

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 1. Hasil determinasi rimpang bangle

Determinasi tanaman merupakan langkah awal yang penting dalam melakukan penelitian berupa sampel tanaman. Determinasi tanaman bertujuan untuk mengetahui kebenaran sampel tanaman yang akan digunakan penelitian dengan cara mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman dengan pustaka acuan, mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta mencegah tercampurnya bahan dengan tanaman yang lainnya. Determinasi rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Hasil determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr.: 1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-74a-75b-76b-333b-334b-335b-336a-337b-338a-339b-340a \_\_\_\_\_ 207. Zingiberaceae  
1a-2b-6a \_\_\_\_\_ 1. *Zingiber*  
1a-2b-6a-7a \_\_\_\_\_ *Zingiber cassumunar* Roxb.

Surat keterangan determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

#### 2. Hasil pencucian, penyiapan dan pembuatan serbuk rimpang bangle

Rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang telah dicuci, disortasi, didapatkan 10kg rimpang bangle, dikeringkan dalam oven suhu 50°C selama 7 hari. Proses pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, sehingga dapat mencegah penurunan mutu simplisia. Rimpang bangle yang sudah kering ditandai dengan mudah patahnya rimpang ketika dipatahkan, kemudian setelah kering simplisia digiling hingga halus dan diayak dengan menggunakan ayakan no 40. Pembuatan serbuk dan pengayakan bertujuan untuk mempermudah proses ekstraksi karena semakin kecil ukuran serbuk maka akan semakin besar luas permukaan sehingga proses penyarian akan semakin efektif. Tabel 1 menunjukkan

hasil rendemen simplisia dan perhitungan rendemen simplisia dapat dilihat pada lampiran 3.

**Tabel 1. Rendemen berat kering terhadap berat basah rimpang bangle**

Sampel	Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (%)
Rimpang bangle	10000	840	8,4%

### 3. Hasil penetapan kadar air serbuk rimpang bangle

Penetapan kadar air serbuk rimpang bangle dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali. Penetapan kadar air serbuk rimpang bangle bertujuan untuk memberikan batasan maksimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan (Depkes 2000). Penetapan kadar air rimpang bangle dimaksudkan agar rimpang bangle dapat terjaga kualitas dan khasiatnya, persyaratan kadar air suatu serbuk simplisia adalah tidak boleh lebih dari 10% (Depkes 2008). Hasil penetapan kadar air serbuk rimpang bangle dapat dilihat pada tabel 2 dan lampiran 4.

**Tabel 2. Hasil penetapan kadar air serbuk rimpang bangle**

No.	Bobot serbuk (gram)	Volume terukur (mL)	Kadar air (%)
1.	20,0165	1,2	6
2.	20,0128	1,3	6,5
3.	20,0105	1,2	6
Rata-rata			6,2

Hasil perhitungan penetapan kadar air serbuk rimpang bangle rata-rata sebesar 6,2% hal ini menunjukkan bahwa serbuk rimpang bangle memenuhi persyaratan kadar air karena kurang dari 10%. Kadar air harus dibawah 10% karena akan mencegah pertumbuhan jamur dan mikroorganismen lain yang dapat merusak bahan uji.

### 4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk rimpang bangle

Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk mengetahui hasil dari serbuk rimpang bangle yang diperoleh memenuhi persyaratan sesuai dengan standart yang telah ditetapkan dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Tujuan susut pengeringan untuk memberikan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk rimpang bangle dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk rimpang bangle**

No.	Bobot awal serbuk (gram)	Berat akhir serbuk (gram)	Susut pengeringan (%)
1.	2,01	1,84	8,9
2.	2,00	1,81	9,4
3.	2,00	1,82	9,5
Rata-rata			9,27%

Hasil perhitungan susut pengeringan serbuk rimpang bangle rata-rata sebesar 9,27% hal ini menunjukkan bahwa serbuk rimpang bangle memenuhi persyaratan kurang dari atau sama dengan 10% (Depkes 2008).

### 5. Hasil pembuatan ekstrak etanol rimpang bangle

Ekstrak rimpang bangle yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi remaserasi. Rimpang bangle sebanyak 500 gram ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 5 L (1:10). Enam jam pertama sesekali digojog, diamkan 18 jam. Setelah 18 jam saring menggunakan kain flanel. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan cara yang sama yaitu ampas ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 2,5 L (Kemenkes 2013).

Hasil ekstraksi diuapkan menggunakan *vacum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Pemekatan bertujuan untuk memisahkan antara pelarut dengan senyawa aktif rimpang bangle. Pemekatan bertujuan agar komponen fitokimia dalam ekstrak tidak mengalami kerusakan akibat pemanasan yang berlebihan. Hasil rendemen ekstran rimpang bangle dapat dilihat pada tabel 4 dan lampiran 3.

**Tabel 4. Rendemen ekstrak rimpang bangle**

Sampel	Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Serbuk rimpang bangle	500,0025	149,2401	29,85%

Hasil rendemen ekstrak rimpang bangle sudah sesuai dengan persyaratan, dimana syarat rendemen dari ekstrak rimpang bangle sesuai dengan pedoman adalah tidak kurang dari 25% (Depkes 2008).

### 6. Hasil penetapan kadar air ekstrak rimpang bangle

Penetapan kadar air ekstrak rimpang bangle dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali. Penetapan kadar air ekstrak rimpang bangle bertujuan untuk memberikan batasan

maksimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan (Depkes 2000). Penetapan kadar air ekstrak rimpang bangle dimaksudkan agar ekstrak rimpang bangle dapat terjaga kualitas dan khasiatnya, persyaratan kadar air ekstrak rimpang bangle adalah tidak boleh lebih dari 10% (Depkes 2008). Hasil penetapan kadar air ekstrak rimpang bangle dapat dilihat pada tabel 5 dan lampiran 5.

**Tabel 5. Hasil penetapan kadar air ekstrak rimpang bangle**

No.	Bobot ekstrak (gram)	Volume terukur (mL)	Kadar air (%)
1.	20,0524	1,2	5,9
2.	20,0789	1,6	7,9
3.	20,4873	1,8	8,7
Rata-rata			7,5%

Hasil perhitungan penetapan kadar air ekstrak rimpang bangle rata-rata sebesar 7,5% hal ini menunjukkan bahwa ekstrak rimpang bangle memenuhi persyaratan kadar air karena syarat kadar air dari ekstrak rimpang bangle kurang dari 10%. Pengujian kadar air ekstrak bertujuan untuk mencegah tumbuhnya jamur dan mikroba lain pada ekstrak, sehingga kualitas ekstrak dan khasiatnya tetap terjaga, dan tidak menimbulkan kontaminasi pada saat pengujian antibakteri.

#### **7. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak rimpang bangle**

Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk mengetahui hasil dari ekstrak rimpang bangle yang diperoleh memenuhi persyaratan sesuai dengan standart yang telah ditetapkan dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Tujuan susut pengeringan untuk memberikan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang pada proses pembuatan ekstrak. Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak rimpang bangle dapat dilihat pada tabel 6.

**Tabel 6. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak rimpang bangle**

No.	Bobot awal ekstrak (gram)	Berat akhir ekstrak (gram)	Susut pengeringan (%)
1.	2,05	1,83	9,4
2.	2,06	1,86	9,8
3.	2,03	1,85	9,9
Rata-rata			9,7%

Hasil perhitungan susut pengeringan ekstrak rimpang bangle rata-rata sebesar 9,7% hal ini menunjukkan bahwa ekstrak rimpang bangle memenuhi persyaratan kurang dari atau sama dengan 10% (Depkes 1986).

## 8. Hasil pengujian bebas etanol

Hasil pengujian bebas etanol menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang bangle sudah bebas dari pelarutnya, yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol. Tabel 7 menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang bangle bebas dari etanol.

**Tabel 7. Hasil uji bebas etanol ekstrak rimpang bangle**

Prosedur	Hasil	Pustaka
Ekstrak+CH <sub>3</sub> COOH+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> dipanaskan	Tidak tercium bau ester yang khas etanol	Tidak tercium bau ester yang khas etanol

## 9. Hasil fraksinasi ekstrak etanol rimpang bangle

Ekstrak etanol rimpang bangle yang di dapat dari hasil maserasi kemudian ditimbang sebanyak kurang lebih 10 gram lalu difraksinasi dengan menggunakan corong pisah dengan metode ekstraksi cair-cair. Tujuan fraksinasi untuk memisahkan senyawa-senyawa yang nonpolar, semi polar, dan polar (Tengo *et al* 2013). Prinsip kerja dari fraksinasi yaitu adanya kesetimbangan senyawa antara dua pelarut yang tidak saling bercampur. Fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air. Sifat pelarut *n*-heksan yaitu nonpolar yang diharapkan dapat melarutkan senyawa-senyawa seperti terpenoid dan minyak atsiri secara maksimal. Pelarut etil asetat merupakan pelarut semi polar yang dapat melarutkan senyawa saponin, flavonoid, tanin, minyak atsiri, dan glikosida. Pelarut air merupakan pelarut polar yang dapat melarutkan senyawa tanin, flavonoid, dan alkaloid (Artini *et al* 2013). Data hasil rendemen fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat dapat dilihat pada tabel 8 dan lampiran 3.

**Tabel 8. Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol rimpang bangle**

Replikasi	Berak ekstrak (gram)	Berat fraksi (gram)		
		<i>n</i> -Heksan	Etil Asetat	Air
1	10,0254	0,1183	0,1438	0,5290
2	10,5612	0,2247	0,7799	1,1906
3	10,0495	1,3734	1,7472	2,0632
4	10,0345	1,3567	1,6549	2,0967
5	10,2739	1,4023	1,8302	2,0978
6	10,2906	1,4113	1,7790	2,2089
7	10,1703	1,2900	1,3409	2,1980
Total	71,4054	7,1767	9,2759	12,3842
	Rendemen	10,05%	12,99%	17,34%

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan tiga pelarut yang berbeda yaitu *n*-Heksan, etil asetat, dan air. Hasil fraksinasi yang diperoleh adalah fraksi *n*-Heksan sebesar 7,1767 gram dengan rendemen 10,05%. Fraksi etil asetat

diperoleh hasil sebesar 9,2759 gram dengan rendemen 12,99%, dan hasil fraksi air yang diperoleh sebesar 12,3842 gram dengan nilai rendemen sebesar 17,34%. Nilai rendemen hasil fraksinasi yang didapatkan berbeda-beda. Nilai rendemen paling tinggi diperoleh pada fraksi air, hal ini disebabkan karena senyawa dari rimpang bangle banyak yang bersifat semipolar dan polar, pada fraksi air senyawa polar maupun semipolar dapat tertarik sehingga pada fraksi air hasil rendemen tinggi.

#### 10. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak

Identifikasi kandungan senyawa dilakukan untuk mengetahui kebenaran senyawa yang terkandung dalam serbuk dan ekstrak rimpang bangle. Serbuk dan ekstrak rimpang bangle dilakukan dengan uji kualitatif menggunakan pereaksi warna untuk mengetahui kandungan flavonoid, alkaloid, tanin, dan steroid/terpenoid. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak, dan fraksi rimpang bangle dapat dilihat pada tabel 9 dan lampiran 6 dan 7.

**Tabel 9. Hasil identifikasi kandungan senyawa**

Senyawa	Pereaksi	Hasil identifikasi		Pustaka	Kesimpulan	
		Serbuk	Ekstrak		Serbuk	Ekstrak
Flavonoid	Serbuk Mg HCl pekat Amil alkohol	Kuning	Kuning	Orange, merah, kuning pada lapisan amil alkohol (Harborne 1996)	(+)	(+)
Alkaloid	Mayer	Endapan putih	Endapan putih	Endapan putih/kuning (Depkes 1980)	(+)	(+)
	Dragendorff	Endapan coklat	Endapan coklat	Endapan coklat-hitam (Depkes 1977)	(+)	(+)
Tanin	FeCl <sub>3</sub> 1%	Hijau kehitaman	Coklat kehitaman	Coklat kehitaman, hijau kehitaman (Edoga <i>et al.</i> 2005)	(+)	(+)
Triterpenoid/ Steroid	CH <sub>3</sub> COOH anhidrat CHCl <sub>3</sub> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Larutan berwarna ungu	Larutan berwarna ungu	Terbentuk warna jingga atau ungu jika mengandung triterpenoid	(+)	(+)
				Terbentuk larutan warna biru atau hijau jika	(-)	(-)

Senyawa	Pereaksi	Hasil identifikasi		Pustaka	Kesimpulan	
		Serbuk	Ekstrak		Serbuk	Ekstrak
				mengandung steroid (Harborne 1987).		
Keterangan:		(+) =	Mengandung senyawa			
		(-) =	Tidak mengandung senyawa			

Hasil identifikasi yang telah dilakukan menunjukkan bahwa serbuk dan ekstrak dari rimpang bangle mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, dan triterpenoid.

### 11. Hasil identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*

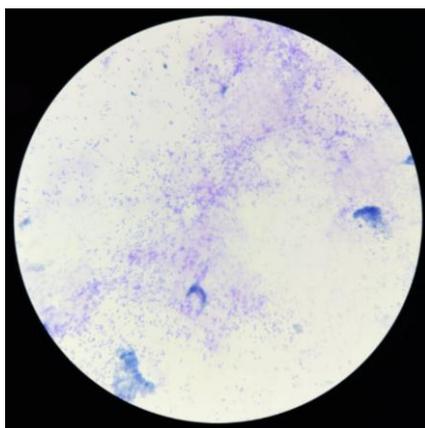
**11.1 Hasil identifikasi makroskopis.** Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, dari suspensi bakteri yang telah dibuat diinokulasikan pada media diferensial VJA yang telah ditambahkan kalium tellurite 3%, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ada penampakan koloni berwarna hitam dan warna media disekitar koloni berwarna kuning (Radji 2011). Perubahan media menjadi warna kuning disebabkan karena bakteri *Staphylococcus aureus* dapat memfermentasi manitol menjadi asam dan warna hitam pada koloni bakteri disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* dapat mereduksi kalium tellurite. Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* secara makroskopis dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Bakteri *Staphylococcus aureus* secara makroskopis

**11.2 Hasil identifikasi dengan pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram untuk memastikan bahwa bakteri tersebut golongan Gram positif. Hasil

identifikasi mikroskopis menunjukkan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* termasuk dalam golongan Gram positif, sel bakteri berwarna ungu dan bentuk *coccus* (bulat) bergerombol. Penetes kristal violet (Gram A) menyebabkan kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri Gram positif maupun negatif. Mekanisme kerja dari Gram A adalah karena Gram A bersifat basa dan alkalin (komponen kromoforiknya bermuatan positif), sedangkan sitoplasma bakteri bersifat basofilik (suka basa) terjadilah gaya tarik antara komponen kromofor pada pewarna dengan sel bakteri, sehingga sel bakteri berwarna ungu. Penetes mordant (*lugol's iodine*/Gram B) menyebabkan adanya ikatan CV dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri. Pada Gram positif dapat terbentuk CV iodine-ribonukleat pada dinding sel, sehingga pada penetes Gram C (alkohol 96%) zat warna dari Gram A (ungu) tidak akan luntur karena dinding sel mengalami dehidrasi, pori-pori menciut, daya rembes dinding sel dan membran menurun, dan pada saat penetes Gram D (safranin) zat warna tidak akan menempel pada dinding bakteri karena pada dinding bakteri sudah terbentuk warna ungu. Hasil pengecatan Gram yang dilakukan kemudian diamati dibawah mikroskop pada lensa obyektif dengan bantuan minyak imersi. Hasil pengamatan dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Bakteri *Staphylococcus aureus* dilihat dari mikroskop

**11.3 Identifikasi dengan cara uji katalase dan uji koagulase.** Hasil dari uji katalase pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* adalah positif yaitu terbentuk oksigen dan

gelembung pada deckglass. Fungsi uji katalase pada bakteri berbentuk kokus adalah untuk membedakan antara *Staphylococcus* dengan *Streptococcus*, dimana kelompok *Staphylococcus* bersifat katalase positif. Katalase merupakan enzim yang mengkatalisa penguraian hidrogen peroksida menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ . Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob pasti menguraikan bahan tersebut (Lay 1994). Hasil uji koagulase pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 maupun *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* adalah positif yaitu terjadi penggumpalan pada tabung reaksi, dan bila dibalik gumpalan plasma tidak terlepas. Uji koagulase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim koagulase. Koagulase merupakan enzim yang menyebabkan fibrin berkoagulasi dan menggumpal, sehingga enzim akan terakumulasi di sekitar bakteri sehingga agen pelindung inang kesulitan mencapai bakteri dan fagositosis terhambat. Koagulase merupakan kriteria yang paling umum digunakan untuk identifikasi sementara *Staphylococcus aureus* (Abrar 2001).



Gambar 9. Hasil uji katalase



Gambar 10. Hasil uji koagulase

**11.4 Identifikasi bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dengan metode Kirby-Bauer.** Uji sensitivitas pada bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dilakukan dengan membandingkan diameter zona hambat sesuai dengan tabel *Interpretive Standards Kirby Bauer*. Pada penelitian ini antibiotik yang digunakan untuk uji resistensi bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* adalah oksasilin, sefoksitin, dan vankomisin. Ketiga antibiotik tersebut digunakan dalam penelitian ini mengacu pada kategori yang

diberikan CLSI. Oksasilin dan sefoksitin merupakan antibiotik grup A, atau antibiotik yang harus diperiksa sensitivitasnya ketika ditemukan bakteri *Staphylococcus aureus*. Sementara vankomisin merupakan antibiotik grup B, yang harus diperiksa ketika terjadi resistensi terhadap golongan A (CLSI 2016). *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* diuji dengan menggunakan oksasilin, bukan metisilin, karena secara kimia oksasilin masih satu derivat dengan metisilin sehingga mempunyai mekanisme kerja yang sama yaitu menghambat sintesis dinding sel, namun oksasilin lebih tahan terhadap asam, dan metisilin telah lama tidak beredar di pasaran. Sefoksitin merupakan golongan sefalosporin generasi kedua yang juga digunakan untuk mendeteksi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, karena golongan sefalosporin memiliki mekanisme kerja dan struktur kimia yang hampir sama dengan golongan penisilin. Hasil uji sensitivitas *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada tabel 10.

**Tabel 10. Hasil uji sensitivitas *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin, dan vankomisin.**

Antibiotik	Diameter zona hambat (mm) <i>Staphylococcus aureus</i> yang resisten			Rata-rata $\pm$ SD
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	
Oksasilin	0	0	0	0 $\pm$ 0
Sefoksitin	0	0	0	0 $\pm$ 0
Vankomisin	22	21,57	21,78	21,78 $\pm$ 0,22

Dari hasil uji sensitivitas *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa antibiotik oksasilin dan sefoksitin tidak memberikan zona hambat terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Berdasarkan tabel *Interpretive Standards Kirby Bauer* bakteri dinyatakan resisten terhadap oksasilin jika memiliki zona hambat  $\leq 10$  mm dan resisten terhadap sefoksitin jika memiliki zona hambat  $\leq 21$  mm. Berdasarkan hasil tersebut maka diketahui bakteri uji yang digunakan resisten terhadap antibiotik oksasilin dan sefoksitin, tetapi masih menunjukkan sensitivitas terhadap antibiotik vankomisin. Hal ini membuktikan bahwa bakteri yang digunakan adalah *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Hasil uji sensitivitas bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin, dan vankomisin dapat dilihat pada Gambar 11.



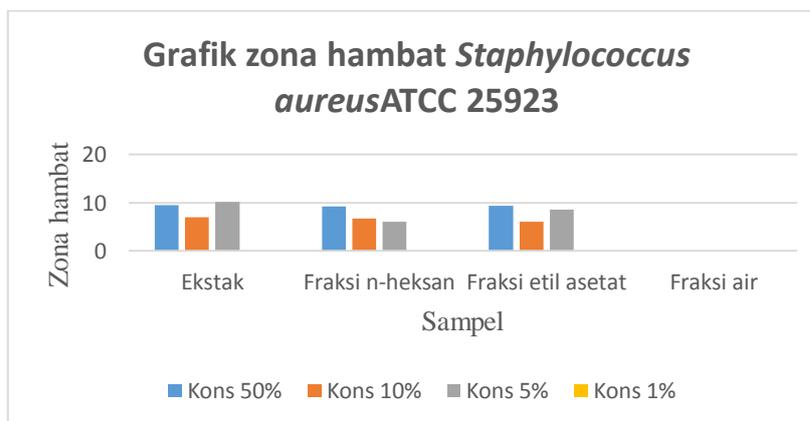
Gambar 11. Hasil uji sensitivitas *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin, dan vankomisin

## 12. Hasil pengujian aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* secara difusi.

Tujuan uji aktivitas antibakteri secara difusi yaitu untuk mengetahui diantara ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air yang mempunyai daya hambat paling besar terhadap bakteri uji. Pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi rimpang bangle terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* digunakan konsentrasi 50%, 10%, 5%, dan 1%. Kontrol positif yang digunakan adalah vancomycin 30 µg dan CMC Na 0,5% sebagai kontrol negatif. Diameter zona hambat pengujian aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada tabel 12 dan tabel 13. Grafik zona hambat bakteri dapat dilihat pada Gambar 11 dan 12.

**Tabel 11. Diameter zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25293**

Sampel	Konsentrasi (%)	Diameter zona hambat (mm)			Rata-rata ± SD
		Replikasi			
		I	II	III	
Ekstrak	50	8,75	8,00	11,91	9,53 ± 2,08
	10	7,70	6,50	6,64	6,94 ± 0,66
	5	0	9,10	11,28	10,19 ± 1,54
	1	0	0	0	0
Fraksi <i>n</i> -heksan	50	9,30	9,50	8,70	9,16 ± 0,42
	10	0	7,70	5,80	6,75 ± 1,34
	5	0	0	5,99	5,99
	1	0	0	0	0
Fraksi etil asetat	50	8,75	9,25	10,13	9,37 ± 0,69
	10	0	8,50	9,53	9,02 ± 0,73
	5	0	0	8,57	8,75
	1	0	0	0	0
Fraksi air	50	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	1	0	0	0	0
Vancomycin	30 µg	20	19,50	20,89	20,13 ± 0,70
CMC Na	0,5	0	0	0	0

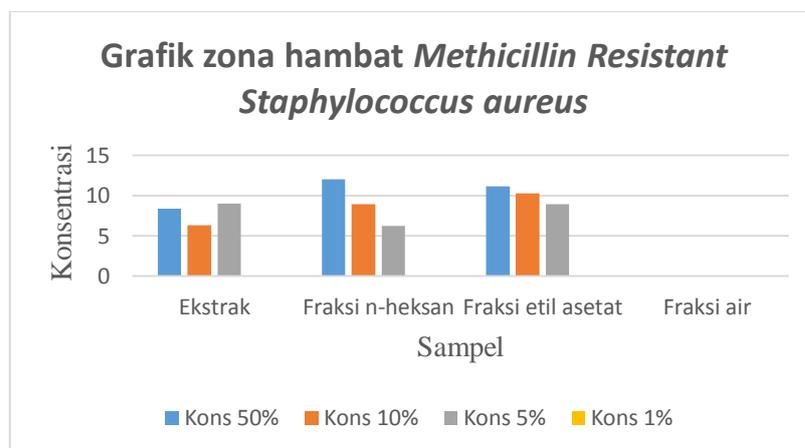


**Gambar 12. Grafik zona hambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air rimpang bangle terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan daya hambat, dibuktikan adanya daerah jernih disekitar sumuran yang tidak ditumbuhi bakteri. Hasil uji pada tabel 11 berdasarkan nilai rata-rata diameter zona hambat, menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki diameter zona hambat yang lebih besar terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibandingkan dengan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air, namun fraksi etil asetat mempunyai diameter zona hambat besar dibandingkan fraksi yang lainnya. Hasil rata-rata diameter zona hambat ekstrak etanol dengan konsentrasi 50%, 10, 5%, dan 1% berturut-turut adalah 9,53 mm, 6,94 mm, 10,19 mm, dan 0 mm, kemudian fraksi etil asetat dengan konsentrasi 50%, 10%, 5%, dan 1% berturut-turut adalah 9,37 mm, 9,02 mm, 8,75 mm, dan 0 mm. Kontrol positif (vancomycin) dosis 30 µg mempunyai nilai rata-rata zona hambat sebesar 20,13 mm. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi ini menggunakan kontrol negatif CMC Na 0,5% yang dalam pengujian ini tidak aktif menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dikarenakan CMC Na 0,5% diketahui tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri, sehingga dapat dipastikan daya hambat yang terbentuk bukan dari faktor teknis perlakuan.

**Tabel 12. Diameter zona hambat bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus***

Sampel	Konsentrasi (%)	Diameter zona hambat (mm)			Rata-rata ± SD
		Replikasi			
		I	II	III	
Ekstrak	50	8,00	7,85	9,30	8,38 ± 0,79
	10	6,64	8,90	3,45	6,33 ± 2,74
	5	0	9,00	9,10	9,05 ± 0,07
	1	0	0	0	0
Fraksi <i>n</i> -heksan	50	10,00	12,70	13,00	12,06 ± 1,65
	10	0	9,50	8,45	8,98 ± 0,74
	5	0	7,20	5,35	6,28 ± 1,31
	1	0	0	0	0
Fraksi etil asetat	50	0	13,00	9,39	11,20 ± 2,55
	10	0	11,00	9,57	10,29 ± 1,01
	5	0	6,00	11,86	8,93 ± 4,14
	1	0	0	0	0
Fraksi air	50	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	1	0	0	0	0
Vancomycin	30 µg	19,82	20,00	19,79	19,87
CMC Na	0,05	0	0	0	0

**Gambar 13. Grafik zona hambat *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus***

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air rimpang bangle terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* menunjukkan daya hambat, dibuktikan adanya daerah jernih disekitar sumuran yang tidak ditumbuhi bakteri. Hasil uji pada tabel 12 berdasarkan nilai rata-rata diameter zona hambat, menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksan memiliki diameter zona hambat yang lebih besar terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan ekstrak, fraksi etil asetat, dan fraksi air, namun fraksi etil asetat mempunyai diameter zona hambat besar bakteri dibandingkan ekstrak

dan fraksi air. Hasil rata-rata diameter zona hambat fraksi *n*-heksan dengan konsentrasi 50%, 10%, 5%, dan 1% berturut-turut adalah 12,06 mm, 8,98 mm, 6,28 mm, dan 0 mm, kemudian fraksi etil asetat dengan konsentrasi 50%, 10%, 5%, dan 1% memiliki zona hambat masing-masing sebesar 11,20 mm, 10,29 mm, 8,93 mm, dan 0 mm. Kontrol positif (vancomycin) dosis 30  $\mu\text{g}$  adalah 19,87 mm. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi ini menggunakan kontrol negatif CMC Na 0,5% yang dalam pengujian ini tidak aktif menghambat *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*.

Diameter zona hambat ekstrak lebih besar daripada diameter zona hambat fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan dikarenakan pada ekstrak masih terdapat banyak senyawa yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan pada fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan jumlah senyawa semakin sedikit dikarenakan pada proses fraksinasi senyawa yang terambil sesuai dengan polaritasnya salah satunya adalah flavonoid dan triterpenoid, sehingga peran senyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri kurang kuat dibandingkan dengan ekstrak.

Analisis data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi diuji dengan uji ANOVA *two way*. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, fraksi air dengan berbagai konsentrasi, kontrol positif, dan kontrol negatif pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* untuk mendapatkan hasil ada atau tidak perbedaan yang signifikan. Hasil uji distribusi data menggunakan *Kolmogorov smirnov* sebesar  $0,150 > 0,05$ , sehingga dapat disimpulkan bahwa data terdistribusi normal. Hasil uji *Levene's test* dari kedua bakteri memiliki nilai  $0,000 < 0,05$  menunjukkan keempat sampel dari kedua bakteri memiliki variansi yang berbeda. Hasil uji *Kruskal wallis* didapatkan nilai signifikansi sebesar  $0,063 < 0,05$ , maka keempat sampel dari kedua bakteri tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Analisis data ANOVA didapatkan hasil bahwa ekstrak dengan konsentrasi 5% paling efektif dalam menghambat pertumbuhan dari bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC

25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, karena dengan konsentrasi kecil mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan pada konsentrasi tersebut tidak ada beda signifikan dengan ekstrak, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-heksan dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari 5% yaitu konsentrasi 10% dan 50%. Hasil tabel analisis ANOVA *two way* dapat dilihat pada lampiran 15 dan 16.

Ekstrak dengan konsentrasi 5% lebih baik dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* kemungkinan dikarenakan senyawa yang terkandung dalam ekstrak rimpang bangle masih banyak seperti tanin, alkaloid, triterpenoid, dan flavonoid, sehingga kemampuan ekstrak dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* lebih besar. Flavonoid merupakan senyawa yang cenderung bersifat polar, kepolaran senyawa inilah yang mengakibatkan senyawa lebih mudah menembus dinding sel bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, oleh karena itu flavonoid terdapat pada ekstrak dan fraksi yang lebih polar yaitu fraksi etil asetat (Mangunwardoyo 2008).

Fraksi etil asetat dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 50% dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* sama dengan ekstrak dengan konsentrasi 5%, karena dari hasil analisis fraksi etil asetat dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 50% berada dalam satu subset yang sama dengan ekstrak konsentrasi 5% yang berarti tidak ada perbedaan yang signifikan, namun nilai pada fraksi etil asetat 5% lebih rendah daripada ekstrak konsentrasi 5%, sehingga ekstrak konsentrasi 5% lebih efektif dibanding fraksi etil asetat 5%. Hal ini terjadi karena fraksi etil asetat mampu menarik senyawa aktif antibakteri yang bersifat semi polar, seperti flavonoid, alkaloid, dan tanin. Alkaloid memiliki mekanisme kerja penghambatan dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel mikroorganisme terutama pada bakteri, sehingga lapisan dinding sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Nimah *et al* 2012). Tanin merupakan senyawa yang bersifat fenol yang mempunyai rasa sepat dan kemampuan menyamak kulit. Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang

berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan adhesin sel mikroba juga menginaktifkan enzim dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Sel bakteri menjadi lisis akibat tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati. Kompleksasi dari ion besi dengan tanin dapat menjelaskan toksisitas tanin. Mikroorganisme yang tumbuh di bawah kondisi aerobik membutuhkan zat besi untuk berbagai fungsi karena tanin mengikat kuat besi, termasuk reduksi prekursor ribonukleotida DNA (Priya 2014).

Fraksi *n*-heksan mempunyai diameter zona hambat yang besar dibanding fraksi etil dalam menghambat bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, dan memiliki diameter zona hambat yang kecil dibanding fraksi etil asetat dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, namun pada hasil analisis data fraksi *n*-heksan konsentrasi 10% dan 50% tidak ada perbedaan yang signifikan dengan fraksi etil asetat konsentrasi 5%, 10%, dan 50%, yang berarti fraksi *n*-heksan dengan konsentrasi 10% dan 50% memiliki aktivitas yang sama dengan fraksi etil asetat konsentrasi 5%, 10%, dan 50%. Besarnya diameter zona hambat terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* yang dihasilkan oleh fraksi *n*-heksan mungkin berkaitan dengan perubahan genetik yang terjadi pada bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. DNA pada bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* mendapatkan sisipan elemen SCC<sub>mec</sub> yang mengandung *mecA*, dimana gen *mecA* dapat menyandi PBP2 menjadi PBP2a yang afinitasnya rendah terhadap betalaktam. Perubahan genetik yang terjadi pada *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dan tidak terjadi pada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mungkin menyebabkan zat aktif dari fraksi *n*-heksan (triterpenoid) lebih mampu mengikat protein bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, berbeda dengan zat aktif pada fraksi etil asetat yang kemungkinan kurang mampu mengikat protein bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, sehingga diameter zona hambat yang dihasilkan lebih kecil. Mekanisme kerja dari terpenoid adalah bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer

yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang akan mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Cowan 1999).

Fraksi air tidak menghasilkan zona hambat karena sebagai yang terakhir senyawa-senyawa yang tersari sedikit, sehingga tidak memiliki aktivitas antibakteri. Air adalah penyari yang tidak beracun dan bersifat alami serta merupakan media yang cocok untuk pertumbuhan mikroba. Senyawa yang terdapat pada fraksi air tidak mampu mengikat protein bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 maupun *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, akibatnya reaksi transpeptidase dan transglikolase pada bakteri tidak terpengaruh, sehingga bakteri tetap dapat mensintesis dinding sel dan tetap hidup.

Berdasarkan tabel 11 dapat diketahui bahwa ekstrak etanol rimpang bangle aktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, hal ini juga ditunjukkan oleh penelitian yang lain. Penelitian Buldani (2017) dalam Seminar Nasional IPTEK Terapan yang berjudul Uji Efektivitas Ekstrak Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai Antibakteri Terhadap *Vibrio Cholerae* dan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* dengan Metode Difusi Cakram, menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang bangle yang diekstraksi dengan metode maserasi memiliki zona hambat sebesar 10,60 mm pada konsentrasi 100% terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yang diuji dengan menggunakan metode difusi agar dengan media MHA. Berdasarkan tabel 12 dapat diketahui bahwa ekstrak etanol rimpang bangle aktif terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, hal ini juga ditunjukkan oleh penelitian yang lain. Penelitian Habsah *et al* (2000) dalam *Journal of Ethnopharmacology* yang berjudul *Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities*, menunjukkan bahwa ekstrak diklorometan dan metanol dari rimpang bangle dengan dosis terkecil 1% mampu menghambat pertumbuhan bakteri MRSA.

Hasil diameter zona hambat pada uji aktivitas antibakteri secara difusi terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan hasil pada ekstrak sebesar 9,53 mm pada konsentrasi 50% perolehan ini lebih bagus dibandingkan

dengan penelitian Buldani yang memiliki zona hambat sebesar 6,55 mm pada konsentrasi 50% dan 10,60 mm pada konsentrasi 100%, sedangkan zona hambat pada fraksi teraktif sebesar 9,37 mm menunjukkan intensitas sedang dalam menghambat pertumbuhan bakteri menurut Davis & Stout (2009).

Kontrol positif vankomisin memiliki aktivitas antibakteri paling besar dibanding dengan ekstrak dan fraksi rimpang bangle. Hal ini ditunjukkan dengan adanya daerah zona hambat yang cukup besar disekitar kontrol positif dan pada hasil analisis data kontrol positif mempunyai perbedaan yang signifikan dengan ekstrak dan fraksi. Antibiotik vankomisin menghambat bakteri dengan cara menghambat sintesis dinding sel bakteri. Penghambatan sintesis dinding sel bakteri ini dilakukan melalui proses inhibisi penggabungan subunit *N-acetylmuramic acid* (NAM) dengan *N-acetylglucosamine* (NAG) dalam membentuk matrix peptidoglikan. Peptidoglikan ini adalah komponen utama pembentuk struktur dinding sel bakteri gram positif. Hal ini juga mengakibatkan kerusakan membran sel bakteri dan mengganggu sintesis RNA bakteri (Anaizi 2002).