

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis Penelitian ini yaitu penelitian kualitatif dengan metode pendekatan eksperimental laboratorium untuk mengetahui aktifitas antibakteri ekstrak kencur (*Kaempferia galanga L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* menggunakan metode sumuran.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan September 2018 sampai dengan bulan Februari 2019.

3.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa blender, seperangkat alat soxhlet (Electrothermal), rangkaian destilasi, *vacum rotary evaporator* (Eyela OSB-2100), neraca analitik (Ae Adam), oven (Gemmyco YCO-N01), water bath (Memmert), penjepit, plat tetes, *mikropipet*, lampu UV 254-366 nm, *microwave*, *autoclave*, *incubator*, kawat ose, tabung reaksi, rak tabung, *laminar airflow* (LAF AV – 100), lampu bunsen, pipet tetes, *chamber*, cawan petri, kapas lidi steril, pinset, gelas beaker, tabung reaksi, gunting, corong, batang sumuran, cawan penguap, batang pengaduk, spatula, gelas ukur, botol coklat dan erlenmeyer.

3.4 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kencur 1 kg, etanol (C_2H_5OH) 95%, methanol (CH_3OH) akuades, NA (*Nutrient Agar*), pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, n-heksan (C_6H_{14}), plat kromatografi lapis tipis (KLT), pipa kapiler, besi (III) klorida ($FeCl_3$) 1%, HCl 2N, etanol (C_2H_5OH) 70%, besi (III) klorida ($FeCl_3$) 5%, natrium hidroksida (NaOH) 10%, ammonia (NH_4), NaCl 0,9%, Magnesium (Mg), Dimethyl Sulfoxide (DMSO),

Standar Mc.Farland No.5, aluminium foil, *tissue*, kertas whatman, silica gel (60 GF₂₅₄), kapas steril dan bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus*.

3.5 Tahap Pelaksanaan

1. Pembuatan Ekstrak Rimpang Kencur

300 gram rimpang kencur yang telah di keringkan dengan menggunakan sinar matahari kemudian di haluskan. Ekstrak rimpang kencur dilakukan dengan metode sokletas dengan pelarut etanol 95% dan N-heksana. Sejumlah 300 gram serbuk kering rimpang kencur di bungkus dengan kertaas saring kemudian di ikat dengan benang, di masukkan dalam alat soklet dan pelarut di masukkan dalam labu alas bulat. Lakukan sokletasi dengan suhu 70°C sampai tetesan sirkulasi tidak berwarna lagi atau kurang lebih selama 5 jam. Ekstrak cair yang di peroleh kemudian di uapkan dengan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental rimpang kencur.

2. Penetapan Kadar Air

a. Kadar air dengan destilasi

Penetapan kadar air dengan cara destilasi, simplisia di timbang kemudian di masukkan ke dalam alas bulat, kemudian di tambahkan toluene yang sudah di jenuhkan, hubungkan alat yang akan digunakan kemudian di panaskan selama 15 menit.

Menurut MMI V, (1989 : 539), Setelah tokuen mulai mendidih, suling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah air dan toluen memisah sempurna, baca volume air dan hitung kadar air dalam %.

3. Pembuatan preagen untuk uji fitokimia dan kromatografi lapis tipis

a. Sitroborat

Ditimbang Asam borat 0,5 gram dan asam sitrat 0,5 gram dilarutkan dalam etanol 50 ml.

b. NaOH 1%

Ditimbang 1 gram NaOH lalu dilarutkan dalam 100 ml

c. FeCl₃ 5%

Ditimbang 5 gram FeCl₃ lalu dilarutkan dalam 100 ml

d. Uap KI

Dimasukan sesepora KI (Kalium-Iodida) lalu dimasukan dalam botol putih dan ditutup dengan plastik.

e. Dragendroff

Ditimbang 8,0 bismuth (II) nitrat dilakukan dalam 20 ml asam nitrat pekat kemudian dicampurkan dengan larutan kalium iodida sebanyak 27,2 gram dalam air suling. Campuran didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan diencerkan dengan air suling secukupnya hingga 100 ml (Depkes, 1995).

f. Mayer

Sebanyak 1,36 gram raksa (II) klorida dilarutkan dengan 60 ml akuades di dalam gelas piala. Kemudian di dalam gelas piala terpisah, 1 gram kalium iodida dilarutkan dengan 10 ml akuades. Kedua larutan tersebut dicampurkan dan disaring. Campuran ini diencerkan hingga 100 ml di dalam labu ukur dengan akuades.

g. Pereaksi Lieberman-Burchard

Sebanyak 5 ml anhidrida asetat dan 5 mL asam sulfat pekat dicampurkan secara perlahan di dalam gelas piala, lalu diencerkan hingga 100 ml dengan pelarut etanol.

h. Larutan Asam Sulfat 2 N

Sebanyak 13,9 ml asam sulfat pekat dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah berisi 100 ml akuades secara perlahan melalui dinding gelas, kemudian diencerkan hingga volume 250 ml.

4. Penapisan Fitokimia**a) Uji Kandungan Alkaloid**

Pengajuan dilakukan dengan mengambil masing-masing 5 ml sampel ekstrak rimpang kencur yang telah diekstraksi dengan pelarut

etanol dan n-heksana ke dalam 2 buah tabung reaksi yang berbeda. Setelah itu masing-masing ekstrak ditambah dengan 5 tetes reagen Dragendroff. Jika masing-masing larutan terbentuk endapan jingga maka positif mengandung alkaloid. Selanjutnya untuk pengujian Alkaloid dengan menggunakan reagen Mayer dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 5 ml ekstrak rimpang kencur ke dalam tabung reaksi. Setelah itu masing-masing ekstrak dalam tabung reaksi yang berbeda ditambah 3 tetes reagen Mayer dan reagen Dragendroff. Jika masing-masing larutan terbentuk endapan putih pada pereagen Mayer maka sampel positif mengandung alkaloid dan pada pereagen Dragendroff terbentuk endapan jingga (Mustikasari & Ariyani, 2010).

b) Uji Kandungan Saponin

Ekstrak rimpang kencur dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambahkan 2 tetes HCl 1 N dan dibiarkan selama 10 menit, bila busa yang terbentuk bisa tetap stabil maka ekstrak positif mengandung saponin (Harbon, 1987).

c) Uji Kandungan Flavonoid

Ekstrak rimpang kencur dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan serbuk Mg dan 0,5 ml HCl pekat kemudian di kocok dengan kuat. Jika terbentuk larutan warna merah atau jingga maka positif mengandung flavonoida (Harbon, 1987).

d) Uji Kandungan Tanin

Ekstrak rimpang kencur dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1 %. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin (Harbon, 1987).

e) Uji Steroid dan Triterpenoid

Uji steroid dan uji terpenoid pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 5 ml sampel Ekstrak rimpang kencur yang telah diekstraksi dengan pelarut etanol dan n-heksan. Setelah itu masing-masing ekstrak, ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat. Jika masing-masing larutan terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid dan pada steroid jika masing-masing larutan terbentuk warna hijau maka positif mengandung steroid (Septianingsih, 2013)

5. Kromatografi Kolom

Pada kromatografi kolom digunakan fase diam silica gel, silica gel kemudian disuspensikan dengan menggunakan pelarut n-heksana di aduk sampai homogen kemudian di masukkan ke dalam kromatografi kolom yang sebelumnya telah diberikan kapas pada ujungnya. Sampel dalam bentuk serbuk dan di masukkan ke dalam kromatografi kolom yang telah di siapkan. Elusi di siapkan dengan menggunakan fase gerak dengan variasi polaritas yang meningkat secara bertahap yaitu dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol. Hasil berupa fraksi-fraksi yang di tamping dalam vial.

6. Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri dianalisis komponen-komponennya dengan KLT menggunakan fase diam silica gel dan pengembang n-heksan : etil asetat (7:3). Deteksi lebih lanjut menggunakan sinar UV 254, sinar UV 366, dengan penampak bercak FeCl_3 , NaOH, situborat dan uap amoniak (Sasatrohamidjojo, H. 1983).

7. Karakteristik Isolat Secara Spektrofotometri UV-vis

Karakteristik isolat dengan spektrofotometri ultraviolet dilakukan dengan cara melarutkan senyawa hasil isolat dengan etanol kemudian di

ukur absorbansinya pada panjang gelombang 200-400 nm (Sastrohamidjojo, 1985).

8. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Rimpang Kencur

a) Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan disterilkan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan. Cawan petri, batang pengaduk, spatula, tabung reaksi, gelas ukur dibungkus dengan kertas sampul coklat dan disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Untuk alat seperti jarum ose dan batang L disterilkan dengan metode *Flamber*, yaitu direndam dengan alkohol 70% selama 5 menit kemudian dipijarkan dengan api bunsen. Alat yang terbuat dari karet seperti karet pipet, distreilkan dengan merendamnya didalam alkohol 70% selama 5 menit. Laminar air flow disterilkan dengan menyalakan lampu UV selama 2 jam, dibersihkan dari debu disemprot dengan alkohol 70% dibiarkan selama 15 menit (Raihana, 2011).

b) Penyiapan Media Agar

Ditimbang seberat 2,94 gram NA dan di masukkan ke dalam erlemeyer, ditambahkan dengan 105 ml aquadest, lalu dipanaskan di atas *hot plate* hingga mendidih sambil di aduk hingga homogen sampai berwarna kuning jernih. Kemudian media disterilisasi dengan ditutup menggunakan alumunium foil, larutan media kemudian disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang telah di steril di dinginkan selanjutnya di tuang sebanyak 15 ml ke dalam cawan petri secara aseptis (Handayani *et al.*, 2016).

c) Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Staphylococcus aureus* di ambil menggunakan jarum ose, kemudian di suspensikan dengan larutan NaCl 0,9% steril sebanyak 5 ml kemudian dicampur hingga homogen ditandai dengan cairan berubah menjadi keruh sesuai standar kekeruhan McFarland 0,5 (Ngajow *et al.*, 2013).

d) Pembuatan Variasi Konsentrasi

Konsentrasi ekstrak kencur ditentukan berdasarkan uji pendahuluan yaitu 5% b/v, 10% b/v, 20% b/v, 30% b/v dan 40% b/v, larutan sampel dibuat dengan cara menimbang ekstrak kental kencur masing-masing 0,05 gram, 0,1 gram, 0,2 gram, 0,3 gram dan 0,4 gram, kemudian tiap konsentrasi diencerkan dengan pelarut DMSO 1 ml, DMSO sebagai control negatif dan ciprofloxacin sebagai control positif (Agni Rimba Mawan *et al*, 2018).

e) Penanaman Bakteri *Staphylococcus aureus*

Kultur murni *Staphylococcus aureus* ditanam menggunakan metode sumuran. Penanaman bakteri harus dilakukan dalam keadaan aseptis (Handayani *et al.*, 2016).

f) Uji Aktifitas Antibakteri

Metode uji antibakteri pada penelitian ini menggunakan metode sumuran, metode ini banyak digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri karena lebih sederhana, lebih fleksibel dan pengamatannya lebih mudah digunakan. Bakteri *Staphylococcus aureus* ditanam pada masing-masing media agar dengan cara suspensi bakteri diambil menggunakan micropipet sebanyak 3 tetes untuk masing-masing cawan petri dan di letakkan di atas medium uji aktifitas antibakteri. Kemudian di inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengamatan terhadap zona jernih yang terbentuk dan di ukur diameternya. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antibakteri dengan adanya zona hambat dan setiap pekerjaan laboratorium dilakukan di dekat api bunsen guna untuk menjaga sterilitasnya (Prescott.2002).