

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang dari tanaman bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang diperoleh dari daerah B2P2TOOT Tawangmangu, kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) diambil secara acak dengan memilih rimpang yang segar yang diperoleh dari daerah B2P2TOOT, Tawangmangu, kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Rimpang bangle yang diambil adalah rimpang dengan bentuk hampir bundar sampai jorong atau tidak beraturan dengan tebal 2-5 mm. Permukaan luar tidak rata, warnanya coklat muda kekuningan, bila dibelah berwarna kuning muda sampai kuning kecoklatan.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasi kedalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang biasanya diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel kendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir dan perlu ditetapkan kualifikasinya, hasil yang didapatkan tidak menyebar dan dapat dilakukan peneliti lain secara tepat. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian.

**2.1 Variabel bebas.** Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan, fraksi air dari rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan konsentrasi 50%, 10%, 5%, dan 1%.

**2.2 Variabel kendali.** Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, kondisi laboratorium (antara lain: kondisi inkasi, alat, dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, tempat tumbuh tanaman, waktu panen, dan metode ekstraksi.

**2.3 Variabel tergantung.** Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* pada media uji.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) adalah tanaman yang diambil dari B2P2TOOT Tawangmangu, kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, dengan memilih rimpang yang sudah siap dipanen dan dipilih rimpang yang masih segar.

Kedua, serbuk rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) adalah rimpang yang diambil kemudian dicuci pada air mengalir untuk membersihkan kotoran yang masih menempel setelah itu dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C, setelah kering digiling dan dibuat serbuk lalu diayak dengan menggunakan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) adalah hasil ekstraksi dari serbuk rimpang bangle yang diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah ekstrak dari etanol rimpang bangle yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan sebagai pelarut non polar.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksinasi dari bagian air fraksi *n*-heksan dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar.

Keenam, fraksi air dari rimpang bangle adalah hasil fraksinasi dari residu fraksi etil asetat.

Ketujuh, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah bakteri uji dalam penelitian ini yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.

Kedelapan, *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* adalah bakteri uji dalam penelitian ini yang resisten terhadap antibiotik oksasilin dan sefoksitin dan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.

Kesembilan, uji aktivitas antibakteri adalah uji dengan menggunakan metode difusi yang digunakan untuk mengukur luas daerah hambatan yaitu daya hambat yang menghambat pertumbuhan bakteri dengan menggunakan berbagai konsentrasi yaitu 50%, 10%, 5%, dan 1%, kontrol positif (+) yang digunakan adalah antibiotik vankomisin dan kontrol negatif (-) menggunakan larutan CMC Na 0,5%.

### **C. Bahan dan Alat**

#### **1. Bahan**

Bahan sampel yang digunakan dalam uji mikrobiologi antibakteri adalah rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang masih segar. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Vogel Johnson Agar* (VJA) dan plasma nitrat.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%, *n*-heksan, etil asetat, aquadestilata, HCl, FeCl<sub>3</sub> 1%, CMC Na 0,5%, kalium tellurite, larutan Mayer, larutan Dragendorff, hidrogen peroksida, asetat anhidrida, asam sulfat pekat, asam asetat pekat, cat kristal violet, larutan lugol, iodine, safranin, amoksisilin, kloroform, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, larutan Lieberman bouchard, dan larutan standar Mc Farland 0,5.

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, diperoleh

dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

## **2. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat timbang analisa merk *oxon* yang mempunyai ketelitian baca minimum 0,1 mg dan daya muat maksimal 100 gr, ayakan nomor 40, *moisture balance*, tabung reaksi pyrex, gelas ukur pyrex, corong kaca, *beaker glass* pyrex, jarum ose, batang pengaduk, labu takar pyrex, corong pisah, gelas arloji, kapas lidi steril, cawan petri, *object glass*, *deg glass*, kain flanel, kertas karton, kertas koran, vial, pipet tetes, pipet volume pyrex, *micropipete*, *syring*, pinset, pembakar spiritus, seperangkat alat *sterling-bidwell* seperangkat alat maserasi, seperangkat alat *rotary evaporator* merk Ika IVR 10, inkubator, blender, *autoclave*, oven, dan mikroskop.

## **D. Jalannya Penelitian**

Rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) diambil yang masih segar. Kemudian dicuci bersih dan dilanjutkan ke tahap pengeringan bahan dan dilakukan pembuatan ekstrak dan fraksi.

### **1. Determinasi tanaman**

Tahapan pertama dalam penelitian ini adalah dengan mengidentifikasi rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman bangle sesuai dengan kepustakaan yang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret. Determinasi ini bertujuan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya dengan tanaman lain.

### **2. Pengumpulan bahan**

Rimpang bangle yang masih segar diambil dari daerah B2P2TOOT, Tawangmangu, kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Rimpang dibersihkan dari kotoran, kemudian mengeringkan rimpang dengan menggunakan oven pada suhu 50°C. Pembuatan serbuk rimpang bangle menggunakan alat penggiling dan diayak

dengan ayakan nomor mess 40, sehingga didapatkan serbuk rimpang bangle yang diinginkan (Depkes 1985).

### **3. Pengeringan dan pembuatan serbuk**

Pembuatan serbuk rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan cara mencuci rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada rimpang, kemudian mengiris rimpang secara melintang dengan ketebalan antara 3 mm sampai 6 mm kemudian menimbang rimpang, setelah itu mengeringkan rimpang dengan cara di oven pada suhu 50°C. Rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang sudah kering, dilakukan penyerbukan dengan menggunakan alat penyerbuk kemudian mengayak rimpang dengan menggunakan ayakan nomor 40 sehingga diperoleh serbuk yang mempunyai derajat kehalusan yang relatif homogen. Pembuatan serbuk bertujuan untuk memperbesar luas permukaan antara cairan penyari dengan serbuk (Depkes 1985).

### **4. Pembuatan ekstrak etanol rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)**

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara remaserasi, pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Menimbang serbuk rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebanyak 500 gram, kemudian memasukkan serbuk ke dalam botol coklat, kemudian menambah dengan pelarut etanol 96% sebanyak 5 L. Enam jam pertama sesekali digojog, diamkan 18 jam. Setelah 18 jam saring menggunakan kain flanel. Ulangi proses penyaringan sekurang-kurangnya satu kali dengan cara yang sama yaitu ampas ditambahkan pelarut 96% sebanyak 5 L. Hasil ekstrasi digabungkan, kemudian dilakukan pemekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental (Kemenkes 2013). Skema pembuatan ekstrak dapat dilihat pada Gambar 4.

### **5. Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)**

Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Menimbang serbuk dan ekstrak sebanyak 2 gram dan dilakukan pengukuran kadar pada suhu 105°C, kemudian ditunggu sampai alat berbunyi

yang menandakan hasil analisa telah selesai. Penetapan susut pengeringan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Susut pengeringan akan memenuhi syarat apabila susut pengeringan suatu serbuk simplisia dan ekstrak tidak boleh lebih dari 10% (Depkes 1985).

#### **6. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak**

Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak menggunakan alat *sterling-bidwell* dengan cara menimbang serbuk dan ekstrak sebanyak 10 gram, masukkan serbuk dalam labu destilasi dan menambahkan pelarut toluen jenuh air kurang lebih 200 mL sampai terendam, kemudian memasang alat *sterling-bidwell* dan memanaskan dengan menggunakan pembakar spiritus. Pemanasan dihentikan jika pada penampung tidak menetes lagi dan dilanjutkan dengan mengukur kadar air dengan melihat volume pada skala alat (Depkes 2008). Penetapan kadar air serbuk dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

#### **7. Uji bebas etanol**

Uji bebas etanol dilakukan dengan uji esterifikasi etanol dengan memanaskan larutan  $H_2SO_4$  dan  $CH_3COOH$  kemudian, uji bebas etanol ditandai dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol (Rissa *et al* 2017). Ekstrak diuji etanolnya untuk mengetahui apakah ekstrak rimpang bangle benar-benar bebas dari etanol, karena jika masih mengandung etanol dikhawatirkan etanol ikut dalam menghambat pertumbuhan bakteri karena etanol memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri.

#### **8. Pembuatan fraksi *n*-Heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air ekstrak etanol rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)**

Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang ekstrak sebanyak 10 gram rimpang bangle kemudian dilarutkan dengan pelarut etanol 96% kurang lebih 5 mL kemudian ditambah dengan pelarut air sebanyak kurang lebih 70 mL, difraksi 3 kali dengan pelarut *n*-heksan sebanyak 75 mL dalam corong pisah, dikocok perlahan sampai kedua fase memisah. Fraksi *n*-heksan yang didapat dipisahkan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Residu yang didapat dilanjutkan ekstraksi dengan menggunakan pelarut etil asetat 75 mL sebanyak 3 kali. Fraksi

etil asetat yang didapat dipisahkan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Fraksi air dipekatkan dengan *rotary evaporator* (Sari 2018).

## 9. Pengujian kandungan kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.). Identifikasi senyawa flavonoid, alkaloid, dan tanin, dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

**9.1 Identifikasi flavonoid.** Melarutkan ekstrak sebanyak 0,5 gram dengan aquadest kemudian, mendidihkan selama 5 menit dan menyaring larutan. Menambahkan filtrat dengan 0,5 mg bubuk Mg, 1 mL HCl pekat, dan amil alkohol. Campurkan dan kocok kuat-kuat kemudian biarkan memisah. Reaksi positif ditandai dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harborne 1987).

**9.2 Identifikasi alkaloid.** Melarutkan ekstrak sebanyak 0,5 gram dengan aquadest, kemudian menambahkan 1 mL HCl 2N dibagi dalam 2 tabung. Menambah reagen Mayer pada tabung 1 yang kemudian akan membentuk endapan menggumpal putih kekuningan. Menambah reagen dragendorff pada tabung 2 yang akan membentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Harborne 1987).

**9.3 Identifikasi tanin.** Menambah ekstrak sebanyak 0,5 gram dengan aquadest sampai terendam dan memanaskan selama 3 sampai 5 menit kemudian mereaksikan dengan menambahkan  $\text{FeCl}_3$ . Perubahan warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Harborne 1987).

**9.4 Identifikasi steroid/triterpenoid.** Identifikasi steroid dilakukan dengan cara menimbang 0,05 mg bahan uji, kemudian memasukkan kedalam tabung reaksi dan menambahkan 2 ml kloroform, 10 tetes anhidrida asetat dan 3 tetes asam sulfat pekat. Hasil positif mengandung triterpenoid apabila terbentuk larutan warna jingga dan ungu untuk pertama kali yang kemudian mengalami perubahan warna menjadi biru dan hijau jika mengandung steroid (Harborne 1987).

## 10. Sterilisasi

Sterilisasi inkas dilakukan dengan cara menggunakan formalin, media yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat dari gelas disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 170°C selama 1-2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan cara pemanasan api langsung (Suriawirin 1985).

## 11. Isolasi dan Identifikasi bakteri

### 11.1 Isolasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Mengisolasikan suspensi dari *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada media selektif VJA, yang sudah ditambahkan 3 tetes kalium tellurite 3% dan menginkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan adanya warna hitam pada koloni dan warna medium disekitar koloni kuning. Hal ini disebabkan karena bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat memfermentasi manitol menjadi asam dan warna hitam disekitar koloni disebabkan karena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat mereduksi kalium tellurite (Radji 2011).

### 11.2 Isolasi bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*.

Suspensi dari *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* diisolasikan pada media selektif VJA, yang sudah ditambahkan 3 tetes kalium tellurite 3% dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan adanya warna hitam pada koloni dan warna medium disekitar koloni kuning. Hal ini disebabkan karena bakteri *Staphylococcus aureus* yang resisten dapat memfermentasi manitol menjadi asam dan warna hitam disekitar koloni disebabkan karena *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dapat mereduksi kalium tellurite.

### 11.3 Identifikasi bakteri.

**11.3.1 Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat

utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordan), Gram C (etanol:aseton ~ 1:1 sebagai peluntur), Gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup). Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara, membuat preparat ulas yang sudah difiksasi kemudian ditetesi dengan Gram A sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan keringkan, kemudian ditetesi dengan Gram B yang berisi lugol iodine sebagai mordan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan keringkan, selanjutnya preparat dilunturkan dengan Gram C diamkan kurang lebih 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan keringkan, terakhir preparat ditetesi Gram D diamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan keringkan. Bakteri positif apabila berwarna ungu, bulat dan bergerombol seperti buah anggur saat diamati dibawah mikroskop.

### **11.3.2 Identifikasi bakteri dengan uji katalase dan uji koagulase.**

**Uji katalase** dengan menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada medium nutrisi cair ditambahkan dengan 2 tetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk oksigen dan gelembung udara (Radji 2011).

**Uji koagulase.** Uji koagulase dibuat dengan cara menyiapkan plasma kelinci dan asam sitrat yang telah diencerkan 1:5 ditambah 1 ose biakan bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-4 jam. Hasil positif jika terjadi penggumpalan pada tabung reaksi, dan bila dibalik gumpalan plasma tidak terlepas atau tetap melekat pada dinding tabung (Radji 2011).

**11.3.3 Identifikasi bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik vankomisin, oksasilin dan sefoksitin.** Identifikasi dilakukan dengan cara metode difusi agar *Kirby-Bauer*. Prinsip dari metode ini adalah penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme, yaitu zona hambatan terlihat sebagai daerah jernih di sekitar kertas cakram yang mengandung zat antibakteri. Metode difusi dilakukan dengan cara mencelupkan kapas lidi steril pada suspensi yang sudah dibuat dan ditekan-tekan pada dinding tabung, diratakan pada media MHA. Media MHA yang telah digores bakteri, kemudian diletakkan cakram antibiotik vankomisin, oksasilin, dan sefoksitin. Media didiamkan selama 5-10 menit pada suhu ruang, agar agen antimikroba dapat

berdifusi pada media agar, kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil dapat dilihat dengan adanya area jernih yang menandakan adanya penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba. Zona hambat ditentukan dengan mengukur diameter area jernih kemudian dibandingkan dengan tabel *Interpretive Standart Kirby Bauer*.

## **12. Pembuatan suspensi bakteri uji**

**12.1 Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.** Bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diambil dari biakan murni pada media VJA, diambil kurang lebih 2 ose dan ditanam dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml media BHI, kekeruhannya disesuaikan dengan standar Mc Farland 0,5 yang dianggap setara dengan  $1,5 \times 10^8$  juta per ml. Tujuan disesuaikan suspensi bakteri dengan Mc Farland agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri pada saat pengujian. Suspensi diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Bonang dan Koeswandono 1982).

**12.2 Pembuatan suspensi bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*.** Bakteri uji diambil dari biakan murni pada media NA, diambil kurang lebih 2 ose dan ditanam pada 5 ml media BHI, homogenkan kemudian disamakan kekeruhannya dengan Mc Farland 0,5 yang setara dengan jumlah koloni  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml.

## **13. Pengujian aktivitas antibakteri**

**13.1 Pengujian aktivitas antibakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*.** Pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air rimpang bangle menggunakan metode difusi. Metode difusi bertujuan untuk mengetahui fraksi teraktif dari ekstrak rimpang bangle dan untuk mengetahui diameter zona hambat pertumbuhan dari biakan bakteri uji dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 50%, 10%, 5%, dan 1%. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA), diinokulasi dengan suspensi bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* secara merata dengan cara sterile swab, didiamkan kurang lebih 5 menit agar bakteri berdifusi ke media, kemudian dibuat sumuran dan

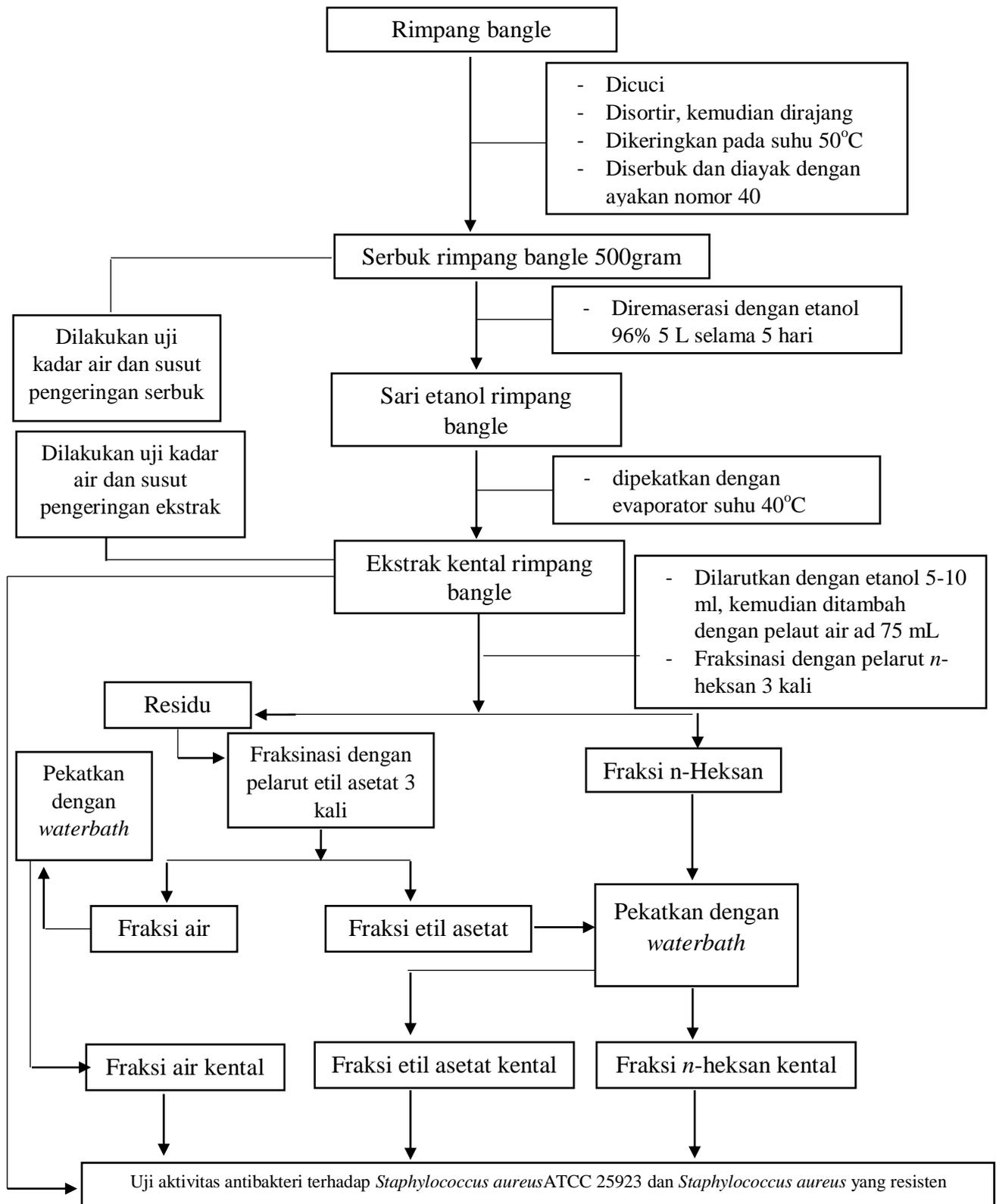
masing-masing sumuran dimasukkan sampel yang terdiri dari kontrol negatif (CMC Na 0,5%), ekstrak etanol rimpang bangle, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, dan kontrol positif vankomisin. Pengujian dilakukan tiga kali replikasi dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C, kemudian amati hasilnya. Ukur diameter zona hambat yang terlihat disekitar sumuran menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm). Pembacaan zona hambat minimal dalam skala milimeter (mm) dengan interpretasi sensitif bila zona hambat  $\geq 15$  mm dan resisten bila zona hambatnya  $\leq 14$  mm (WB Van Leeuwen 2003). Skema pengujian aktivitas antibakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Gambar 5.

**13.2 Pengujian aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.** Pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari rimpang bangle menggunakan metode difusi. Metode difusi bertujuan untuk mengetahui fraksi teraktif dari ekstrak rimpang bangle dan untuk mengetahui diameter zona hambat pertumbuhan dari biakan bakteri uji dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 50%, 10%, 5%, dan 1%. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah disiapkan, diinokulasikan dengan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara merata menggunakan kapas lidi yang sudah disterilkan, didiamkan kurang lebih 5 menit agar bakteri berdifusi ke media, kemudian dibuat sumuran dan masing-masing sumuran dimasukkan sampel yang terdiri dari kontrol negatif (CMC Na 0,5%), ekstrak etanol rimpang bangle, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, dan kontrol positif vankomisin. Pengujian dilakukan tiga kali replikasi dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian amati hasilnya. Ukur diameter zona hambat yang terlihat disekitar sumuran menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm). Rimpang bangle memiliki kandungan kimia sebagai antibakteri apabila sekitar sumuran tidak ditumbuhi bakteri, sehingga menandakan bahwa rimpang bangle memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Skema

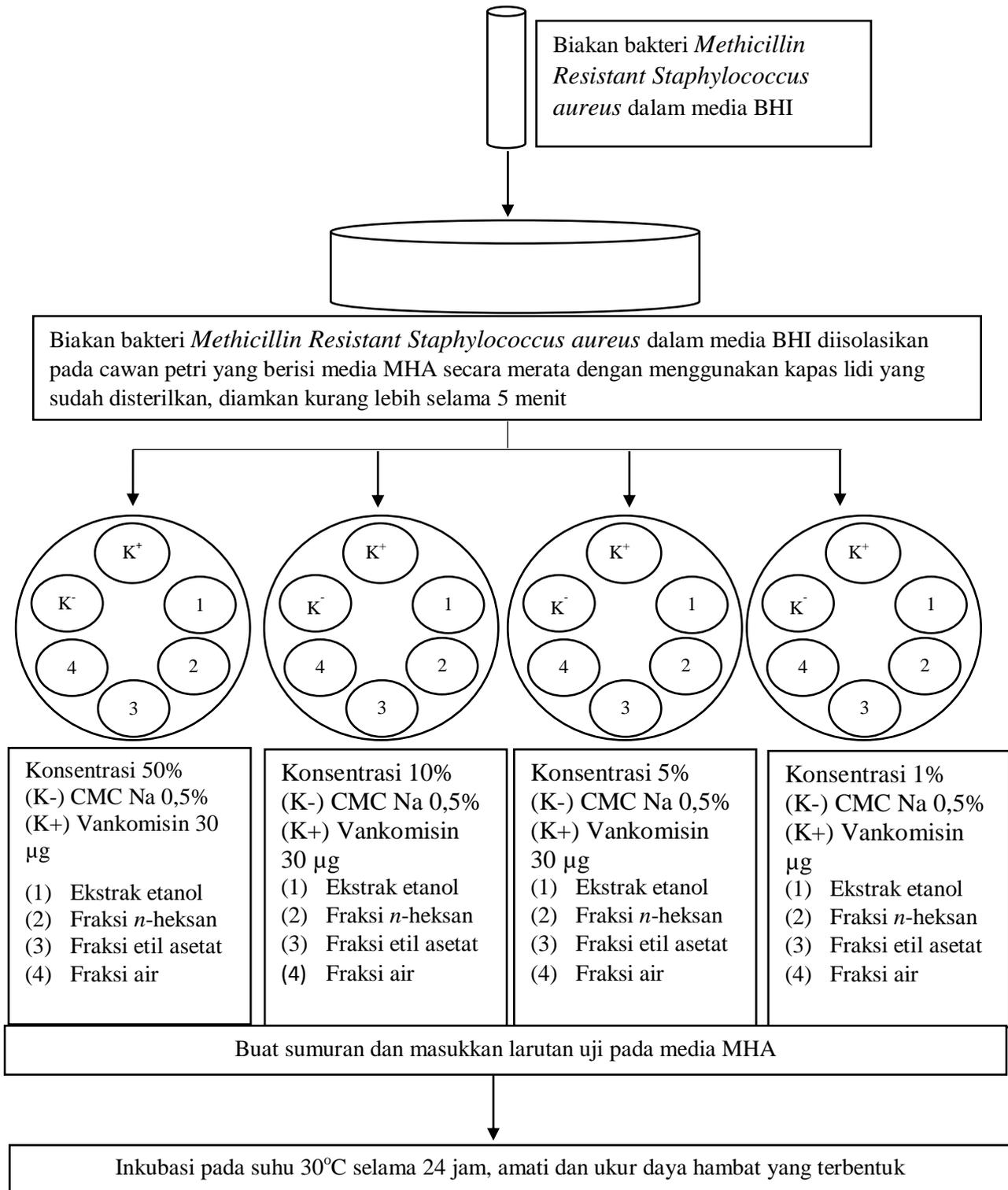
pengujian aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada Gambar 6.

### **E. Analisis Hasil**

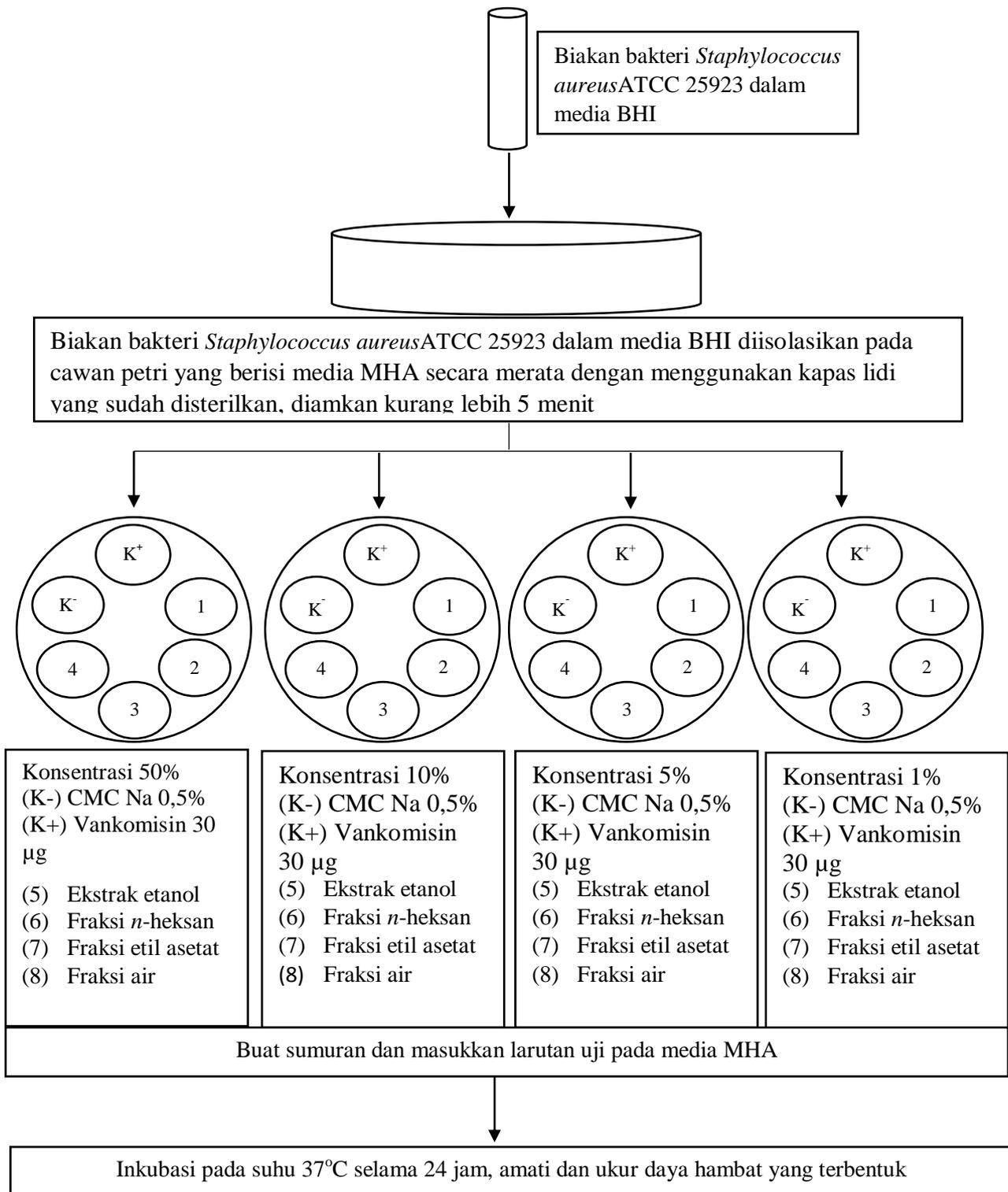
Analisis hasil yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* pada cawan petri. Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan *Kolmogorov Smirnov*, jika terdistribusi secara normal kemudian dilanjutkan dengan *analysis of varian* (ANOVA) satu jalan menggunakan software SPSS 17, jika tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan uji Kruskal-Wallis. Tujuan analisa menggunakan software tersebut untuk mengetahui apakah terdapat beda nyata atau tidak diameter hambat antara ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol 96% rimpang bangle dalam berbagai konsentrasi serta kontrol positif dan kontrol negatif.



**Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi rimpang bangle**



**Gambar 5.** Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*



**Gambar 6.** Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923