

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental, yaitu dengan sampel ekstrak daun dan rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) dilakukan uji antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan metode difusi cakram, dimana dalam teknik ini media agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri kemudian dimasukkan kertas cakram dalam media yang sebelumnya sudah diisi dengan senyawa uji.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Determinasi tanaman akan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).
- b. Ekstraksi dan skrining metabolit sekunder daun dan rimpang kencur dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Uji aktivitas antibakteri daun dan rimpang kencur dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan mulai dari bulan Desember sampai Januari 2023.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) yang berasal dari Dusun Juwet, Desa Banyumanis, Kecamatan Donorojo, Kabupaten Jepara.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) masing-masing sebanyak 2 kg yang berasal dari Dusun Juwet, Desa Banyumanis, Kecamatan Donorojo, Kabupaten Jepara.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini yaitu:

1. Metode Ekstraksi Maserasi

Metode ekstraksi maserasi merupakan metode ekstraksi dengan proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada temperatur ruangan dan dalam waktu tertentu. Cara melakukan maserasi yaitu dengan mencampurkan serbuk simplisia yang direndam dengan pelarut etanol 70% di dalam wadah yang tertutup rapat pada temperatur ruangan selama 5 hari.

2. Ekstrak Daun Kencur

Ekstrak daun kencur adalah ekstrak yang didapatkan dari proses maserasi dengan pelarut etanol 70% kemudian dilanjutkan pada proses evaporasi menggunakan evaporator.

3. Ekstrak Rimpang Kencur

Ekstrak rimpang kencur adalah ekstrak yang didapatkan dari proses maserasi dengan pelarut etanol 70% kemudian dilanjutkan pada proses evaporasi menggunakan evaporator.

4. Aktivitas Antibakteri

Pada penelitian ini, uji aktivitas antibakteri yang akan dilakukan adalah uji dengan sampel ekstrak daun dan rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* menggunakan metode difusi cakram yaitu dengan hasil akhir terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun dan rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) dengan variasi konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dan 25%.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah uji diameter zona hambat ekstrak daun dan rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dari penelitian ini yaitu simplisia daun dan rimpang kencur (*Kaempferia galanga*), cara pembuatan ekstrak, media pertumbuhan, suhu inkubasi, lama inkubasi, metode pengujian antibakteri.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat maserasi (toples kaca), alat-alat gelas (Herma), oven, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pinset, lampu spiritus, gelas ukur, kain flanel, *blank disc* steril (kertas cakram steril), corong kaca (Herma), labu ukur (Iwaki), timbangan analitik (Excellent), cawan petri, kertas hvs, *Muffle furnace* (Thermolyne), *Moisture balance* (Ohaus), autoklaf, *rotary evaporator*, pisau, blender (Philips), pipet tetes, pipet ukur 1 mL (Iwaki), ayakan 40 mesh, LAF (*Laminar Air Flow*), batang pengaduk, jangka sorong (Mitutoyo), kawat ose, inkubator, Mc Farland Densitometer (MF-Unit) cawan penguap, waterbath, mikroskop dan *object glass*.

b. Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, aquadest steril, etanol 70%, medium *Nutrient Agar* (NA), pereaksi dragendorf, pereaksi mayer, serbuk Mg (magnesium), HCl pekat (asam klorida), plastik wrap, aluminium foil, pereaksi FeCl_3 (besi klorida), NaCl 0,9%, H_2SO_4 (asam sulfat), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (kalium dikromat), doksisisiklin, *cotton buds*, cat gram A (kristal violet), cat gram B (lugol iodin), cat gram C (alkohol aseton) dan cat gram D

(larutan safranin), bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus epidermidis*.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman digunakan untuk memastikan bahwa tanaman yang akan diteliti adalah benar tanaman kencur. Determinasi dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).

3. Pemanenan Tanaman Kencur

Pemanenan daun dan rimpang kencur ini dipanen di kebun kencur yang berada di daerah Dusun Juwet, Desa Banyumanis, Kecamatan Donorojo, Kabupaten Jepara. Kriteria pemilihan daun kencur yaitu daun yang telah membuka sempurna, bebas dari penyakit, berwarna hijau tua, serta segar. Pemilihan rimpang kencur dipilih dengan kriteria tanaman kencur yang sudah berumur 6 bulan disertai dengan ciri-ciri daun kencur akan menguning dan akhirnya gugur. Setelah pemanenan daun dan rimpang kencur kemudian dilakukan pembuatan simplisia daun dan rimpang kencur.

4. Pembuatan Simplisia

Pembuatan simplisia daun dan rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) dimulai dari sortasi basah yaitu 2 kg daun dan rimpang kencur yang masih segar dicuci dengan air yang mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, kemudian dilakukan perajangan pada daun dan rimpang kencur, lalu dikeringkan menggunakan dengan sinar matahari

secara tidak langsung dengan ditutupi kan hitam dan dilanjutkan pengeringan menggunakan oven pada suhu 50°C. Hal ini bertujuan untuk menghindari kerusakan senyawa kimia yang terkandung dalam daun dan rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) kering, dilakukan sortasi kering untuk menyingkirkan bahan-bahan yang terlalu gosong. Daun dan rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) yang telah kering dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus kemudian diayak dengan ayakan No.40 mesh dan disimpan dalam wadah bersih tertutup rapat.

5. Standarisasi Simplisia Parameter non Spesifik

a. Uji Kadar Air Simplisia

Setelah simplisia kering, dilakukan uji kadar air, yaitu dengan cara menimbang cawan porselin kemudian ditara dilanjutkan dengan menimbang 2 gram masing-masing serbuk simplisia, kemudian masukkan ke dalam oven selama 3 jam dengan suhu 105°C. Keluarkan cawan yang berisi simplisia lalu dinginkan dan timbang kembali (Himawan *et al.*, 201). Perhitungan kadar air menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

a = bobot sampel sebelum pemanasan (gram)

b = bobot sampel sesudah pemanasan (gram)

b. Uji Kadar Abu Simplisia

Uji kadar abu pada simplisia daun dan rimpang kencur dilakukan dengan cara memasukkan 2 gram serbuk simplisia kedalam krus porselen yang sebelumnya telah ditimbang. Ratakan permukaan serbuk simplisia yang ada dalam krus porselen, kemudian panaskan dengan suhu 600°C selama 3 jam dengan alat *muffle furnace*. Lalu timbang sisa abu dan hitung nilai kadar abu dengan rumus berikut : (Anggraeni, 2020)

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{\text{berat abu}}{\text{berat sampel awal}} \times 100\%$$

6. Pembuatan Ekstrak Daun dan Rimpang Kencur

Serbuk simplisia daun dan rimpang kencur diekstraksi menggunakan metode maserasi, yaitu dimulai dengan menimbang 200 gram serbuk simplisia dimasukkan kedalam masing-masing wadah beserta pelarut etanol 70% sebanyak 1000 mL sampai serbuk terendam atau dengan perbandingan 1:5, tutup rapat (toples kaca) dan terhindar dari paparan sinar matahari. Maserasi dilakukan selama 7 hari pada ruangan yang terlindungi dari cahaya matahari dan sesekali dilakukan pengadukan. Proses ekstraksi dilakukan 5 hari menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 1000 mL dan remaserasi dilakukan selama 2 hari dengan menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 400 mL dengan perbandingan 1:2 (Ningsih *et al.*, 2020).

Hasil maserasi disaring menggunakan kain flannel sehingga diperoleh filtrat berupa ekstrak etanol daun dan rimpang kencur. Kemudian maserat dipekatan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C setelah itu uapkan di atas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental daun dan rimpang kencur (Dianasari *et al.*, 2020).

7. Perhitungan Nilai Rendemen Ekstrak

Perhitungan nilai rendemen dilakukan pada masing-masing ekstrak etanol daun dan rimpang kencur. Perhitungan nilai rendemen menggunakan rumus sebagai berikut: (Sayuti, 2017)

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak Kental (gram)}}{\text{Berat Sampel Awal (gram)}} \times 100\%$$

8. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan pada masing-masing ekstrak etanol 70% daun dan rimpang kencur. Masukkan masing-masing ekstrak kental ke dalam tabung reaksi yang berbeda kemudian ditambahkan dengan 5 tetes pereaksi asam sulfat (H₂SO₄) dan 2 mL pereaksi kalium dikromat (K₂Cr₂O₇). Gojog dan amati perubahan warnanya.

9. Standarisasi Ekstrak Parameter Spesifik

a. Pengamatan Organoleptik

Pengamatan organoleptik dilakukan pada ekstrak etanol daun dan rimpang kencur dengan cara serbuk simplisia diambil sedikit, kemudian dilakukan uji organoleptis meliputi bentuk, bau, rasa dan warna (Evifania *et al.*, 2020).

b. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat pada ekstrak daun dan rimpang kencur dilakukan secara kualitatif meliputi uji flavonoid, saponin, tanin dan alkaloid.

1) Uji Kualitatif

a) Uji Flavonoid

Ekstrak daun dan rimpang kencur ditimbang sebanyak 0,5 mL kemudian tambahkan 2 mg bubuk magnesium, lalu ditambahkan 3 tetes asam klorida pekat.

b) Uji Saponin

Ekstrak daun dan rimpang kencur ditimbang sebanyak 0,5 mL kemudian tambahkan aquadest 10 mL lalu panaskan di penangas air. Larutan tersebut dikocok kuat.

c) Uji Tanin

Ekstrak daun dan rimpang kencur ditimbang sebanyak 0,5 mL kemudian tambahkan beberapa tetes pereaksi FeCl_3 1%.

d) Uji Alkaloid

Masing-masing ekstrak daun dan rimpang kencur ditimbang sebanyak 0,5 mL. larutan dibagi menjadi dua tabung. Tabung I ditambahkan 3 tetes pereaksi dragendorff, tabung II ditambahkan 3 tetes pereaksi mayer.

10. Identifikasi Bakteri

Pewarnaan gram pada bakteri dilakukan untuk memastikan bahwasannya bakteri yang digunakan untuk uji aktivitas bakteri merupakan bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Langkah pertama yang dilakukan adalah membersihkan *object glass* menggunakan alkohol 70% kemudian dikeringkan. Ambil biakan bakteri menggunakan kawat ose steril dan oleskan secara merata di atas *object glass*. Lakukan fiksasi dengan cara melewatkan *object glass* yang sudah di olesi bakteri di atas api bunsen hingga mengering.

Pada *object glass* yang telah mengering kemudian diberi zat warna kristal violet lalu diamkan selama 1 menit, kemudian bilas menggunakan aquadest dan keringkan dengan tissu. Tahap kedua, beri 1-2 tetes larutan lugol diamkan selama 1 menit, kemudian bilas menggunakan aquadest lalu keringkan dengan tissu. Tahap ketiga, tetesi *object glass* yang sudah kering menggunakan alkohol 70% selama 15 detik kemudian bilas menggunakan aquadest. Tahap terakhir, beri 1 tetes larutan safranin lalu diamkan selama 1 menit kemudian bilas menggunakan aquadest dan keringkan menggunakan tissu. Amati hasil pewarnaan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100x (Arimbi, 2017).

11. Sterilisasi Alat

Langkah pertama yaitu cuci terlebih dahulu alat yang akan digunakan hingga bersih kemudian dikeringkan. Sterilisasi alat dilakukan dengan 2 cara yaitu sterilisasi panas kering untuk alat-alat berupa kaca dan sterilisasi panas basah untuk alat non kaca. Alat-alat kaca dibungkus

terlebih dahulu menggunakan kertas kemudian disterilkan dengan panas kering menggunakan oven pada suhu 170°C selama 2 jam, sedangkan pada sterilisasi panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk alat non kaca. Alat-alat lain seperti jarum ose disterilisasi dengan cara dipanaskan di atas api lampu spiritus sebelum digunakan (Sari, 2013).

12. Pembuatan Media

a. Pembuatan Media NA

Pembuatan NA dilakukan dengan menimbang bubuk NA sebanyak 6 gram lalu masukkan dalam erlenmeyer kemudian tambahkan aquadest sebanyak 300 mL diaduk hingga homogen dilanjutkan dengan pemanasan dan pengadukan hingga tidak tersisa kristal. Lakukan sterilisasi larutan NA menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan hasil larutan NA dan tuang kedalam cawan petri sebanyak 10 mL pada ruangan LAF dan biarkan larutan NA hingga menjadi padat di dalam ruangan LAF steril (Qomar *et al.*, 2018).

b. Inokulasi Bakteri pada Media Agar Miring

Ambil sebanyak 1 ose bakteri *Staphylococcus epidermidis* dari biakan murni kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada medium Nutrient Agar (NA) miring secara zig-zag dari bawah sampai atas, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Kurama *et al.*, 2020).

13. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dimulai dengan mengambil seujung mata ose biakan bakteri dengan menggunakan ose steril, kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9% steril sebanyak 10 mL, kocok sampai homogen, setelah itu dicek menggunakan larutan Mc Farland Jika biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* belum memenuhi, maka ditambahkan bakteri dengan jarum ose hingga mencapai kekeruhan yang maksimal (Qamar *et al.*, 2018).

14. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Ekstrak Daun dan Rimpang Kencur

Pembuatan konsentrasi larutan uji ekstrak daun dan rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) dengan menggunakan variasi konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dan 25% dalam 5 mL. Cara pembuatan konsentrasi yaitu dengan menimbang ekstrak dengan rumus: (Magani *et al.*, 2020)

$$M_1 \times C_1 = M_2 \times C_2$$

Keterangan:

M_1 = Konsentrasi awal

C_1 = Volume yang diperlukan

M_2 = Konsentrasi yang akan dibuat

C_2 = Volume yang akan dibuat

15. Pembuatan Larutan Uji Kontrol Negatif dan Kontrol Positif

Pembuatan larutan uji kontrol negatif menggunakan aquadest steril. Sedangkan pada larutan uji kontrol positif menggunakan *disk* doksisisiklin dengan dosis 30 μ g/ *disk* (Harharah *et al.*, 2021).

16. Perlakuan Pengujian

Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak daun dan rimpang kencur dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram. Persiapan alat dan bahan dimulai dari penyiapan media NA yang sudah padat dan suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Siapkan kapas lidi steril kedalam tabung reaksi yang berisi suspensi bakteri. Setiap cawan petri dibagi menjadi 3 bagian dengan ditandai menggunakan spidol. Beri label pada setiap media. Oleskan suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* secara merata di permukaan media NA dan ditunggu selama 5 menit hingga suspensi bakteri menyebar dengan media. Tahap selanjutnya yaitu merendam cakram ke dalam ekstrak daun kencur dan rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dan 25%, kontrol positif menggunakan *paper disk* doksisisiklin dan kontrol negatif dicelupkan pada aquadest masing-masing selama 15 menit (Wijayanti & Safitri., 2018). Kemudian diletakkan di atas media agar yang telah diolesi bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan pengulangan sebanyak 3 kali (Mawan & Indriwati, 2018). Setelah itu tutup cawan petri kemudian panaskan sisi cawan di atas api bunsen secara memutar agar steril. Bungkus cawan petri

menggunakan plastik wrap dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Wijayanti & Safitri., 2018).

17. Pengamatan Hasil Aktivitas Zona Hambat Antibakteri

Cawan petri yang sudah diinkubasi selama 24 jam diukur aktivitas antibakterinya. Letakkan cawan petri di atas meja sesuai urutan perlakuan konsentrasinya dalam posisi tebalik agar tutup cawan petri tidak mudah terbuka. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan mengukur zona bening (tidak ada pertumbuhan bakteri) dari ujung satu ke ujung lainnya menggunakan jangka sorong (Lestari *et al.*, 2020). Ketelitian pengukuran 0,05 mm dengan menggunakan rumus perhitungan luas zona hambat sebagai berikut (Winastri *et al.*, 2020):

$$\text{Rumus, } L = \frac{(D1-D2)+(D3-D2)}{2}$$

Dimana :

L = Luas zona hambat

D1 = Diameter zona hambat vertikal

D2 = Diameter zona hambat cakram

D3 = Diameter zona hambat horizontal

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji aktivitas ekstrak daun dan rimpang kencur dianalisis menggunakan uji statistik deskriptif program SPSS yaitu proses melakukan analisis data dengan memberikan ringkasan yang mudah dipahami. Pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* diperiksa untuk mengetahui apakah ekstrak kencur memiliki khasiat antibakteri pada konsentrasi 5%, 10%, 15%,

20% dan 25%. Setelah terbentuk zona bening di sekitar cakram, ditentukan diameter zona hambat bakteri. Pengukuran diameter zona hambat bakteri memberikan nilai zona hambat bakteri.

Langkah pertama yakni melakukan uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis berdistribusi normal atau tidak (Anderha & Maskar, 2021). Uji normalitas dalam penelitian ini menggunakan uji Shapiro-Wilk dikarenakan data yang digunakan kurang dari 50 yaitu 3 kali replikasi dengan taraf uji signifikansi 5% atau 0,05 (Sabilillah *et al.*, 2016). Bila signifikansi pada p-value hasilnya $<0,05$ maka H_0 ditolak begitu sebaliknya bila hasil p-value $>0,05$ atau sama dengan 0,05 maka H_0 diterima (Gaspersz & Salamor, 2021). Jika pada pengujian parametrik normalitas didapatkan hasil yang tidak normal maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu Kolmogorov-Smirnov dengan taraf signifikan uji 5% atau 0,05 dan apabila nilai p-value $<0,05$ maka H_0 ditolak (Quraisy, 2020).

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data yang digunakan dalam analisis telah homogen atau tidak. Uji homogenitas ini dilakukan menggunakan uji Levene, jika p-value menunjukkan hasil $<0,05$ maka H_0 ditolak atau data tidak terdistribusi homogen (Rosidah *et al.*, 2014). Jika uji homogenitas didapatkan hasil yang tidak homogen maka selanjutnya dilakukan uji non parametrik *Kruskal Wallis*. Bila nilai p-value pada pengujian *Kruskal Wallis* didapatkan hasil $<0,05$ maka kelompok penelitian memiliki perbedaan yang bermakna atau menerima H_1 (Rosidah *et al.*, 2014). Analisis lanjutan dari uji non parametrik *Kruskal Wallis* ini adalah *Mann Whitney*

untuk mengetahui pasangan nilai yang berbeda signifikan (Fianza *et al.*, 2017). Kriteria keputusan pada uji *Mann Whitney* ini jika nilai Asymp. Sig. $>0,05$ maka H_0 diterima dan jika nilai Asymp. Sig. $<0,05$ maka H_0 ditolak (Mubarok *et al.*, 2021).

Untuk data yang telah terdistribusi normal dan homogen selanjutnya diuji One Way Anova. Jika nilai signifikan yang didapatkan $>0,05$ maka menerima H_0 dan menolak H_1 (Rojihah *et al.*, 2015). Untuk uji akhir analisis dilakukan dengan uji T-Test, uji ini menggunakan satu objek penelitian dengan menggunakan dua atau lebih perlakuan yang berbeda (Hastuti, 2012) atau dua data berpasangan. Uji ini dilakukan untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna antara sampel ekstrak daun dan rimpang kencur (Patar *et al.*, 2015). Dengan hipotesis bila nilai p-value $>0,05$ maka menerima H_0 atau tidak ada perbedaan yang bermakna.