1. Berdasarkan dari dua produk yang telah dicoba, manakah yang lebih anda sukai? Obat Sirup Ekstrak Jahe Merah / Obat Sirup Ekstrak Perasan Jahe Merah?

Tabel 3.4. Instrumen Penelitian Uji Homogenitas Sediaan Obat Sirup Jahe Merah

Jenis Obat Sirup	Gambar	Keterangan
Obat Sirup Ekstrak Jahe Merah Konsentrasi 20%		
Obat Sirup Ekstrak Perasan Jahe Merah Konsentrasi 50%		

Tabel 3.5. Instrumen Penelitian Uji pH Sediaan Obat Sirup Jahe Merah

Jenis Obat Sirup	Gambar	pH
Obat Sirup Ekstrak Jahe Merah 20%		
Obat Sirup Ekstrak Perasan Jahe Merah 50%		

E. Teknik Analisis Data

Setelah pengamatan dilakukan data dianalisis menggunakan ANOVA one-way. *One way* ANOVA biasanya digunakan untuk menguji rata-rata/pengaruh perlakuan dari suatu percobaan yang menggunakan 1 faktor, dimana 1 faktor tersebut memiliki 3 atau lebih kelompok. *One way* ANOVA dapat disajikan dalam dua bentuk, yaitu perhitungan secara manual dan perhitungan menggunakan bantuan *software* SPSS 17 (Siregar, 2017, hlm. 269). Selanjutnya data di uji dengan menggunakan Duncan dengan tingkat kesalahan yang digunakan adalah 0,05% untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan yang diujikan pada bahan. Dalam pengujiannya analisis data dengan menggunakan aplikasi SPSS20 dalam menguji statistika data. Hasil angket yang telah disebarakan akan dianalisis dan diuraikan dalam bentuk deskriptif.

F. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini terdiri dari tiga tahap kegiatan yang meliputi tahap persiapan, tahap pelaksanaan dan tahap akhir yaitu pengolahan data dan analisis data.

Adapun prosedur penelitian yang dilakukan sebagai berikut:

1. Tahap Persiapan

- a. Menyusun proposal penelitian
- b. Menyusun surat perizinan pembelian bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.
- c. Menyusun surat perizinan melakukan penelitian di Laboratorium Pendidikan Biologi FKIP Univesitas Pasundan Bandung dan Laboratorium Riset Bioteknologi UPI Bandung.
- d. Melakukan observasi alat dan bahan yang digunakan
- e. Mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian, yaitu:

Tabel 3.6. Alat dan Bahan

No.	Nama Alat dan Bahan	Fungsi	Jumlah
1.	Inkubator	Untuk meninokulasi bakteri <i>Escherichia coli</i> dan tempat penyimpanan inokulasi bakteri.	1 Buah
2.	Oven	Untuk mengeringkan bahan yang akan dijadikan ekstrak.	1 Buah
3.	<i>Backer glass</i>	Untuk menyimpan ekstrak yang sudah dikeringkan.	3 Buah
4.	Petri Disk	Untuk menyimpan NB dan tempat inokulasi bakteri.	24 Buah
5.	Pipet	Untuk memindahkan bahan dari alat satu ke alat lainnya.	7 Buah
6.	Gelas ukur	Untuk mengukur ekstrak jahe merah, aquades dan etanol 70%.	3 Buah
7.	Kertas saring	Untuk menyaring ekstraksi yang sudah di rendam selama 24 jam.	3 Lembar
8.	Neraca	Untuk menimbang NB.	1 Buah
9.	Blender	Untuk memperhalus jahe merah yang sudah di oven.	1 Buah
10.	<i>Autoclave</i>	Untuk mensterilkan alat dan bahan.	1 Buah
11.	Spirtus	Untuk memanaskan cawan petri agar tetap steril.	1 Buah
12.	Spatula	Untuk memindahkan bakteri ke dalam NB yang sudah diberikan ekstrak jahe merah.	1 Buah
13.	Tabung gas	Untuk menyalakan <i>autoclave</i> .	1 Buah
14.	Saringan Mess 100	Untuk menyaring serbuk jahe merah	1 Buah
15.	Tabung reaksi	Untuk menyimpan biakan bakteri dan NA	4 Buah
16.	Kain Kasa	Untuk menyaring ekstrak perasan jahe merah	2 Buah
17.	Pisau	Untuk mengupas jahe merah.	1 Buah
18.	Batang pengaduk	Untuk mengaduk jahe merah yang telah tercampur etanol 70%	2 Buah
19.	Rapping	Untuk merekatkan gelas beaker yang berisi bahan agar tidak terkontaminasi	Secukupnya
20.	Nampan	Untuk tempat jahe merah yang sudah diiris dan serbuk jahe merah	3 Buah

No.	Nama Alat dan Bahan	Fungsi	Jumlah
21.	<i>Magnetic heated stirer</i>	Untuk mengaduk bahan agar tercampur merata.	1 Buah
22.	<i>Rotatory evapretor</i>	Untuk menguapkan ekstrak jahe merah yang sudah di rendam selama 24 jam. Dan untuk memisahkan bahan alami yang terkandung dalam ekstrak jahe merah.	1 Buah
23.	Karet	Untuk mengikat plastik agar rapat dan tidak ada udara.	Secukupnya
24.	Plastik	Untuk membungkus cawan petri yang akan disterilkan di <i>autoclave</i> .	Secukupnya
25.	Botol	Untuk tempat mengemas produk	2 Buah
26.	Mikropipet	Untuk memindahkan bahan cair dalam skala yang sedikit	1 Buah
27.	Botol vial	Untuk wadah jahe merah yang sudah di <i>rotatory evaporator</i> .	Secukupnya
28.	Jahe merah	Sebagai bahan subjek penelitian	2 kg
29.	Bakteri <i>Escherichia coli</i>	Sebagai objek yang diamati.	7,5 mililiter
30.	Etanol 95%	Sebagia campuran ekstrak jahe merah dan untuk memisahkan zat yang terkandung di dalam ekstrak jahe merah.	Secukupnya
31.	Jangka Sorong	Untuk menghitung diameter zona hambat pertumbuhan bakteri.	1 Buah
32.	<i>Nutrient Broth (NB)</i>	Sebagai media untuk pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> .	60 ml
33.	KNA (Kaldu Nutrien Agar)	Media untuk isolasi dan pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> .	60 ml
34.	Aquades	Sabagai campuran NB dan ekstrak jahe merah untuk pembuatan konsentrasi.	Secukupnya
35.	Stik Indikator	Untuk mengukur pH produk sediaan.	2 Buah
36.	Kertas Cakram	Sebagai alat untuk tolak ukur perhitungan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri	Secukupnya
37.	Sukrosa	Sebagai bahan basis pembuatan produk obat sirup dan sebagai pemanis	Secukupnya
38.	Essen Strawberry	Sebagai pemberi rasa dan aroma produk	Secukupnya
39.	Asam Sitrat	Sebagai bahan basis pembuatan produk obat sirup	Secukupnya

No.	Nama Alat dan Bahan	Fungsi	Jumlah
40.	Corong	Untuk tempat menyaring atau meletakkan kertas saring	2 Buah
41.	Tips	Sebagai ukuran dalam menggunakan mikropipet	Secukupnya
42.	Pinset	Untuk mengambil kertas cakram	Secukupnya
43.	Ampisilin	Sebagai kontrol positif	8 ml
44.	Larutan DMSO 10%	Sebagai kontrol	Secukupnya
45.	<i>Colony counter</i>	Untuk membatu pengamatan bakteri	1 Buah

2. Tahap Pelaksanaan

Tahap kedua yaitu tahap pelaksanaan penelitian yang didalamnya mencakup sterilisasi alat, ekstraksi jahe merah, pembuatan medium NB, uji *in vitro* penghambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, uji *in vitro* efektivitas obat sirup jahe merah terhadap potensi pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, uji organoleptik, uji pH sediaan obat sirup jahe merah, dan uji homogenitas sediaan obat sirup jahe merah.

1. Metode cakram difusi agar

Metode cakram difusi agar (*Agar Disk Diffusion Test*) merupakan cara untuk menentukan sensitivitas bakteri terhadap antimikroba antibiotik. Metode cakram difusi agar merupakan cara mudah untuk menetapkan kerentanan organisme terhadap antibiotik, yaitu dengan cara menginokulasi biakan pada pelat agar dan membiarkan antibiotik berdifusi pada medium agar. Cakram yang telah mengandung antibiotik diletakkan di permukaan pelat agar yang mengandung organisme yang diuji. Konsentrasi menurun sebanding dengan luas bidang difusi. Efek aktivitas antibiotik ditunjukkan oleh zona penghambat. Zona hambatan tampak sebagai area jernih atau bersih yang mengelilingi cakram tempat zat dengan aktivitas antimikroba terdifusi. Diameter zona dapat diukur dengan penggaris. Metode difusi agar telah digunakan secara luas dengan menggunakan cakram kertas saring yang tersedia.

2. Sterilisasi alat dan bahan

Alat dan bahan yang sudah disediakan dimasukkan kedalam plastik anti panas dan diikat dengan karet agar kedap udara dan rapih. Isi Autoclave dengan air secukupnya. Kemudian masukan alat dan bahan yang sudah diikat rapih karet kedalam autoclave yang berada di Laboratorium Riset Bioteknologi UPI dengan suhu 121°C selama 15 menit. Setelah 15 menit keluarkan alat dan bahan dari dalam autoclave dan siap untuk digunakan.

3. Ekstrasi Jahe Merah

Jahe merah diperoleh di pasar jagasatru Cirebon sebanyak 2 kg. Kemudian jahe dibersihkan dan disikat hingga terpisah dari tanah yang menempel, setelah itu jahe merah diiris dengan menggunakan pisau, jemur jahe merah di bawah matahari secara langsung selama 3 hari. Setelah kering, jahe merah dihaluskan dengan menggunakan blender hingga menjadi serbuk kasar, selanjutnya oven serbuk kasar jahe merah selama 20 menit dengan suhu 150°C. Selanjutnya disaring hingga diperoleh serbuk halus. Sisa serbuk kasar kembali diblender kemudian disaring kembali untuk kedua kalinya. Semua serbuk halus disaring menggunakan saringan mes 100. Kemudian timbang serbuk jahe merah sebanyak 150 gram, hitung ethanol 96% sebanyak 1350 ml menggunakan gelas ukur kemudian masukkan ke dalam *beaker glass* yang berisi serbuk jahe merah, aduk hingga merata, tutup *beaker glass* dengan menggunakan plastik perekat, dan diamkan selama 1x24 jam dalam suhu kamar. Setelah didiamkan selama 24 jam air rendaman jahe merah disaring dengan menggunakan kertas saring agar serbuk jahe merah dengan airnya terpisahkan, setelah penyaringan selesai, kemudian ekstrak jahe merah diuapkan menggunakan alat *Rotatory vacuum evaporator*. Proses penguapan dilakukan selama 2 jam sampai ekstrak jahe merah murni benar-benar terpisah dari ethanol. Setelah itu hasil penguapan kembali diuapkan dengan cara dihangatkan dalam air yang panas hingga menghasilkan ekstrak jahe merah yang teksturnya lebih kental. Setelah ekstrak jahe merah di *Rotatory evaporator* kemudian dibuatkan konsentrasi

menjadi beberapa konsentrasi (15%, 20%, 25%, 30%, dan 35%) dengan rumus perhitungan:

$$V_p.K_p = V_e.K_e$$

Keterangan :

V_p = volume larutan pekat

K_p = konsentrasi larutan pekat

V_e = volume larutan encer

K_e = konsentrasi larutan encer

(Suhara, 2013, Hlm. 44).

1) Pembuatan konsentrasi 15%

$$V_p.K_p = V_e.K_e$$

$$100.K_p = 15.2$$

$$= 30/100$$

$$= 0.3 \text{ ml ekstrak jahe merah } 1.7 \text{ ml DMSO } 10\%$$

2) Pembuatan konsentrasi 20%

$$V_p.K_p = V_e.K_e$$

$$100.K_p = 20.2$$

$$= 40/100$$

$$= 0.4 \text{ ml ekstrak jahe merah } 1.6 \text{ ml DMSO } 10\%$$

3) Pembuatan konsentrasi 25%

$$V_p.K_p = V_e.K_e$$

$$100.K_p = 25.2$$

$$= 50/100$$

$$= 0.5 \text{ ml ekstrak jahe merah } 1.5 \text{ ml DMSO } 10\%$$

4) Pembuatan konsentrasi 30%

$$V_p.K_p = V_e.K_e$$

$$100.K_p = 30.2$$

$$= 60/100$$

$$= 0.6 \text{ ml ekstrak jahe merah } 1.4 \text{ ml DMSO } 10\%$$

5) Pembuatan konsentrasi 35%

$$V_p.K_p = V_e.K_e$$

$$100.K_p = 35.2$$

$$= 70/100$$

$$= 0.7 \text{ ml ekstrak jahe merah } 1.3 \text{ ml DMSO } 10\%$$

4. Pembuatan KNA (Kaldu Nutrisi Agar)

Pertama buatlah ekstrak daging sebanyak 0,5 kg direbus dalam air 1000 ml. Ekstrak daging direbus hingga volume air menjadi setengahnya atau kurang lebih ekstrak daging direbus selama 1 – 2 jam. Setelah itu saring ekstrak daging dengan menggunakan kertas saring, kemudian tambahkan aquades hingga volume menjadi 1000 ml. Masukkan pepton 10 g, NaCl 5 gr, dan agar-agar 15 gr kemudian panaskan hingga mendidih selama 15 menit dengan menggunakan magnetic stirrer with hotplate. Ukur pH, usahakan pH menjadi 6,8 – 7,3. Setelah itu buatlah agar diri dan agar miring dengan menggunakan tabung reaksi. Untuk agar diri setiap tabung reaksi diisi suspensi agar sebanyak 12 – 15 ml. Sedangkan untuk agar miring setiap tabung reaksi diisi dengan suspensi agar sebanyak 3 -5 ml. Kemudian tutup tabung reaksi dengan kapas sebaik mungkin, sterilkan tabung dan cawan petri dengan menggunakan autoclave selama 15 – 20 menit pada suhu 121°C. Setelah disterilkan, untuk agar diri dibiarkan dalam keadaan tegak dan untuk agar miring diletakan dalam keadaan miring, biarkan sampai dingin.

5. Pembuatan *Nutrient broth (NB)*

Campurkan ekstrak daging dan pepton sebanyak 2 gr, lalu tambahkan aquades sampai 250 ml kemudian didihkan di *magnetic stirrer hotplate*. Setelah itu masukkan ke dalam Erlenmeyer ukur pH , usahakan pH menjadi 6,8 – 7,3. Setelah itu masukkan kedalam tabung reaksi, 12 – 15 ml untuk agar diri dan 3 – 5 ml untuk agar miring. Tutup tabung dengan kapas yang dibungkus dengan pembungkus. Kemudian sterilkan suspensi dalam media *autoclave* selama 15 – 20 menit pada suhu 121°C.

6. Uji *in vitro* Penghambatan Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* Dengan Ekstrak Jahe Merah

Pengujian dilakukan dengan menyiapkan medium NB cair dan seri konsentrasi yang akan diujikan untuk uji *in vitro*. Seri konsentrasi yang digunakan yaitu 15%, 20%, 25%, 30%, 35% dan kontrol dengan larutan DMSO 10%. NA yang telah dipanaskan hingga menjadi cair, setelah menjadi cair NA didinginkan pada suhu ruangan. Pindahkan NA tersebut ke dalam cawan petri dengan benar dan dilakukan disekitar bunsen spirtus yang menyala, dengan tujuan agar tetap steril. Kemudian diamkan lagi hingga NA menjadi agar dalam cawan petri. Masukkan biakan bakteri *Escherichia coli* pada NB ke dalam masing-masing cawan petri yang berisi agar NA dengan menggunakan mikropipet dengan skala 100 μ l. Ratakan biakan bakteri dengan menggunakan ose. Kemudian simpan di masing-masing cawan petri kertas cakram, setiap cawan petri berisi 6 kertas cakram. Tempelkan kertas cakram tersebut sesuai dengan konsentrasi ekstrak jahe merah yang telah disiapkan yaitu 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, dan kontrol dengan larutan DMSO hingga kertas cakram terendam dan menempel dengan biakan bakteri pada cawan petri. Selanjutnya bungkus semua cawan petri ke dalam plastik antipanas lalu diinkubasi pada suhu 22°C - 30°C selama 1 X 24 jam. Parameter yang akan diamati adalah diameter zona hambat yang diukur dengan menggunakan jangka sorong dan penggaris.

7. Pembuatan Produk Obat Sirup Jahe Merah

Obat sirup jahe merah dibuat menjadi 2 produk, yaitu: obat sirup ekstrak jahe merah dan obat sirup ekstrak perasan jahe merah.

1) Pembuatan obat sirup ekstrak jahe merah konsentrasi 20% untuk 50 ml.

Bahan-bahan yang akan digunakan ditimbang sesuai dengan hasil perhitungan yang dibutuhkan dalam pembuatan produk. Gula halus sebanyak 20,6 gram dimasukkan ke dalam gelas beaker, kemudian tambahkan asam sitrat sebanyak 0,1 gram ke dalam gelas beaker yang berisi gula halus. Larutkan dengan auades sebanyak 15 ml dengan dipanaskan dan aduk hingga

homogen. Setelah bahan homogen masukan ekstrak kental murni jahe merah konsentrasi 20% sebanyak 5 gram dan aduk kembali hingga homogen dan tidak ada endapan. Setelah itu, saring larutan sirup tersebut hingga benar-benar terpisah dari endapan. Setelah penyaringan selesai, larutan sirup ditambahkan essens strawberry sebagai perasa dan pemberi warna sebanyak 0,83 gram agar lebih menarik. Tambahkan aquades hingga obat sirup mencapai 50 ml. Masukkan obat sirup ekstrak jahe merah yang sudah jadi ke dalam botol, dikemas dengan rapih dan bersih. Obat sirup ekstrak jahe merah akan diujikan keefektifitasannya secara *in vitro* pada biakkan bakteri *Escherichia coli*, diujikan pH dengan kertas indikator ph universal untuk dilihat tingkat keasamannya, uji organoleptik, dan uji homogenetas (ada atau tidaknya endapan pada larutan obat sirup ekstrak jahe merah).

2) Pembuatan obat sirup ekstrak perasan jahe merah konsentrasi 50% untuk 100 ml.

Jahe yang telah dicuci bersih kemudian diparut, kemudian diperas hingga mendapatkan air perasan jahe merah hingga menghasilkan 200 ml. Air perasan jahe merah dipanaskan dengan suhu 90°C - 100°C. Setelah itu air perasan jahe merah tersebut disaring dengan menggunakan kertas saring, sehingga menghasilkan air ekstrak perasan jahe merah dengan jumlah setengah dari total jumlah awal, hal ini karena terjadinya penguapan ketika proses pemanasan, sehingga air perasan akan berkurang. Air ekstrak perasan jahe merah dibuat menjadi konsentrasi 50% dengan rumus perhitungan yang sama dengan pembuatan ekstrak jahe merah murni.

Pembuatan obat sirup ekstrak perasan jahe merah sama hal nya seperti pembuatan obat sirup ekstrak jahe merah, hanya terdapat perbedaan pada ekstrak perasan jahe merah dan jumlah bahan yang digunakan dalam membuat 100 ml. Bahan-bahan yang akan digunakan ditimbang sesuai dengan hasil perhitungan yang dibutuhkan dalam pembuatan produk. Gula halus sebanyak 41,2 gram dimasukkan ke dalam gelas beaker, kemudian tambahkan asam sitrat sebanyak 0,2 gram ke dalam gelas beaker yang berisi gula halus. Panaskan dan aduk hingga homogen. Setelah bahan homogen

masukan ekstrak perasan jahe merah konsentrasi 50% sebanyak 50 ml dan aduk kembali hingga homogen dan tidak ada endapan. Setelah itu, saring larutan sirup tersebut hingga benar-benar terpisah dari endapan. Setelah penyaringan selesai, larutan sirup ditambahkan essens strawberry sebagai perasa dan pemberi warna sebanyak 1,6 gram agar lebih menarik. Tambahkan aquades hingga obat sirup mencapai 100 ml. Masukkan obat sirup ekstrak perasan jahe merah yang sudah jadi ke dalam botol, dikemas dengan rapih dan bersih. Kemudian obat sirup ekstrak perasan jahe merah akan diujikan keefektifitasannya juga secara *in vitro* pada biakkan bakteri *Escherichia coli*, diujikan pH dengan kertas indikator ph universal untuk dilihat tingkat keasamannya, diuji organoleptik, dan uji homogenitas (ada atau tidaknya endapan pada larutan obat sirup ekstrak perasan jahe merah).

8. Uji *in vitro* Efektivitas Sediaan Obat Sirup Jahe Merah Terhadap Bakteri *Escherichia coli*

1) Uji *in vitro* efektivitas obat sirup ekstrak jahe merah 20%

Pengujian dilakukan dengan menyiapkan medium NA cair dan seri konsentrasi yang akan diujikan untuk uji *in vitro*. Selanjutnya bakteri diinokulasi dengan menggunakan ose ke dalam cawan petri, kemudian masukan kertas cakram yang telah direndam dengan kontrol positif (ampisilin), kontrol negatif (basis obat sirup), dan obat sirup ekstrak jahe merah 20%. Setelah itu cawan petri dibungkus dengan plastik antipanas.. Kemudian diinkubasi pada suhu 22°C – 30°C selama 1 X 24 jam. Parameter yang diamati adalah diameter koloni bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan penggaris.

2) Uji *in vitro* efektivitas obat sirup ekstrak perasan jahe merah 50%

Pengujian dilakukan dengan menyiapkan medium NA cair dan seri konsentrasi yang akan diujikan untuk uji *in vitro*. Selanjutnya bakteri diinokulasi dengan menggunakan ose ke dalam cawan petri, kemudian masukan kertas cakram yang telah direndam dengan kontrol positif (ampisilin), kontrol negatif (basis obat sirup), dan obat sirup ekstrak perasan

jahe merah 50%. Setelah itu cawan petri dibungkus dengan plastik antipanas.. Kemudian diinkubasi pada suhu 22°C – 30°C selama 1 X 24 jam. Parameter yang diamati adalah diameter koloni bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan penggaris.

9. Evaluasi Sediaan Obat Sirup Jahe Merah (Uji Homogenitas)

Sediaan obat sirup ekstrak jahe merah 20% dan obat sirup ekstrak perasan jahe merah 50% dihomogenkan (dikocok), kemudian dilihat apakah terdapat endapan atau tidaknya.

10. Evaluasi Sediaan Obat Sirup Jahe Merah (Uji pH)

Rendam stik indikator universal pada sediaan obat sirup ekstrak jahe merah 20% dan obat sirup ekstrak perasan jahe merah 50%, kemudian ukur ph pada setiap masing-masing sediaan obat sirup.

11. Evaluasi Sediaan Obat Sirup Ekstrak Jahe Merah (Uji Organoleptik)

Diamati warna, sensasi bau, perasaan di hidung, dan rasa dari sediaan obat sirup ekstrak jahe merah 20% dan obat sirup ekstrak perasan jahe merah 50% melalui respon hasil pemberian angket kepada panelis yang dilakukan waktu 1 hari. Parameter yang diamati adalah daya suka dan penerimaan konsumen melalui angket terhadap produk sediaan obat sirup.

3. Tahap Akhir

1. Pengolahan dan Analisis Data

Setelah diketahui efektivitas ekstrak jahe merah serta efektivitas obat sirup ekstrak jahe merah dan obat sirup ekstrak perasan jahe merah terhadap potensi pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* serta telah diketahui respon dari penerimaan masyarakat terhadap produk obat sirup ekstrak jahe merah dan obat sirup ekstrak perasan jahe merah maka dilakukan pengolahan data menggunakan teknik analisis data yang sebelumnya telah ditentukan.

2. Membuat Kesimpulan dan Hasil

Hasil dan pengolahan analisis data selanjutnya dibuat menjadi sebuah kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan.