

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak hasil fermentasi rimpang jeringau (*Acorus calamus*) terhadap *Staphylococcus aureus* dengan mengukur diameter zona hambat atau zona bening yang dihasilkan pada media yang telah berisi suspensi *Staphylococcus aureus* dan diberi ekstrak hasil fermentasi rimpang jeringau. Penelitian dilakukan dengan replikasi sebanyak 3 kali. Adapun tahap-tahap pada penelitian ini yaitu preparasi rimpang jeringau, fermentasi rimpang jeringau, ekstraksi hasil fermentasi rimpang jeringau, identifikasi senyawa fitokimia, pembuatan suspensi *Staphylococcus aureus*, uji antibakteri.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah ekstrak hasil fermentasi rimpang jeringau. Sedangkan sampel dalam penelitian ini adalah 0.05g ekstrak hasil fermentasi rimpang jeringau.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Instrumen Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Waktu penelitian dilaksanakan mulai dari penyusunan proposal bulan November 2018 sampai dengan terselesaikannya penelitian pada bulan Juli 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Ekstrak rimpang jeringau terfermentasi	Ekstrak merupakan hasil dari fermentasi rimpang jeringau yang di maserasi menggunakan pelarut etanol selama beberapa waktu.	Panca indera	Cairan kental berwarna pekat dengan bau khas	Nominal
Aktivitas antibakteri	Kemampuan ekstrak hasil fermentasi rimpang jeringau (<i>Acorus calamus</i>) dalam menghambat pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan menggunakan metode difusi sumuran	Jangka sorong	Terbentuk diameter zona hambat atau zona bening di sekitar lubang sumuran pada media uji	Nominal

3.5 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah blender, loyang, incubator, autoklaf, neraca analitik, mikro pipet, jarum ose, bunsen, oven, lemari es (LG), spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis), *vortex homogenizer*, *rotary evaporator*(Hann Shin HS-3001),serta *glassware*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang jeringau, kultur *Staphylococcus aureus*, media Mannitol Salt Agar atau MSA (Merck), media Mueller Hilton Agar atau MHA (Oxoid), etanol 70%, akuades, kertas coklat, kapas dan spiritus. Adapun bakteri *Staphylococcus aureus* dan Media MSA

didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sedangkan media MHA didapatkan dari CV. Makmur Sejati Malang.

1.6 Prosedur Penelitian

1. Preparasi Rimpang Jeringau

Prosedur preparasi sampel, yaitu dipilih rimpang jeringau yang masih segar dan dipisahkan dari kotoran. Kemudian rimpang dicuci sampai bersih dan dipotong dengan ketebalan yang sama. Rimpang yang telah dipotong tidak dapat dibiarkan terlalu lama di udara terbuka.

2. Fermentasi Rimpang Jeringau

Fermentasi dilakukan dengan metode fermentasi alami berdasarkan (Adisty, 2016) dan (Widyasaputra, 2013) yang dimodifikasi. Rimpang jeringau yang telah dipotong ditimbang sebanyak 320 gram, kemudian dibiarkan dalam wadah tertutup selama 12 hari. Hasil fermentasi ditandai dengan melunaknya rimpang dan keluarnya bau khas rimpang jeringau yang sangat menyengat. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk menghindari rimpang jeringau menjadi busuk yang ditandai dengan terbentuknya jamur. Fermentasi rimpang jeringau di replikasi sebanyak 3 kali dan ditempatkan dalam wadah yang berbeda. Hasil fermentasi rimpang jeringau akan disortir untuk mendapatkan rimpang jeringau yang sesuai dengan kriteria.

3. Ekstraksi Hasil Fermentasi Rimpang Jeringau

Ekstraksi yang dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi cara basah berdasarkan pada (Rifkowaty, 2016) hasil dari fermentasi rimpang jeringau

dihaluskan, kemudian ditimbang sebanyak 60 gram. Ekstraksi dilakukan secara modifikasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:8. Maserasi dilakukan dengan pengadukan secara kontinyu selama 24 jam pada suhu ruang. Ekstrak yang dihasilkan kemudian disaring menggunakan pompa vakum, setelah itu dipekatkan yaitu dengan menguapkan pelarut di atas penangas air suhu 60⁰C, atau dapat juga menggunakan *rotary evaporator*.

Rendemen ditandai dengan hasil akhir dari serangkaian proses pengolahan. Rendemen dapat dihitung dengan pembagian antara berat akhir dibagi dengan berat awal dikalikan 100% (Rifkowaty, 2016).

$$\frac{\text{bobot akhir ekstrak hasil fermentasi rimpang jeringau}}{\text{bobot awal rimpang jeringau}} \times 100\%$$

4. Identifikasi senyawa fitokimia

Uji identifikasi senyawa flavonoid dilakukan menggunakan pereaksi Willstater/Sianidin. Hasil ekstraksi sebanyak 2mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 0.5mL HCl pekat dan 3-4 pita logam Mg. Adanya flavonoid ditandai dengan warna merah, orange, dan hijau tergantung pada struktur flavonoid yang terkandung dalam sampel (Kristanti, 2008). Menurut (Harbone, 1987), identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan cara 2mL hasil ekstrak ditambahkan NaOH 10%. Indikator adanya flavonoid ditandai dengan warna kuning, orange, merah.

Uji identifikasi senyawa tanin dilakukan berdasarkan pada Jones dan Kinghorn (2006), dalam (Simaremare, 2014). Ekstrak ditambahkan dengan 1mL larutan Fe(III) klorida 10%. Jika terbentuk warna biru tua, birukehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin. Selain itu, juga dilakukan identifikasi senyawa tannin berdasarkan Marliana, dkk 2005 dalam (Sari & Ayuchecaria,

2017) dengan cara menambahkan 1% gelatin terhadap 3 mL larutan uji. Positif tanin jika terbentuk endapan.

Uji identifikasi senyawa alkaloid dilakukan dengan cara ekstrak ditambahkan 2mL HCl dan 4 mL methanol yang kemudian dipanaskan dan disaring. Hasil penyaringan kemudian dibagi menjadi 3 tabung reaksi. Tabung reaksi pertama ditambahkan pereaksi Meyer. Tabung reaksi kedua ditambahkan pereaksi Dragendrof. Tabung reaksi ketiga ditambahkan pereaksi Wagner. Adanya senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada tabung reaksi yang pertama dan timbulnya endapan warna coklat kemerahan pada tabung reaksi kedua dan ketiga (Kristanti, 2008).

5. Pembuatan Suspensi *Staphylococcus aureus*

Larutan baku McFarland terdiri atas dua komponen, yaitu larutan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL dicampur dengan larutan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 mL dan dikocok homogen sampai terbentuk larutan yang keruh (Bempa, 2016). Kultur bakteri diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 580-630nm (*Staphylococcus aureus*) (Khudry, 2014). Nilai absorban larutan baku harus berada dikisaran 0,08 sampai dengan 0,13. Larutan baku McFarland 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel bakteri dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Kekeruhan ini yang akan dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji (Bempa, 2016).

Pengujian aktivitas ekstraksi rimpang jeringau terfermentasi terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dilakukan dengan metode difusi sumuran. Tahapan awal yang dilakukan yakni media nutrient agar miring ditanamkan bakteri uji dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C, kemudian koloni bakteri uji yang

telah terbentuk di ambil dengan jarum ose dan disuspensikan dengan cara dimasukkan ke dalam tabung berisi 10 ml NaCl 0,9% steril. Suspensi yang terbentuk disetarakan dengan standar Mc. Farland no.0,5 yaitu 1.5×10^8 sel bakteri/ml (Aseng, 2015).

6. Uji antibakteri

Tahapan berikutnya suspensi yang telah disiapkan dengan mengikuti standar 0,5 McFarland sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan dituangkan media Muller Hinton sebanyak 15 ml, campuran ini dihomogenkan dengan cara digoyang-goyang dan media dibiarkan memadat. Bor dengan diameter 10 mm yang telah disterilkan digunakan untuk membuat sumur pada media agar. Pada sumur ini akan diisi hasil ekstraksi rimpang jeringau terfermentasi sebanyak 0.5g. Setelah seluruh proses selesai, semua cawan petri tersebut dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Zona hambat yang tampak pada setiap agar, kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong (Aseng, 2015).

1.7 Analisis Data

Data yang dihasilkan pada penelitian ini bersifat deskriptif. Analisis data dilakukan dengan membandingkan diameter zona hambat yang dihasilkan pada penelitian menggunakan pembanding, yaitu standart klasifikasi daya hambat antibakteri sebagai pembanding menurut (Fajeriyati dan Andika, 2017). Respon hambat *Staphylococcus aureus* yang telah diberikan agen antibakteri yaitu ekstrak hasl fermentasi rimpang jerngau dapat diklasifiasikan dalam kategori lemah, sedang, kuat, dan sangat kuat.