

AKTIVITAS ANTIMIKROBA NANOPARTIKEL JERINGAU (*Acorus calamus* L.) TERSALUT KITOSAN TERHADAP PERTUMBUHAN *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, DAN *Candida albicans*

SKRIPSI

Oleh:

ISNEINI SHOLIKA ROHMA

NIM. 16620077



PROGRAM STUDI BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2020

AKTIVITAS ANTIMIKROBA NANOPARTIKEL JERINGAU (*Acorus calamus* L.) TERSALUT KITOSAN TERHADAP PERTUMBUHAN *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, DAN *Candida albicans*

SKRIPSI

Oleh:

ISNEINI SHOLIKA ROHMA

NIM. 16620077

Ditujukan Kepada:

Fakultas Sains dan Teknologi

**Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

PROGRAM STUDI BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2020

AKTIVITAS ANTIMIKROBA NANOPARTIKEL JERINGAU (*Acorus calamus* L.) TERSALUT KITOSAN TERHADAP PERTUMBUHAN *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, DAN *Candida albicans*

SKRIPSI

Oleh:

ISNEINI SHOLIKA ROHMA

NIM. 16620077

Telah Diperiksa dan Disetujui:

Tanggal 5 Oktober 2020

Dosen Pembimbing I



Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul M, M. Si
NIP. 19710919 200003 2 001

Dosen Pembimbing II



Mujahidin Ahmad, M. Sc
NIP. 19860512 201903 1 002

Mengetahui,

Ketua Program Studi Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002

AKTIVITAS ANTIMIKROBA NANOPARTIKEL JERINGAU (*Acorus calamus* L.) TERSALUT KITOSAN TERHADAP PERTUMBUHAN *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, DAN *Candida albicans*
SKRIPSI

Oleh:

ISNEINI SHOLIKA ROHMA

NIM: 16620077

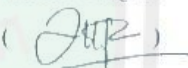
Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi Dan Dinyatakan
Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana
(S.Si)

Tanggal : 9 November 2020

Susunan Dewan Penguji

Penguji Utama: Dr. Hj. Ulfah Utami, M. Si
NIP. 19650509 199903 2 002

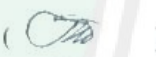
Tanda Tangan

()

Ketua Penguji: Dr. Nur Kusmiyati, M. Si
NIP. 19890816 20160108 2 061

()

Sekretaris Penguji: Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul M., M. Si
NIP. 19710919 200003 2 001

()

Anggota Penguji: Mujahidin Ahmad, M. Sc
NIP. 19860512 201903 1 002

()

Mengesahkan,
Ketua Program Studi Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah rabbil ‘alamin...

Tiada kata yang mampu menggambarkan kebahagiaanku saat ini, saya berterima kasih kepada Allah Subhanahu wa ta'ala yang telah memberikan kemudahan kepada saya sehingga mampu mengerjakan skripsi ini sampai selesai. Sholawat serta salam semoga selalu tercurahkan pada junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang telah membawa umat pada jalan yang terang benderang. Skripsi ini saya persembahkan kepada orang-orang yang berjasa dalam hidup saya, tanpa mereka saya tidak mungkin dapat melangkah sejauh ini. Terima kasih kepada kedua orang tua saya yang telah memberikan dukungan baik berupa materi, maupun doa, serta kerabat yang selalu memberi dukungan. Semoga setelah lulus ini saya mampu membahagiakan dan membalas jasa beliau. Terima kasih untuk teman-teman Biologi 2016, serta semua yang telah memberikan banyak pelajaran hidup serta manisnya perjuangan. Terima kasih untuk Ibu Bayyinatul Muchtaromah dan Bapak Mujahidin Ahmad selaku dosen pembimbing yang sangat sabar dalam membimbing saya. Terima kasih juga untuk Ibu Retno Susilowati selaku dosen wali yang telah memberikan wejangan kepada saya dari semester 1 hingga saya mampu menyelesaikan perkuliahan saat ini.

Terima kasih sebesar-besarnya saya haturkan kepada:

1. Pak Sutrisno dan Ibu Sulasmi, Kedua orang tua saya yang selalu memberikan dukungan baik doa, semangat, dan materiil demi memberikan saya ilmu yang berharga untuk masa depan.
2. Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M. Si sebagai dosen pembimbing skripsi saya. Terima kasih atas kesabaran serta keikhlasan telah memberikan bimbingan, pengarahan serta dorongan dalam proses menyusun skripsi ini.
3. Dr. Ulfah Utami, M. Si, Dr. Nur Kusmiyati, M.Si, Mujahidin Ahmad, M. Sc, Prillya Dewi M. Sc., Retno Novitasari, dan Basyar yang telah membimbing dan memberikan arahan berdasarkan ilmunya kepada saya dengan sangat sabar.

4. Alm. Romaidi, M. Si, D. Sc yang telah memberikan banyak ilmu yang berharga, serta guru-guru saya dari saya TK hingga sekarang.
5. Saudari saya Mega Sari Trismianti, S. Pd beserta suami Ahmad Arifin, beserta kerabat saya yang saya sayangi, yang telah mendukung, mendoakan saya agar dapat segera menyelesaikan proses belajar diperkuliahan ini.
6. Teman-teman satu proyek penelitian Nanopartikel: Mbak Tria, Mbak Tri, Mbak Malikah, Izzah, Hana, Azizah, Ningsih, Siska, Andi, Nurus, dan Qoyin yang telah berjuang bersama dari pagi hingga malam demi menyelesaikan proyek penelitian ini bahkan ditengah pandemi covid-19.
7. Teman-teman Big Family Bio C serta teman-teman seangkatan Biologi Gading Putih 2016, terutama Lisana Sidqi Aliya yang menemani dan mendukung saya mulai dari semester 1 hingga selesainya perkuliahan saya saat ini.
8. Teman-teman asisten laboratorium dan anggota PSM GEMA GITA BAHANA UIN Malang yang telah memberikan saya banyak pengalaman dan pembelajaran selama masa perkuliahan.
9. Semua orang yang menjadi guru dalam hidup saya.

MOTTO

“Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi manusia”
(HR. Ahmad, ath-Thabrani, ad-Daruqutni. Hadits ini dihasankan oleh al-Albani di dalam Shahihul Jami’ no: 3289)

Nasihat Malaikat Jibril as terhadap Nabi Muhammad SAW:

1. Hiduplah sesukamu, karena sesungguhnya kamu akan mati
2. Cintailah siapa yang kamu suka, karena sesungguhnya engkau akan berpisah dengannya
3. Dan berbuatlah sesukamu, karena sesungguhnya engkau akan diberi balasan karenanya

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Isneini Sholika Rohma

NIM : 16620077

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Aktivitas Antimikroba Nanopartikel Jeringau (*Acorus calamus* L.) Tersalut Kitosan Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan ataupun pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan saya atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 7 Oktober 2020

Yang Membuat Pernyataan



Isneini Sholika Rohma

Isneini Sholika Rohma

NIM: 16620077

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi yang berjudul “Aktivitas Antimikroba Nanopartikel Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) Tersalut Kitosan Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans*” ini tidak dipublikasikan. Akan tetapi akses terbuka dan dapat digunakan untuk umum dengan ketentuan hak Cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



Aktivitas Antimikroba Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) Tersalut Kitosan Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans*

Isneini Sholika Rohma, Bayyinatul Muchtaromah dan Mujahidin Ahmad

ABSTRAK

Vaginitis merupakan peradangan di area vagina yang disebabkan oleh infeksi mikroba. Beberapa mikroba utama penyebab terjadinya peradangan vaginitis tergolong mikroba flora normal, misalnya bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, serta kelompok yeast *Candida albicans*. Peradangan vagina dapat meningkatkan risiko gangguan kehamilan. Pemanfaatan obat herbal seperti jamu tradisional dipercaya oleh sebagian masyarakat untuk menangani masalah kesuburan wanita. Salah satu komponen utama pada jamu subur kandungan adalah rimpang jeringau (*Acorus calamus* L.). Rimpang *A. calamus* banyak mengandung minyak atsiri yang berperan dalam aktivitas antimikroba, sehingga dapat digunakan untuk mengobati penyakit di saluran vagina dan saluran urinogenital. Nanopartikel tersalut kitosan memiliki ukuran di bawah 1 μ m. nanopartikel tersalut kitosan memiliki potensi untuk meningkatkan stabilitas penghantaran obat dan berfungsi pula sebagai agen antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas nanopartikel *A. calamus* tersalut kitosan sebagai zat antimikroba. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Metode sintesis nanopartikel menggunakan metode gelasi ionik dengan proses *cross link* antara polimer kation (kitosan) dengan polimer anion (STPP). Bahan uji yang digunakan yakni nanopartikel *A. calamus* tersalut kitosan, ekstrak *A. calamus*, kitosan dan nanopartikel kitosan, serta kontrol (klindamisin, nistatin dan DMSO). Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan uji difusi kertas cakram (Kirby-Bauer) dan uji *microdilution tube* (KHM dan KBM). Uji difusi cakram menggunakan konsentrasi 2,5%, sedangkan uji KHM dan KBM menggunakan konsentrasi 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, dan 0,313% dengan 3 kali ulangan. Analisa uji KHM dilihat dari perubahan kekeruhan suspensi setelah inkubasi. Lalu dilanjutkan dengan uji KBM sebagai konfirmasi kehadiran mikroba setelah masa inkubasi melalui metode *pour plate*. Nilai daya hambat nanopartikel jeringau tersalut kitosan terhadap *S. aureus* sebesar 24 ± 1 mm (Sangat Kuat), pada *E. coli* sebesar $15,27 \pm 1,1$ mm (Kuat), dan pada *C. albicans* sebesar $11,25 \pm 2,48$ mm (Kuat). Nilai KHM nanopartikel jeringau tersalut kitosan diperoleh pada konsentrasi 2,5% dengan total koloni sebanyak $17,2 \times 10^3$ CFU/mL pada *S. aureus*, pada *E. coli* dengan konsentrasi 2,5% < Nilai KHM < 5%, dan pada *C. albicans* dengan konsentrasi 1,25% diperoleh total koloni sebanyak $40,4 \times 10^3$ CFU/mL. Nilai KBM nanopartikel jeringau tersalut kitosan yakni pada *S. aureus* sebesar 5%, *E. coli* sebesar 5% dan pada *C. albicans* tidak diperoleh nilai KBM.

Kata kunci: Antimikroba, Rimpang *A. calamus*, Nanopartikel Kitosan, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans*

Antimicrobial Activity of Jeringau (*Acorus calamus* L.) Nanoparticle Coated with Chitosan Against the Growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*

Isneini Sholika Rohma, Bayyinatul Muchtaromah dan Mujahidin Ahmad

ABSTRACT

Vaginitis is an inflammation of the vaginal area caused by a microbial infection. Some of the main microbes that cause inflammation of vaginitis are classified as normal microbial flora, such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and the yeast group *Candida albicans*. Inflammation of the vagina can increase the risk of pregnancy problems. The use of herbal medicines such as traditional herbal medicine is believed by some people to treat female fertility problems. One of the main components of the uterine fertile herbal medicine is jeringau (*Acorus calamus* L.) rhizome. The rhizome of *A. calamus* contains a lot of essential oils which play a role in antimicrobial activity, so that it can be used to treat diseases of the vaginal and urinary tract. The chitosan coated nanoparticles were under 1 μ m in size. The chitosan coated nanoparticles have the potential to improve drug delivery stability and also function as antimicrobial agents. This study aims to determine the activity of *A. calamus* nanoparticles coated with chitosan as an antimicrobial agent. This research is a laboratory experimental research. The nanoparticle synthesis method uses the ionic gelation method with the cross link process between the cation polymer (chitosan) and the anion polymer (STPP). The test materials used were *A. calamus* coated chitosan nanoparticles, *A. calamus* extract, chitosan and chitosan nanoparticles, include controls (clindamycin, nystatin and DMSO). The antimicrobial activity test was carried out by using disc paper diffusion test (Kirby-Bauer) and microdilution tube test MIC and MBC. The disc diffusion test used a concentration of 2.5%, while the MIC and MBC tests used a concentration of 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, and 0.313% with 3 replications. The MIC test analysis was seen from the change in the turbidity of the suspension after incubation, then proceed with the MBC test as confirmation of the presence of microbes after the incubation period through the pour plate method. The inhibition value of jeringau nanoparticles against *S. aureus* was 24 ± 1 mm (Very Strong), *E. coli* was $15,27 \pm 1,1$ mm (Strong), and *C. albicans* was $11,25 \pm 2,48$ mm (Strong). The MIC value of jeringau nanoparticles was obtained at a concentration of 2,5% with a total colony of $17,2 \times 10^3$ CFU/mL in *S. aureus*, in *E. coli* with a concentration of $2,5\% < \text{MIC} < 5\%$, and in *C. albicans* with a concentration of 1,25%, the total colony was $40,4 \times 10^3$ CFU / mL. The value of MBC for jeringau nanoparticles, namely in *S. aureus* by 5%, *E. coli* by 5% and in *C. albicans*, the value of MBC was not obtained.

Keywords: Antimicrobial, *A. calamus* Rhizome, Chitosan Nanoparticles, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*

المغلف بالكتيوزان ضد نمو المكورات العنقودية الذهبية والإشريكية القولونية (*Acorus calamus* L.) الجرينجاو والمبيضات البيضاء

إثنان صلحة رحمة ، بينة المخترمة و مجاهدين أحمد

ملخص البحث

التهاب المهبل هو التهاب في منطقة المهبل ناتج عن عدوى جرثومية. تصنف بعض الميكروبات الرئيسية التي تسبب التهاب المهبل على أنها نباتات *Candida* ، وكذلك مجموعة الخميرة *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* جرثومية طبيعية ، على سبيل المثال يمكن أن يؤدي التهاب المهبل إلى زيادة مخاطر حدوث مشاكل الحمل. يعتقد بعض الناس أن استخدام الأدوية العشبية مثل الأدوية *Acorus calamus* (العشبية التقليدية لعلاج مشاكل الخصوبة عند النساء. أحد المكونات الرئيسية للأدوية العشبية الخصب للرحم هو جرينجاو جذمور *A. calamus* يحتوي جذمور *A. calamus* L.) على الكثير من الزيوت الأساسية التي تلعب دورًا في النشاط المضاد للميكروبات ، لذلك *A. calamus* يحتوي جذمور *A. calamus* L.) يمكن استخدامها لعلاج أمراض المسالك البولية والمسالك المهبليّة. كان حجم الجسيمات النانوية المغلفة بالكتيوزان أقل من 1 ميكرومتر. تمتلك الجسيمات النانوية المغلفة بالكتيوزان القدرة على تحسين استقرار توصيل الدواء وتعمل أيضًا كعوامل مضادة للميكروبات. تهدف هذه الدراسة إلى المغلفة بالكتيوزان كعامل مضاد للميكروبات. هذا البحث هو بحث تجريبي معلمي. تستخدم *A. calamus* تحديد نشاط الجسيمات النانوية (STPP). طريقة تخليق الجسيمات النانوية طريقة التكوين الأيوني مع عملية ربط كروس بين بوليمرات الكاتيون (الشيتوزان) وبوليمرات الأنيون chitosan و *A. calamus* و خلاصة *A. calamus* كانت مواد الاختبار المستخدمة هي جزيئات الشيتوزان النانوية المطلية بالكالاموس تم إجراء اختبار النشاط المضاد (DMSO و nystatin و clindamycin) وكذلك التحكم chitosan nanoparticles و chitosan استخدام (MIC و KHM) واختبار أنبوب التخفيف الدقيق (Kirby-Bauer) للميكروبات باستخدام اختبار انتشار ورق القرص تركيز 5٪ ، 2.5٪ ، 1.25٪ ، 0.625٪ ، 0.313٪ KBM و MBC اختبار الانتشار القرصي تركيز 2.5٪ ، بينما استخدم اختبار كسائيد لوجود الميكروبات بعد KBM من التغير في تعكر المعلق بعد الحضانة. ثم تابع اختبار MIC مع 3 مكررات. شوهد تحليل اختبار مم (قوي جدًا) 1 ± 24 *S. aureus* فترة الحضانة من خلال طريقة لوحة الصب. كانت قيمة تثبيط الجسيمات النانوية المغلفة بالكتيوزان ضد MIC ملم (قوي). تم الحصول على قيمة 48 ، 11.25 ± 2 *C. albicans* ، والإشريكية القولونية 15.27 ± 1.1 مم (قوية) ، وكانت *S. aureus* مل في | CFU النانوية المطلية بالكتيوزان بتركيز 2.5٪ مع مستعمرة إجمالية قدرها $10^3 \times 17.2$ jeringau جزيئات البيض بتركيز 1.25٪ حصلوا على مستعمرة إجمالية $10^3 \times 40.4$ *C. albicans* ، وعند 5٪ < MIC < بتركيز 2.5٪ *E. coli* ، و 5٪ للإشريكية القولونية ولا قيمة *S. aureus* المغلفة بالكتيوزان 5٪ للبكتريا MBC مل. كانت قيمة الجسيمات النانوية | CFU ، KBM *C. albicans*.

، و Chitosan Nanoparticles ، و *A. calamus* Rhizome ، الكلمات الأساسية: مضادات الميكروبات ، *Candida albicans* ، و *Escherichia coli* ، و *Staphylococcus aureus*

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr, Wb.

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah Subhanahu wa ta'ala, karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan studi di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, sekaligus menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Aktivitas Antimikroba Nanopartikel Jeringau (*Acorus calamus*) Tersalut Kitosan Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans*”** dengan baik. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabat karena berkat Beliau yang telah menuntun umat manusia keluar dari jaman jahiliyah menuju jaman dengan perkembangan ilmu pengetahuan yang sangat baik.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

- 1) Prof. Dr. Abdul Haris, M. Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 2) Dr. Sri Harini, M. Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 3) Dr. Evika Sandi Savitri, M. P selaku Ketua Program Studi Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 4) Ibu Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si dan Mujahidin Ahmad, M.Sc selaku pembimbing skripsi yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan kami serta memberi motivasi demi terealisasinya skripsi ini.
- 5) Ibu Dr. Ulfah Utami, M. Si dan Ibu Dr. Nur Kusmiyati, M. Si selaku penguji yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan kami demi terealisasinya skripsi ini.

- 6) Prilya Dewi Fitriyari, M.Sc selaku Kepala Laboratorium dan Retno Novvitasari HD., M.Sc selaku Laboran Mikrobiologi yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian.
- 7) Moh. Basyaruddin, M.Si selaku Laboran Fisiologi Hewan yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian.
- 8) Fitriyah, M.Si selaku Kepala Laboratorium dan Mahrus Ismail, M.Si selaku Laboran Genetika Molekuler yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian.
- 9) Segenap civitas akademika Program Studi Biologi, terutama seluruh dosen yang telah memberikan ilmu, pengalaman, serta wawasannya sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
- 10) Kedua orang tua tersayang Sutrisno dan Sulasmi yang senantiasa memberikan do'a restu, dukungan baik secara finansial maupun motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
- 11) Kakakku Mega Sari Trismianti, S. Pd dan Ahmad Arifin yang selalu memberikan dukungan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
- 12) Teman-teman yang tidak bisa disebutkan satu-persatu atas dukungannya kepada penulis selama masa perkuliahan hingga dapat menyelesaikan skripsi ini.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

DAFTAR ISI

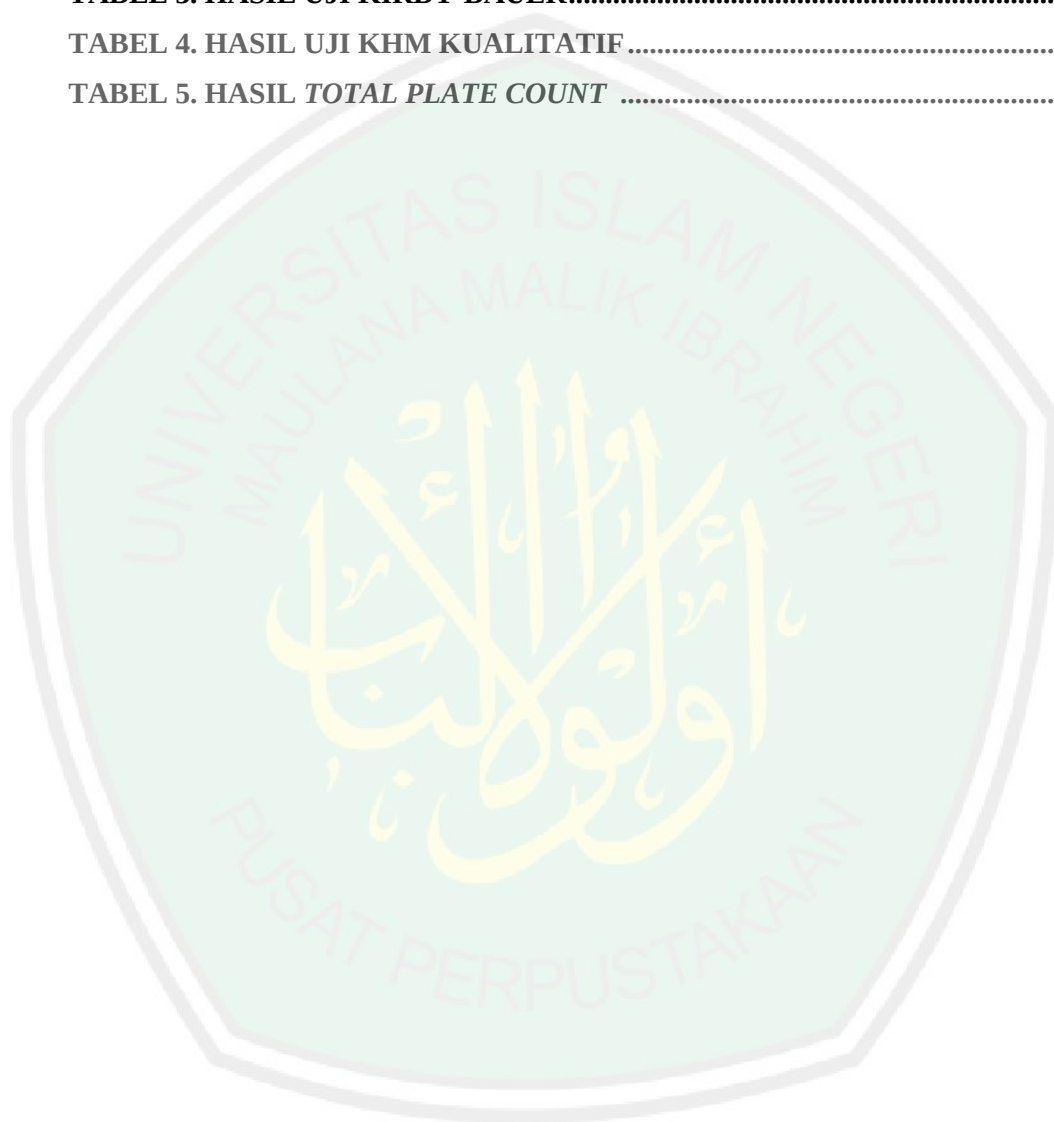
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iiiv
MOTTO	vi
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	vii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
ملخص البحث.....	xi
KATA PENGANTAR.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
DAFTAR SINGKATAN.....	xx
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 LATAR BELAKANG.....	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
1.5 Batasan Masalah	8
BAB II KAJIAN TEORI.....	9
2.1 Tanaman Jeringau (<i>Acorus calamus</i> L.)	9
2.1.1 Kajian Islam Tanaman Obat <i>A. calamus</i>	9
2.1.2 Persebaran dan Klasifikasi <i>A. calamus</i>	12
2.1.3 Morfologi	13
2.1.4 Senyawa Aktif dari Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus</i> L.).....	14
2.1.5 Manfaat Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus</i> L.)	15
2.2 Ekstraksi Melalui Metode Maserasi.....	16
2.3 Nanopartikel.....	17
2.3.1 Nanopartikel Kitosan.....	21

2.4 Mikroba Uji	25
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.4.2 <i>Escherichia coli</i>	27
2.4.3 <i>Candida albicans</i>	29
2.5 Antimikroba	30
2.6 Metode Pengujian Secara <i>In Vitro</i>	32
2.6.1 Metode Difusi Kertas Cakram (<i>Kirby-Bauer</i>).....	32
2.6.2 Metode Dilusi.....	33
2.7 Standar Uji Aktivitas Antimikroba berdasarkan CLSI.....	34
2.8 Mekanisme Aktivitas Antimikroba	34
2.8.1 Aktivitas Antimikroba Nanopartikel Kitosan	34
2.8.2 Aktivitas Antimikroba Ekstrak Rimpang Jeringau	38
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	39
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	39
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	39
3.3 Variabel Penelitian.....	40
3.3.1 Variabel Bebas	40
3.3.2 Variabel Terikat.....	40
3.3.3 Variabel Terkendali.....	40
3.4 Alat Dan Bahan.....	41
3.4.1 Alat	41
3.4.2 Bahan	41
3.5 Prosedur Penelitian.....	42
3.5.1 Pembuatan Ekstrak Rimpang Jeringau (<i>Acorus calamus</i>)	42
3.5.2 Pembuatan Nanopartikel Jeringau (<i>Acorus calamus</i>) Tersalut Kitosan...	42
3.5.3 Pembuatan Nanopartikel Kitosan	43
3.5.4 Uji Antimikroba	43
1. Sterilisasi Alat.....	43
2. Pembuatan Media	44
A. <i>Nutrient Agar</i> (NA)	44
B. <i>Nutrient Broth</i> (NB)	44
C. <i>Sabaround Dextrose Agar</i> (SDA).....	44
D. <i>Sabaround Dextrose Broth</i> (SDB).....	44
3. Pengecekan Kemurnian Sediaan dan Peremajaan Biakan Mikroba Uji.....	45

A. Bakteri Uji	45
B. Jamur Uji	45
4. Pembuatan Suspensi Mikroba Uji.....	46
A. Bakteri Uji	46
B. Jamur Uji	46
5. Uji Zona Hambat (<i>Disk Diffusion Method</i>).....	46
6. Uji KHM dan Uji KBM (<i>Broth Microdilution Method</i>)	47
3.5.5 Analisis Data.....	50
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	51
4.1 Aktivitas Antimikroba Berdasarkan Uji Kirby-bauer	51
4.2 Aktivitas Antimikroba Berdasarkan Uji <i>Microdilution Tube</i>	59
4.2.1 Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)	59
4.2.2 Uji Total Plate Count.....	62
BAB V PENUTUP.....	73
5.1 Kesimpulan.....	73
5.2 Saran	73
DAFTAR PUSTAKA.....	75
LAMPIRAN.....	88

DAFTAR TABEL

TABEL 1. PRESENTASE SENYAWA AKTIF RIMPANG <i>Acorus calamus</i>	14
TABEL 2. KATEGORI ZONA HAMBAT.....	33
TABEL 3. HASIL UJI KIRBY-BAUER.....	51
TABEL 4. HASIL UJI KHM KUALITATIF	59
TABEL 5. HASIL <i>TOTAL PLATE COUNT</i>	63



DAFTAR GAMBAR

GAMBAR 1. MORFOLOGI <i>Acorus calamus</i>	13
GAMBAR 2. TIPE-TIPE NANOPARTIKEL.....	21
GAMBAR 3. DEASETILASI KITIN MENJADI KITOSAN.....	22
GAMBAR 4. SISTEM BIOPOLIMER METODE GELASI IONIK DALAM MENJERAP OBAT	23
GAMBAR 5. FORMASI KITOSAN-TPP METODE GELASI IONIK	24
GAMBAR 6. MORFOLOGI <i>Staphylococcus aureus</i>.....	27
GAMBAR 7. MORFOLOGI <i>Escherichia coli</i>.....	29
GAMBAR 8. MORFOLOGI <i>Candida albicans</i>.....	30
GAMBAR 9. MEKANISME ANTIBAKTERI KITOSAN	37
GAMBAR 10. MEKANISME KITOSAN MENGHAMBAT <i>Candida albicans</i>	38
GAMBAR 11. AKTIVITAS ANTIFUNGI β-ASARONE	39
GAMBAR 12. METODE <i>BROTH-MICRODILUTION</i> BERDASARKAN CLSI.....	48
GAMBAR 13. HASIL PENGAMATAN UJI KIRBY-BAUER	54

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. RANCANGAN PENELITIAN	88
LAMPIRAN 2. PREPARASI SAMPEL	89
LAMPIRAN 3. RUMUS-RUMUS	97
LAMPIRAN 4. DATA HASIL UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA	98
LAMPIRAN 5. GAMBAR DOKUMENTASI PENELITIAN	101
LAMPIRAN 6. GAMBAR DATA HASIL PENELITIAN	105
LAMPIRAN 7. BUKTI KONSULTASI SKRIPSI	113

DAFTAR SINGKATAN

Simbol/Singkat	Keterangan
Nm	nanometer
μm	micrometer
STPP	Sodium tripolifosfat
AAG	Asam asetat glasial
Mg/mL	milligram/milliliter
Cm	centimeter
Mm	millimeter
PSA	<i>Particle Size Analyzer</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
Mg	Magnesium
K	Kalium
Ca	Kalsium
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
mRNA	<i>messenger- Ribonucleic Acid</i>
pH	<i>Power of Hydrogen</i> (derajat keasaman)
KHM	Konsentrasi Hambat Minimum/ <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC)
KBM	Konsentrasi Bunuh Minimum/ <i>Minimum Bactericidal or Fungicidal Concentration</i> (MBC/MFC)
O ₂	Oksigen
λ	lambda= panjang gelombang (nm)

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Vaginitis merupakan gangguan kesehatan yang sering terjadi pada sebagian besar wanita, penyakit ini terjadi akibat adanya peradangan di area vagina. Flora normal pada vagina sebagian besar dihuni oleh kelompok *Lactobacilli*. Selain itu, terdapat mikroba lain seperti *Staphylococcus aureus*, *Candida* sp., *Escherichia coli*, *Neisseria* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., dan kelompok *Enterococcus* dalam skala kecil. Umumnya vaginitis disebabkan oleh infeksi dari bakteri yang berpotensi patogen seperti bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif *Escherichia coli*, serta yeast *Candida albicans*. Hal ini dikarenakan jumlah *Lactobacilli* menurun, sedangkan mikroba lain mengalami peningkatan pertumbuhan di atas batas normal (Lakhsmi, *et al.* 2013).

Terjadinya vaginitis akibat infeksi *S. aureus* dan *E. coli* disebabkan melalui faktor perilaku seksual dengan melebihi satu pasangan, meningkatnya pH di area vagina, dan penurunan hormon estrogen atau pasca menopause. Selain itu, vaginitis yang disebabkan oleh *Candida albicans* atau yang sering disebut dengan kandidiasis dapat disebabkan oleh faktor penyakit diabetes, penyakit HIV, dan beberapa faktor kelainan genetik (Lakhsmi, *et al.* 2013).

Berdasarkan hasil studi Wang, *et al* (2016) bakteri aerob penyebab penyakit vaginitis didominasi oleh *S. aureus* dan *E.coli* sebanyak 99,33%. Di sisi lain, vaginitis yang disebabkan oleh infeksi jamur ditemukan sebanyak 75% kasus terjadi pada wanita yang sering disebut dengan *vulvovaginal candidiasis*. Lebih dari 90% infeksi *vulvovaginal candidiasis* disebabkan oleh *C. albicans* (Marchaim, *et al.* 2012).

S. aureus dan *E. coli* merupakan salah satu bakteri flora normal aerobik penyebab vaginitis. *E.coli* merupakan flora normal yang dapat ditemukan dalam jumlah besar di dalam usus, sedangkan *S. aureus* termasuk bakteri flora normal yang tumbuh di bagian kulit, membran hidung, dan saluran pencernaan (Radji, 2010). *C. albicans* melakukan simbiosis komensalisme dengan saluran

genetalia wanita, kulit, dan saluran pencernaan (Irianto, 2013). Peradangan vagina dapat meningkatkan potensi gangguan kehamilan. Gangguan yang disebabkan oleh bakteri vaginitis aerob pada ibu hamil dapat menyebabkan tingkat kelahiran prematur meningkat, timbulnya risiko gangguan pada funisitis janin dan chorioamnionitis janin (Donders, *et al.* 2011).

Setiap pasangan yang telah melangsungkan pernikahan pasti menginginkan hadirnya keturunan. Memiliki keturunan merupakan karunia dari Allah SWT. Dalam HR. Ahmad dituliskan bahwa Rasulullah SAW telah bersabda:

تَزَوَّجُوا الْوُلُودَ فَإِنِّي مُكَاثِّرٌ بِكُمْ الْأَنْبِيَاءَ يَوْمَ الْقِيَامَةِ

Artinya: “Nikahilah perempuan yang penyayang dan **dapat mempunyai anak banyak** karena sesungguhnya aku akan berbangga dengan sebab banyaknya kamu dihadapan para Nabi nanti pada hari kiamat” (Shahih Riwayat Ahmad, Ibnu Hibban dan Sa'id bin Manshur dari jalan Anas bin Malik).

Makna yang terkandung dalam hadits di atas menyatakan tentang keutamaan orang-orang yang memperbanyak keturunannya, karena Nabi SAW akan berbangga terhadap banyaknya jumlah umat beliau pada hari kiamat kepada nabi-nabi yang lain (Al-Jauziyah, 2000). Namun, adanya gangguan kesehatan vaginitis dapat menyebabkan seseorang sulit memperoleh keturunan. Untuk itu, perlu adanya obat yang dapat mengatasi penyakit ini.

Semua hal yang terjadi di alam raya merupakan atas kehendak Allah SWT. Terciptanya suatu penyakit di bumi tentu saja atas izin Allah SWT, serta Allah SWT telah menyiapkan penawar dari berbagai penyakit yang ada. Hal tersebut merupakan bentuk kasih sayang Allah SWT terhadap hamba-Nya. Kejadian tersebut tercantum dalam firman Allah SWT surat Asy-Syu'ara' ayat 80 yang berbunyi:

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ﴿٨٠﴾

Artinya: “Dan **apabila aku sakit, Dialah Yang menyembuhkan aku.**” (QS. Asy-Syu'ara' ayat 80)

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah SWT yang telah menyembuhkan manusia apabila ia sakit. Allah SWT memiliki kekuasaan dalam memberikan

penyakit, serta menyembuhkan makhluknya. Namun, untuk mendapatkan kesembuhan itu manusia dianjurkan untuk berikhtiar seperti mengonsumsi obat. Disisi lain, Imam Jamaluddin al-Qasimi dalam tafsirnya menguraikan bahwa ayat ini menggambarkan adab seorang hamba Allah kepada Khaliknya. Sebab penyakit itu kadang-kadang akibat dari perbuatan manusia sendiri, misalnya manusia yang melakukan pola hidup tidak sehat (Kemenag, 2020).

Klindamisin merupakan antibiotik yang dianjurkan sebagai pengobatan infeksi bakteri aerobik vaginitis pada ibu hamil (Donders, *et al.* 2011). Klindamisin juga dapat digunakan sebagai obat untuk infeksi mikroba anaerob pada pasien yang alergi terhadap penisilin atau pasien yang resisten ketika diberi penisilin (Kasten, 1999). Namun, obat ini memiliki masa pengendalian infeksi bakteri yang pendek dan tidak dapat mencakup keseluruhan spesies penyebab vaginitis aerob (Donders, *et al.* 2015).

Pengobatan infeksi kandidiasis dalam jangka pendek umumnya menggunakan obat dari kelompok *azole* dan nistatin. Namun, terapi kandidiasis menggunakan nistatin dalam jangka panjang masih jarang digunakan. Hal ini disebabkan oleh ketidaknyamanan pasien pasca terapi, serta informasi mengenai efektivitas dan keamanan obat masih kurang (Marchaim, *et al.* 2012).

Berdasarkan permasalahan penggunaan antibiotik di atas dalam menangani infeksi mikroba penyebab vaginitis, maka perlu adanya kandidat obat baru untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroba penyebab vaginitis. Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman hayati dan beragam tradisi, salah satunya yakni tradisi mengonsumsi jamu tradisional. Masyarakat Indonesia memproduksi jamu dari berbagai macam bahan herbal untuk mengatasi gangguan kesehatan maupun untuk terapi. Berdasarkan data WHO menyatakan bahwa lebih dari 80% warga di Afrika menggunakan obat tradisional sebagai pengobatan. Konsumsi obat tradisional secara turun temurun juga telah dilakukan oleh penduduk Amerika Latin dan Asia. Selain itu, 40% obat medis yang digunakan di negara China diperoleh dari obat tradisional (WHO, 2002).

Salah satu ramuan jamu tradisional yang berasal dari Madura dikenal sebagai pengobatan herbal untuk mengatasi masalah fertilitas pada wanita. Jamu tradisional yang diproduksi oleh P.J. Ribkah Maryam Jokotole memiliki komposisi utama yang terdiri dari umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) sebanyak 15%, rimpang jeringau (*Acorus calamus* L.) sebanyak 12%, dan 15% rimpang temu mangga (*Curcuma mangga* Val.), serta bahan tambahan lainnya (Muchtaromah, *et al.* 2017).

Rimpang jeringau (*Acorus calamus* L.) memiliki potensi sebagai antimikroba. Kandungan bahan aktif dari rimpang *A. calamus* yang diekstraksi dengan etanol antara lain yakni alkaloid, flavonoid, diterpen, triterpen, dan glikosida (Barua, *et al.* 2014). Rita, *et al.* (2017) menjelaskan berdasarkan analisis GC-MS kandungan minyak atsiri rimpang *A. calamus* terdiri atas golongan monoterpen dan sesquiterpen. Kelompok terpenoid dalam minyak atsiri rimpang jeringau yakni asaron dan eusaron. Kelompok terpenoid ini memiliki kemampuan melisis sel bakteri melalui interaksi senyawa dengan dinding sel bakteri, sehingga terjadi peningkatan tekanan osmotik (Rita, dkk. 2017). Tidak hanya itu, prinsip senyawa aktif β -asarone dalam minyak atsiri *A. calamus* sebagai antifungi dengan cara mengganggu dan mengurangi kandungan ergosterol dalam membran plasma fungi (Venkatesan, *et al.* 2017).

Pembuatan nanopartikel diawali dengan ekstraksi rimpang *A. calamus* menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Puspitasari & Lean (2017) menyatakan bahwa metode ekstraksi maserasi memiliki kelebihan yang terletak pada teknik dan alat yang digunakan sederhana, serta senyawa aktif yang terkandung dalam bahan terekstraksi tidak mudah terurai karena prosesnya tanpa dipanaskan. Menurut Wang, *et al.* (2017) penggunaan etanol 70% untuk ekstraksi dapat mengoptimalkan hasil flavonoid yang diperoleh. Selain itu, berdasarkan penelitian Ahmad (2015) maserasi rimpang *A. calamus* menggunakan pelarut etanol 70% menghasilkan senyawa antioksidan yang memiliki aktivitas penangkap radikal bebas cukup tinggi.

Nanopartikel merupakan benda padat berukuran sekitar 10-1000 nm. Ukuran nanopartikel rimpang *A. calamus* tersalur kitosan berdasarkan laporan

penelitian Muchtaromah, *et al* (2020) berukuran sekitar 913 nm dan 988 nm. Ukuran nanopartikel kitosan yakni sekitar 405 nm hingga 805 nm. Sintesis nanopartikel terdiri dari berbagai macam metode, salah satunya melalui metode gelasi ionik. Pada umumnya metode gelasi ionik digunakan untuk mensintesis nanopartikel kitosan. Metode ini dipilih karena prosesnya yang mudah dan lebih sederhana. Selain itu, kitosan merupakan bahan yang mudah didapat dengan harga yang lebih terjangkau dibandingkan dengan penyalut nanopartikel dari emas ataupun perak.

Kitosan merupakan poli [β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose]. Kitosan adalah bentuk derivat dari kitin yang diperoleh melalui deasetilasi alkalin dari kitin (Roberts, 1992). Nanopartikel kitosan melalui metode gelasi ionik menggunakan proses ikat silang (*cross-linking*). Proses tersebut melibatkan interaksi antara molekul kitosan (polikation) dan tripolifosfat (polianion) (Koukaras, *et al.* 2012). Kitosan dan natrium tripolifosfat (STPP) dimanfaatkan sebagai bahan nano-enkapsulasi untuk meningkatkan bioavailabilitas senyawa aktif (Choiri, *et al.* 2016).

Nanopartikel kitosan merupakan partikel penghantar obat yang memiliki kelebihan dalam ukuran dan karakteristik permukaan partikel, sehingga berperan penting dalam melintasi membran sel. Kitosan dan tripolifosfat (TPP) digunakan sebagai bahan sintesis nanopartikel dikarenakan proses ikatan silang (*cross link*) antara oligomer kitosan dengan polianion tripolifosfat menghasilkan stabilitas ikatan yang kuat (Koukaras, *et al.* 2012). Mekanisme antibakteri kitosan melalui interaksi antara komponen amino dengan ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} yang dapat mencegah pembentukan dinding sel bakteri dan memproduksi racun, sehingga menyebabkan pertumbuhan bakteri terhambat (Kravanja, *et al.* 2019). Kemudian mekanisme antifungi kitosan terhadap *C. albicans* yakni menstimulasi terjadinya pengasaman ekstraseluler dan mengeluarkan ion K^+ , sehingga terjadi proses hiperpolarisasi membran plasma dan fungsi metabolisme sebagai fermentasi serta respirasi terganggu (Pena, *et al.* 2013).

Pelarut nanopartikel *A. calamus* tersalur kitosan pada penelitian ini menggunakan pelarut DMSO (*Dimethyl sulfoxide*). Berdasarkan penelitian Mohammadi, *et al.* (2019) DMSO merupakan pelarut organik (hidrofilik) dan memiliki stabilitas yang baik. Dalam penelitian tersebut DMSO digunakan sebagai pelarut nanopartikel kitosan. Selain itu, berdasarkan penelitian Ulfah (2020) diketahui bahwa penggunaan pelarut DMSO sebagai kontrol negatif tidak membentuk zona hambat, sehingga bersifat netral.

Aktivitas antibakteri oleh ekstrak rimpang *A. calamus* menunjukkan hasil yang kurang maksimal dibandingkan dengan aktivitas antibakteri nanopartikel rimpang *A. calamus*. Terbukti pada penelitian Reddy, *et al.* (2014) bahwa diameter zona hambat dari ekstrak rimpang *A. calamus* terhadap bakteri *S. aureus* yakni sebesar 1 cm, sedangkan pada nanopartikel perak ekstrak *A. calamus* memiliki diameter zona hambat sebesar 1,6 cm.

Ganesan & H. Gurumalles (2015) menambahkan bahwa aktivitas antimikroba secara kuantitatif menunjukkan bahwa presentase reduksi bakteri setelah pemberian nanopartikel emas rimpang *A. calamus* lebih tinggi dibandingkan ekstrak murni rimpang *A. calamus*. Presentase reduksi bakteri *E. coli* setelah masa inkubasi 24 jam dengan perlakuan ekstrak rimpang *A. calamus* sebesar 9,37%, sedangkan presentase reduksi bakteri *E. coli* menggunakan perlakuan nanopartikel emas rimpang *A. calamus* yakni sebesar 58%. Selain itu dengan perlakuan yang sama, hasil presentase reduksi bakteri menggunakan ekstrak rimpang *A. calamus* terhadap *S. aureus* yakni 5,8%, sedangkan pada nanopartikel emas rimpang *A. calamus* yakni 50,5%.

Berdasarkan penelitian Kritchenkov, *et al.* (2019) dilakukan perbandingan aktivitas antibakteri antara kitosan, nanopartikel kitosan, dan obat kontrol terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli*. Hasil dari penelitian tersebut menyatakan bahwa aktivitas antibakteri nanopartikel kitosan terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli* lebih tinggi dibandingkan dengan kitosan tanpa melalui proses sintesis nanopartikel.

Nanopartikel kitosan juga memiliki potensi antifungi. Berdasarkan penelitian Gondim, *et al.* (2018) menyatakan bahwa nanopartikel kitosan (30,1

µg/mL) pada uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) memiliki kekuatan mereduksi pertumbuhan *C. albicans* dalam waktu 8 jam. Nanopartikel kitosan menghambat biofilm *C. albicans* dan menyebabkan perubahan kecil terhadap kekasaran dan kekerasan permukaan resin akrilik, sehingga mengurangi biofilm *C. albicans*.

Aktivitas antimikroba dapat diuji melalui beberapa macam metode, dua di antaranya yakni metode difusi kertas cakram (*Kirby-Bauer*) dan metode dilusi cair (melalui uji Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum). Pemanfaatan nanopartikel sebagai agen antimikroba dipengaruhi oleh faktor bentuk partikel, ukuran partikel, sebaran partikel, tingkat kelarutan partikel dan luas permukaan partikel (Liu, *et al.*, 2019). Berdasarkan penjabaran latar belakang tersebut, menyebabkan pentingnya penelitian nanopartikel rimpang jeringau (*Acorus calamus* L.) tersalut kitosan sebagai antimikroba. Hal ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimikroba nanopartikel rimpang jeringau (*Acorus calamus*) tersalut terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans* dari isolat vagina.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana nilai zona hambat nanopartikel jeringau (*Acorus calamus* L.) tersalut kitosan terhadap *S. aureus*, *E. coli* dan *C. albicans*?
2. Bagaimana nilai Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum nanopartikel jeringau (*Acorus calamus* L.) tersalut kitosan terhadap *S. aureus*, *E. coli* dan *C. albicans*?

1.3 Tujuan

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui nilai zona hambat nanopartikel jeringau (*Acorus calamus* L.) tersalut kitosan terhadap *S. aureus*, *E. coli* dan *C. albicans*?

2. Untuk mengetahui nilai Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum nanopartikel jeringau (*Acorus calamus* L.) tersalut kitosan terhadap mikroba *S. aureus*, *E. coli* dan *C. albicans*?

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari adanya penelitian ini adalah:

1. Sumber informasi bagi mahasiswa, peneliti, dan masyarakat bahwa tanaman jeringau (*Acorus calamus*) bagian rimpangnya bermanfaat sebagai obat herbal antibakteri dan antijamur.
2. Referensi bagi penelitian selanjutnya bahwa penggunaan teknologi nanopartikel sebagai agen penghantar obat dapat meningkatkan efektivitas kerja obat.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Sampel tanaman yang digunakan yakni rimpang jeringau (*Acorus calamus* L.) dari UPT Materia Medika, Batu-Malang.
2. Isolat mikroba yang digunakan yakni *Candida albicans* (CV.1423), *Staphylococcus aureus* (1117-SV), dan *Escherichia coli* (1906-8V) diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Sintesis nanopartikel tersalut kitosan menggunakan metode gelasi ionik dengan polimer polianion (TPP) dan polimer polikation (kitosan).
4. Parameter yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antimikroba dilakukan dengan 2 metode yakni metode difusi kertas cakram (diameter zona hambat) dan metode *Microdilution Test* dengan 2 tahap uji (uji KHM dan uji KBM). Uji KHM dengan melihat tingkat kekeruhan dari setiap perlakuan dilusi cair, sedangkan uji KBM sebagai konfirmasi

jumlah koloni mikroba yang tumbuh pada cawan petri(*Total Plate Count*).

5. Sampel rimpang *Acorus calamus* mengacu pada salah satu bahan utama pada komposisi jamu PT Ribkah Maryam Jokotole.



BAB II

KAJIAN TEORI

2.1 Tanaman Jeringau (*Acorus calamus* L.)

2.1.1 Kajian Islam Tanaman Obat *A. calamus*

Sejak beberapa tahun yang lalu, tanaman telah dipercaya memiliki sifat terapeutik. Penggunaan beberapa jenis tanaman sebagai bahan obat herbal, telah digunakan sebagian besar penduduk di berbagai belahan dunia selama berabad-abad. Adanya berbagai macam manfaat tanaman menyebabkan perkembangan ilmu dan industri farmasi semakin berkembang (Li & Jing-Ke, 2017). Anjuran untuk mempelajari hikmah dibalik penciptaan tanaman telah dijelaskan dalam surat Al-An'am ayat 99, yang berbunyi:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِن طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ ۚ انْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۚ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

Artinya: “Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu **segala macam tumbuh-tumbuhan** maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. **Perhatikanlah** buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. **Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman.**” (QS. Al-An'am ayat 99)

Ayat di atas menunjukkan bukti-bukti kemahakuasaan Allah SWT. Ayat-ayat yang lalu mengarahkan manusia agar memandang sekelilingnya, supaya dia dapat sampai pada kesimpulan bahwa Allah SWT Maha Esa dan kehadiran hari Kiamat adalah keniscayaan. “Dan Dia” juga bukan selain-Nya “yang telah

menurunkan air” yakni dalam bentuk hujan yang deras dan banyak “dari langit, lalu Kami” yakni Allah “mengeluarkan” yakni menumbuhkan “disebabkan olehnya” yakni akibat turunnya air itu “segala macam-tumbuh-tumbuhan, maka Kami keluarkan darinya” yakni dari tumbuh-tumbuhan itu “tanaman yang menghijau”. Untuk lebih menjelaskan kekuasaan-Nya ditegaskan lebih jauh bahwa “Kami keluarkan darinya” yakni dari tanaman yang menghijau itu “butir yang saling tumpuk” yakni banyak, padahal sebelumnya ia hanya satu biji atau benih. Di bagian akhir ayat ini disebutkan “*unzhuru ila tsamarihi idza atsmara wa yan’ib. Perhatikan buahnya di waktu (pohonnya) berbuah, dan kematangannya*”. Perintah ini mendorong perkembangan Ilmu Tumbuh-tumbuhan (Botanik) yang sampai saat ini mengandalkan metode pengamatan bentuk luar seluruh organnya dalam semua fase perkembangannya (diambil dari komentar singkat dari penulis tafsir *al-Muntakhab*). Ayat tersebut ditutup dengan “*liqaumin yu’minun/ bagi kaum yang beriman*” maka ia ditutup demikian sebagai isyarat bahwa ayat-ayat ini atau tanda-tanda itu hanya bermanfaat untuk yang beriman (Shihab, 2002).

Alam memiliki berbagai macam tanaman yang seharusnya dapat dimanfaatkan secara optimal. Tanaman diciptakan beragam bentuk dan karakteristik, serta peranan dan manfaat yang terkandung di dalamnya pun juga beragam. Sebagaimana Allah SWT berfirman dalam QS. Asy-Syu’ara’ ayat 7-9, yang berbunyi:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً ۖ وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ ﴿٨﴾ وَإِنَّ رَبَّكَ لَهُوَ الْعَزِيزُ الرَّحِيمُ ﴿٩﴾

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya **Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?** Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda kekuasaan Allah. Dan kebanyakan mereka tidak beriman. Dan sesungguhnya Tuhanmu benar-benar Dialah yang Maha Perkasa lagi Maha Penyayang.” (QS. Asy-Syu’araa’:7-9).

Kata “ila/ke” pada firman-nya di awal ayat ini “*awalam yara ila al-ardh/apakah mereka tidak melihat ke bumi*” merupakan kata yang mengandung

makna “*batas akhir*”. Ia berfungsi memperluas arah pandangan hingga batas akhir, dengan demikian ayat ini mengundang manusia untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya memandang sampai mencakup seantero bumi, dengan aneka tanah dan tumbuhannya dan aneka keajaiban yang terhampar pada tumbuh-tumbuhannya (Shihab, 2002).

Kata “*zauj*” berarti “*pasangan*”. Pasangan yang dimaksud ayat ini adalah pasangan tumbuh-tumbuhan, karena tumbuhan muncul di celah-celah tanah yang terhampar di bumi, dengan demikian ayat ini mengisyaratkan bahwa tumbuh-tumbuhan pun memiliki pasangan-pasangan guna pertumbuhan dan perkembangannya. Kata “*karim*” antara lain digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Tumbuhan yang baik, paling tidak adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat (Shihab, 2002).

A. calamus merupakan tanaman yang sering digunakan sebagai bahan obat herbal. Bagian rimpang jeringau sering digunakan sebagai antimikroba (baik bakteri maupun jamur (Devi & Deepak, 2009)). Kandungan minyak atsirinya mampu menghambat pertumbuhan mikroba hingga membuat mikroba mengalami kematian sel (Khare, 2004).

Pertumbuhan mikroba yang tidak normal dalam tubuh manusia dapat menimbulkan penyakit. Salah satu penyakit yang disebabkan oleh mikroba yakni penyakit vaginitis (Bitew, *et al.* 2017). Penanganan penyakit vaginitis terus diteliti dan dikembangkan. Hal ini dilakukan agar dapat mengobati infeksi mikroba dalam tubuh secara maksimal. Setiap penyakit yang diturunkan oleh Allah SWT akan bersamaan dengan penawarnya (obat). Dalam HR. Ahmad dijelaskan bahwa Rasulullah SAW bersabda:

إِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزِلْ دَاءً إِلَّا وَأَنْزَلَ لَهُ دَوَاءً، جَهْلُهُ مَنْ جَهْلَهُ وَعَمَلُهُ مَنْ عَمَلَهُ

Artinya: “**Sesungguhnya Allah tidaklah menurunkan penyakit kecuali Dia turunkan pula obatnya bersama.** (Hanya saja) tidak mengetahui orang yang tidak mengetahuinya dan mengetahui orang yang mengetahuinya.” (HR. Ahmad 1/377, 413, dan 453. Dan hadits ini dishahihkan dalam Ash-Shahihah no 451).

Perkembangan industri farmasi semakin lama, semakin berkembang pesat. Peningkatan mutu obat untuk mencapai target spesifik pengendalian penyakit, terus dikembangkan. Untuk memperoleh hasil yang optimal dalam mengatasi berbagai penyakit yang terus berkembang, industri farmasi modern membuat teknologi nano sebagai penghantar obat menuju target. Nanopartikel merupakan partikel berukuran nano yang berperan dalam menghantarkan obat menuju target yang lebih spesifik, serta mengurangi efek samping obat (Mohanraj & Y. Chen, 2006).

2.1.2 Persebaran dan Klasifikasi *A. calamus*

Tanaman *A. calamus* memiliki berbagai jenis nama di setiap belahan dunia, antara lain yakni *flag root*, *sweet sedge*, *myrtle sedge*, *sweet myrtle*, *cinnamon sedge*, *gladdon*, *sweet cane*, *sweet rush*, *myrtle grass*, *sweet rooot* dan *myrtle flag* (Balakumbahan, *et al.* 2010). Sedangkan di Indonesia sendiri, tanaman ini dikenal juga dengan sebutan dringo (Rustini, 2010) atau lebih sering dikenal dengan jeringau (Anisah, dkk. 2014). Tanaman ini diduga berasal dari India. Tanaman ini juga dapat ditemukan di Eropa, Rusia Selatan, Asia Kecil Utara, Cina, Jepang, Burma, Sri Lanka, dan AS Utara (Balakumbahan, *et al.* 2010).

Klasifikasi tanaman *Acorus calamus* L. sebagai berikut (Rajput, *et al.* 2014):

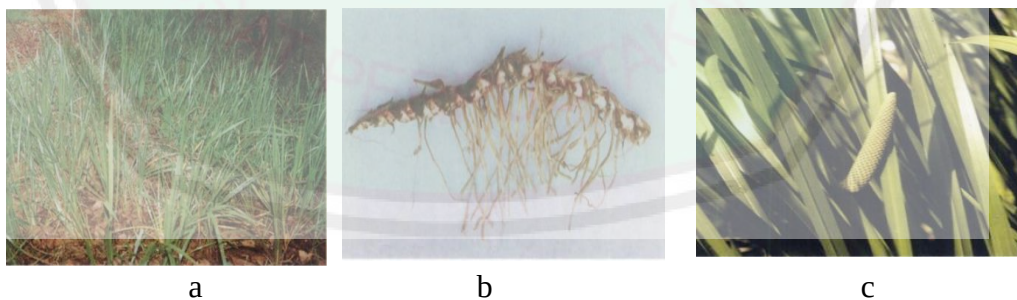
Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta (Vascular plant)
Superdivision	: Spermatophyta (Seed plants)
Division	: Magnoliophyta (Flowering Plants)
Class	: Liliopsida (Monocotyledons)
Subclass	: Arecidae
Order	: Arales
Family	: Acoraceae
Genus	: <i>Acorus</i> L.
Species	: <i>Acorus calamus</i>
Synonyms	: <i>Acorus asiaticus</i> Nakai: <i>Acorus terrestris</i> Spreng (Seidemann, 2005).

2.1.3 Morfologi

A. calamus atau yang sering disebut dengan tanaman “Sweet flag” merupakan tanaman monokotil tahunan yang hidup di lahan basah. Tanaman herba ini memiliki batang berupa stolon yang bercabang. *A. calamus* memiliki ciri khas rimpang aromatik berbentuk silindris dengan ketebalan lebih dari 2,5 cm. Bagian permukaan luar rimpang berwarna coklat keunguan hingga coklat terang, sedangkan bagian dalam rimpang berwarna putih (Gambar 1) (Balakumbahan, *et al.* 2010).

Daun *A. calamus* memiliki midvein tunggal yang menonjol. Karakter tersebut menjadi ciri pembeda dari *A. americanus*. Lebar daunnya berkisar 0,7 cm hingga 1,7 cm dengan rata-rata lebarnya sekitar 1 cm. Daun simpodial lebih pendek daripada daun vegetatif. Tanaman ini sangat jarang berbunga maupun berbuah. Panjang bunga jeringau berkisar 3 sampai 8 cm, berbentuk silinder berwarna coklat kehijauan dan ditutupi banyak duri bundar. Spadix memiliki panjang antara 4,9 cm dan 8,9 cm saat masa ekspansi (Gambar 1) (Balakumbahan, *et al.* 2010).

Buah berukuran kecil seperti buah beri mengandung beberapa biji. Perbungaan dari awal hingga akhir musim panas tergantung pada garis lintang daerah. Tumbuh liar di daerah berawa, dapat tumbuh hingga ketinggian 2000 m di Himalaya, Manipur, Bukit Naga dan di beberapa daerah di India Selatan (Balakumbahan, *et al.* 2010).



Gambar 1 a.) Tanaman *Acorus calamus* (kiri), b.) rimpang *Acorus calamus* (kanan) (Khare, 2004), c.) spadix *Acorus calamus* (Seidemann, 2005)

2.1.4 Senyawa Aktif dari Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

A. calamus mengandung senyawa antioksidan dan zat antimikroba yang terkenal digunakan sebagai obat herbal di India. *A. calamus* mengandung minyak atsiri yang tinggi. Analisa GC-MS Ekstrak etanol rimpang *A. calamus* memiliki mengandung minyak atsiri dengan komponen yang terdiri atas golongan monoterpene dan sequiterpene. Komponen tersebut terdiri dari (Tabel 1) (Rita, *et al.* 2017):

Tabel 1. Presentase Komponen Senyawa Aktif Rimpang *A. calamus*

Komponen Senyawa	Presentase Kandungan (%)
Euasarone	26,84
β -asarone	18,62
α -asarone	18,29
Shyobunone	15,74
Trans-methyl-iso-eugenol	7,68
(E)-3,7dimethyl-1,3,3-Octatriene (trans- β -Ocimene)	3,73
α -calacorene	3,34
Dehydroxy-iso-calamendiol	2,61
β -elemene	1,15
Linalool	1,07
Bicyclo-germakrene	0,93

Bahan aktif yang terdapat dalam minyak *A. calamus* yakni mengandung asarone (lebih dari 82%) yang merupakan golongan β -isomer. Bahan aktif lain yang terkandung di dalamnya yakni 5% calamenol, 0.4 % calamene, 1% calamenone, 0.3% eugenol, 1% methyl-eugenol, 0.2% alpha-pinene dan camphene. Tidak hanya itu saja, masih terdapat komponen lain, namun dengan kuantitas komponen yang rendah (Khare, 2004).

Pelarut yang digunakan dalam ekstrak rimpang *A. calamus* adalah pelarut etanol. Hastuti, dkk (2013) menyatakan bahwa etanol merupakan pelarut dari kelompok alkohol yang mampu mendegradasi dinding sel nonpolar lebih efektif

dibandingkan dengan pelarut lain. Berdasarkan data hasil pengamatan Barua, *et al.* (2014) dapat diketahui bahwa senyawa aktif ekstrak etanol *A. calamus* positif mengandung alkaloid, flavonoid, diterpen, triterpen, dan glikosida.

Devi & Deepak (2009) menyatakan bahwa minyak atsiri *A. calamus* mengandung banyak bahan senyawa kimia aktif. Kandungan senyawa utama dalam minyak atsiri yang berperan dalam aktivitas antimikroba yakni α -asarone dan β -asarone. Minyak atsiri diyakini memiliki aktivitas biologi dalam antifungi, anti-*yeast*, dan antibakteri. Hasil pengamatan zona hambat rimpang *A. calamus* terhadap pertumbuhan *E. coli* sebesar 20 mm dan 25 mm dibandingkan dengan obat kontrol streptomycin dengan diameter zona hambat sebesar 21 mm, sedangkan diameter zona hambat pada *C. albicans* sebesar 23 mm dan 25 mm dibandingkan dengan obat kontrol Amphotericin B sebesar 21 mm dan 22 mm.

2.1.5 Manfaat Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.)

Penduduk kuno Tiongkok menggunakan *A. calamus* untuk mengurangi pembengkakan dan mengobati sembelit. Dalam pengobatan Ayurveda, *A. calamus* merupakan bahan penting dalam ramuan herbal. Pengobatan Ayurveda India memanfaatkan rimpang *A. calamus* untuk mengatasi demam, asma, bronkitis dan sebagai obat penenang. Tak hanya itu saja, rimpang *A. calamus* juga digunakan untuk mengatasi sakit batuk (Balakumbahan, *et al.* 2010).

Pengobatan herbal Barat memanfaatkan *A. calamus* untuk mengobati masalah pencernaan seperti perut kembung, disfungsi pencernaan, dan kram perut. *A. calamus* dinilai berpotensi mengurangi gangguan asam lambung. *A. calamus* juga baik digunakan sebagai obat penenang, sehingga dapat digunakan untuk mengatasi epilepsi dan gangguan kejiwaan. Tanaman obat *A. calamus* ternyata juga dimanfaatkan oleh sebagian orang untuk bahan tambahan dalam pengolahan makanan. Rimpang kering dan bubuk memiliki rasa pedas, sehingga dapat digunakan sebagai pengganti jahe, kayu manis dan pala karena aromanya yang khas (Balakumbahan, *et al.* 2010).

Senyawa aktif dalam minyak atsiri *A. calamus* bekerja secara sinergis sebagai bahan karminatif, antispasmodik, dan antibakteri. rimpang jeringau

umumnya digunakan dalam pengobatan selesma usus, *indigestion*, sakit perut, disentri, penyakit pada saluran vagina, penyakit pada saluran urinogenital dan juga dapat digunakan untuk memurnikan ASI. Minyak atsiri pada kandungan rimpang jeringau dapat digunakan sebagai obat penenang dan analgesik. Kandungan asarone juga berpotensi dalam menghambat pertumbuhan mikobakterium penyebab penyakit TBC dan menunjukkan aktivitas antibakteri. Aktivitas β -asarone menunjukkan kemampuan mutagenik dalam bakteri (Khare, 2004).

2.2 Ekstraksi Melalui Metode Maserasi

Ekstraksi adalah proses penyarian senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman obat. Tujuan dilakukan ekstraksi yakni untuk memperoleh komponen kimia yang terkandung dalam simplisia. Tahapan yang dilakukan dalam ekstraksi antara lain yakni penyediaan serbuk simplisia, perendaman, penyarian, dan penguapan pelarut (Dirjen POM, 2000). Macam-macam metode ekstraksi secara sederhana antara lain maserasi, evalokasi, dialokasi, perkolasi, dan reperkolasi (Harborne, 1996).

Maserasi adalah metode ekstraksi padat cair yang paling umum digunakan. Tahapan ekstraksi diawali dengan perendaman sampel menggunakan pelarut yang sesuai pada suhu kamar. Sampel tersebut umumnya direndam selama 3-5 hari, di mana sesekali sampel diaduk agar analit larut lebih cepat. Proses ekstraksi dilakukan berulang-ulang (remaserasi) agar penyarian analit terjadi secara sempurna (Leba, 2017).

Kelebihan dalam menggunakan ekstraksi metode maserasi adalah tahapan dan alat yang digunakan sangat sederhana. Selain itu, metode ini baik digunakan untuk analit yang tahan terhadap panas maupun tidak. Namun, metode ini membutuhkan banyak pelarut (Leba, 2017). Etanol dan aseton merupakan pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi maserasi (Ginting, 2013).

Pelarut etanol bersifat polar, mudah dijangkau, banyak digunakan dalam proses ekstraksi, dan memiliki dua gugus dengan sifat kepolaran yang berbeda yakni gugus hidroksil (polar) dan gugus alkil (non polar). Berdasarkan sifat kedua

gugus tersebut menyebabkan beberapa senyawa dalam bahan yang ekstraksi dapat ditarik oleh etanol (Poeloengan, dkk., 2007).

2.3 Nanopartikel

Nanopartikel adalah partikel padat berukuran nanometer atau memiliki skala per 1000 mikron (Martien, dkk. 2012). Ukuran nanopartikel yang sangat kecil diharapkan memberikan efek yang besar pada sistem pengobatan. Allah SWT berfirman dalam QS. Yunus ayat 61 , yang berbunyi:

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٦١﴾

Artinya: “Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. Tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar **zarrah (atom)** di bumi ataupun di langit. Tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh).”(QS. Yunus: 61)

Ayat di atas berisi peringatan bahwa pengetahuan Allah SWT terhadap urusan manusia telah diatur secara sempurna dan detail yang telah tercatat dalam *Lauh Mahfuzh*. Tidak hanya perkara yang besar, melainkan juga “Dari yang seberat *dzarrah pun*”. Makna kata “*dzarrah*” menurut al-Jauhar al-Fard merupakan suatu benda atau partikel yang tidak dapat dibagi kembali karena ukurannya yang sangat kecil (halus) (Hamka, 1999). Ukuran partikel “*dzarrah*” yang sangat kecil atau halus ini mengimplisitkan seperti nanopartikel yang berukuran sangat kecil dan halus, bahkan membutuhkan alat bantu SEM untuk melihat dan mengukur morfologinya.

Umumnya nanopartikel berukuran 10-1000 nm. Keuntungan menggunakan nanopartikel sebagai sistem penghantar obat yakni memudahkan pencapaian obat

pada target yang dituju, mengontrol distribusi pelepasan obat untuk meningkatkan efektivitas obat dan mengurangi efek samping, serta enkapsulasi obat relatif tinggi sehingga proses tersebut tanpa melalui reaksi kimia. Selain itu, sistem penghantar obat menggunakan nanopartikel dapat diaplikasikan melalui pengobatan secara parenteral, nasal, intraokuler, oral, dan lain sebagainya (Mohanraj & Y. Chen, 2006).

Nanocarrier merupakan suatu teknologi berukuran nano ($\pm 1\mu\text{m}$) yang memiliki potensi dalam menghantarkan obat. Nanocarrier dibedakan menjadi beberapa jenis antara lain nanokristal dan nanosuspensi, *nanotube* dan *nanowire*, nanopartikel keramik, liposom, nanopartikel lipid padat, nanopartikel polimerik, nanopartikel hidrogel, *copolymerized peptide nanoparticles* (CPP), misel polimerik, dan dendrimer (Gambar 2) (Rawat, et al. 2006) :

1. Nanokristal dan nanosuspensi

Nanokristal adalah kumpulan partikel dalam jumlah besar yang membentuk kristal. Terdiri dari kandidat obat yang dilapisi oleh surfaktan atau kombinasi surfaktan. Teknik produksi nanokristal dikenal sebagai nanoionisasi. Untuk menghasilkan nanosuspensi, serbuk obat didispersikan dalam larutan surfaktan serta diaduk dengan kecepatan tinggi. Makrosuspensi yang diperoleh kemudian dihomogenisasi menjadi nanosize dengan penggilingan basah, homogenisasi dengan tekanan tinggi, nanokristalisasi dari larutan jenuh, dan *spray drying*. Ukuran nanokristal memungkinkan penghantaran obat dengan aman dan efektif saat melalui kapiler.

2. *Nanotube* dan *nanowire*

Nanotube adalah kumpulan partikel berbentuk tabung yang disusun oleh lembaran atom. Strukturnya seperti benang dalam ukuran nano. Memiliki karbon berdinding tunggal. *Nanocarrier* jenis ini memiliki kelebihan dalam menghantarkan gen atau asam nukleat melalui pelapisan *nanotube* dengan polimer asam ribonukleat atau serum albumin sapi untuk mengurangi hidrofobisitasnya.

3. Nanopartikel keramik

Nanopartikel keramik terbuat dari senyawa anorganik seperti silika, titania, dan alumina. Ukuran nanopartikel jenis ini < 50 nm, ukuran partikel tersebut memudahkan partikel dalam menghindari sistem retikuloendotelial (RES) tubuh. Nanopartikel ini memberikan perlindungan yang baik bagi protein, enzim, dan obat-obatan terhadap denaturasi pH eksternal dan suhu karena proses pelepasannya tidak melalui *swelling* dan perubahan porositas dengan perubahan pH. Kegunaan nanopartikel silika memiliki potensi dalam transeksi DNA. Selain itu, nanopartikel jenis ini juga efektif dalam penghantaran protein dan gen.

4. Liposom

Liposom merupakan partikel penghantar dengan model pengkelatan dari fosfolipid alami maupun sintesis *bilayer*. Liposom memiliki keunggulan dalam karakter amfifilik, biokompatibilitas, dan kemudahan dalam modifikasi permukaan yang dapat disesuaikan dengan karakter obat. Dalam pemanfaatannya, liposom banyak digunakan di bidang biologi, biokimia, dan farmasi. Liposom dapat menghantarkan obat dan gen menuju target yang spesifik.

5. Nanopartikel lipid padat

Nanopartikel lipid padat merupakan partikel berukuran 50-1000 nm yang terbuat dari lipid padat. Partikel ini dapat terdistribusi dengan baik dalam air maupun larutan surfaktan. Partikel ini terdiri dari inti hidrofobik padat yang memiliki lapisan monolayer fosfolipid. Inti tersebut mengandung obat yang dilarutkan dalam lipid padat yang dilelehkan. Rantai hidrofobik fosfolipid tertanam dalam matriks lemak. Nanopartikel ini tidak beracun dibandingkan dengan nanopartikel polimer dan dapat digunakan sebagai agen transeksi antivirus yang efektif. Pemberian nanopartikel ini dapat melalui parenteral, pulmonal, dan topikal.

6. Nanopartikel polimerik

Nanopartikel polimerik terbuat dari polimer sintesis maupun semi sintesis berukuran 10-1000 nm. Bahan polimer memiliki sifat yang biokompatibilitas, bidegradabilitas, bioavailabilitas, mudah dilakukan modifikasi permukaan, dan fungsionalisasi polimer yang mudah. Selain itu, nanopartikel polimerik bersifat stabil sehingga memudahkan pengendalian penghantaran obat. Nanopartikel polimer dapat terdegradasi secara biologis dan berperan dalam pengiriman antigen ke sel dendritik.

7. Nanopartikel hidrogel

Nanopartikel hidrogel merupakan sistem polimer yang dibuat melalui penyusunan polimer alami dengan proses *cross link*. Nanopartikel hidrogel telah digunakan dalam pengiriman antigen, DNA, dan oligonukleotida antisense yang efektif. Hidrogel responsif terhadap perubahan pH dan suhu. Bersifat kompatibel.

8. *Copolymerized peptide nanoparticles* (CPP)

Modifikasi lain dari sistem berbasis polimer adalah copolimerisasi partikel nano peptida. Sistem penghantaran untuk pengiriman peptida terapeutik sebagai konjugat obat-polimer di mana bagian obat terikat secara kovalen pada penghantar obat (terperangkap). Sistem ini perlu dieksplorasi lebih lanjut untuk pengiriman molekul (peptida dan protein) secara efektif.

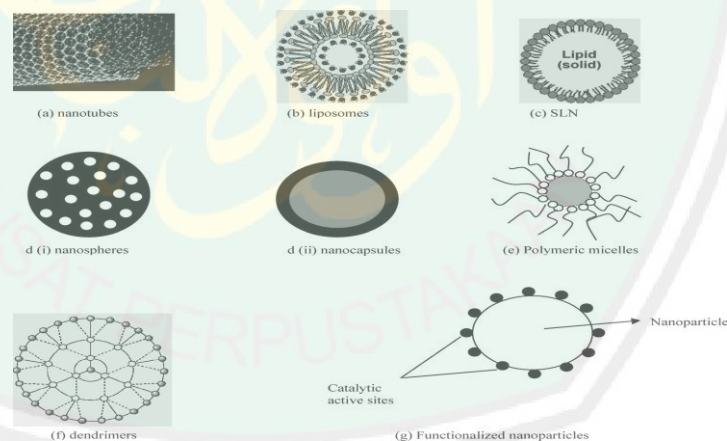
9. Misel polimerik

Misel polimerik merupakan co-polimer blok ampifilik seperti Pluronik (*copolymer block polyoxyethylene polyoxypropylene*) yang berasosiasi dengan larutan membentuk misel. Konjugasi dengan ligan seperti antibodi dapat meningkatkan potensi penargetan misel. Immunomicelles merupakan suatu pendekatan antibodi terkonjugasi

misel polimer yang mengandung obat anti tumor, sehingga efektif dalam pengiriman menuju area tumor.

10. Dendrimer

Dendrimer merupakan serangkaian percabangan senyawa makromolekul yang berada disekitar inti di bagian dalam. Makromolekul ini dapat dikendalikan bentuk dan ukurannya sesuai kebutuhan. Dendrimer dibuat dari monomer tipe Abn. Dendrimer terdiri dari berbagai jenis polimer seperti poliamidoamin (PAMAM), poli (asam L-glutamat), polietilenamin, polipropilenamin, dan polietilen glikol. Keuntungan menggunakan dendrimer sebagai sistem penghantar obat yakni kemudahan dalam memodifikasi bentuk dan proses pembuatan yang mudah. *Nanocarrier* jenis ini dapat digunakan untuk penargetan sel kanker spesifik dan mampu melakukan transfeksi gen, serta menunjukkan efisiensinya dalam transportasi melalui transepitel.

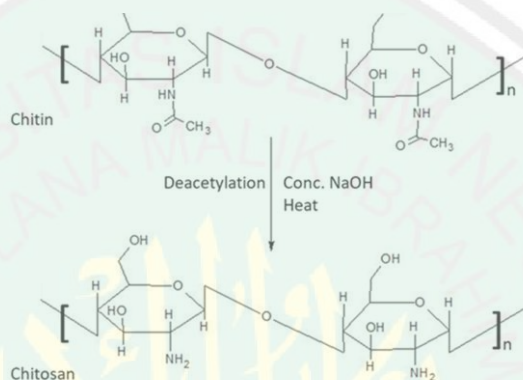


Gambar 2. Tipe- tipe *Nanocarrier* atau Nanopartikel sebagai Sistem Penghantar Obat (Rawat, *et al.* 2006).

2.3.1 Nanopartikel Kitosan

Kitosan merupakan poli[β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose] hasil dari proses deasetilasi alkalin dari kitin (Gambar 3). Kitin merupakan bahan organik

yang melimpah dengan jumlah terbanyak kedua setelah selulosa. Kitin diperoleh dari eksoskeleton hewan krustasea, moluska, dan serangga. Selain itu, kitin juga merupakan polimer fibrilar utama pada dinding sel jamur (Roberts, 1992). Ketersediaan kitosan di alam sangat melimpah. Polime ini banyak dimanfaatkan di bidang farmasetika karena mudah terurai (*biodegradable*), tidak beracun dan dapat diterima oleh tubuh atau biokompatibel (Kaban, dkk. 2006).

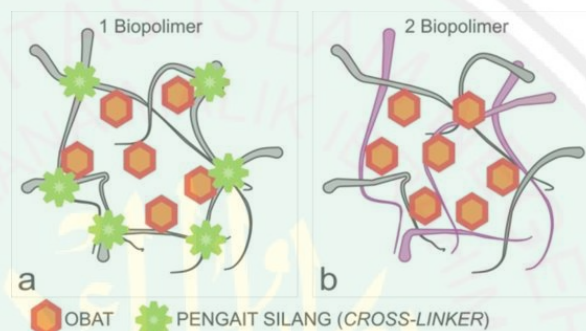


Gambar 3. Deasetilasi Kitin Menjadi Kitosan (Mohammed, *et al.* 2017).

Kitosan merupakan kelompok polisakarida alami. Kitosan mempunyai gugus hidroksi dan amino, sehingga dapat dimanfaatkan untuk modifikasi kitosan secara kimia. Dalam proses modifikasi kitosan dengan agen *crosslink* umumnya dipadukan dengan Tripolifosfat (TPP) agar dapat meningkatkan daya adsorpsinya, serta TPP bersifat non toksik (Kurniasih, dkk. 2018). Natrium tripolifosfat (NaTPP) adalah senyawa yang bersifat higroskopis, berbentuk granul berwarna putih. TPP mudah larut dalam air, namun tidak larut dalam etanol. TPP berperan sebagai anion multivalen. Penambahan TPP dalam bahan pembuatan nanopartikel akan menghasilkan nanopartikel yang stabil (Lin, *et al.* 2008).

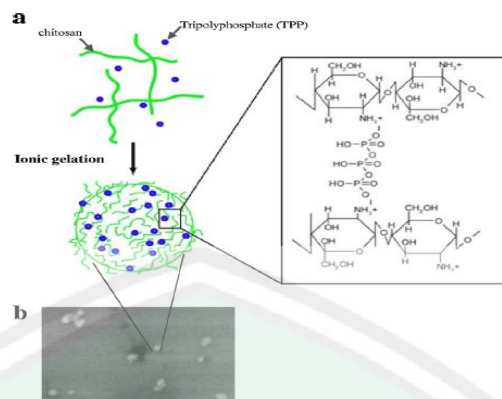
Nanopartikel kitosan disintesis melalui metode gelasi ionik dengan *sodium triphosphat* (STPP) sebagai polianion (De Paz, *et al.* 2011). Kitosan banyak dipilih sebagai bahan pengkelat nanopartikel dikarenakan mengandung nitrogen tinggi (6,89%) (Rabea, *et al.* 2003). Nanopartikel kitosan melalui metode gelasi ionik menggunakan proses ikat silang (*cross-linking*). Proses tersebut melibatkan interaksi antara molekul kitosan (polikation) dan tripolifosfat (polianion) (Koukaras, *et al.* 2012). Proses terjadinya nanopartikel melalui metode gelasi ionik

terdapat 2 jenis yakni sistem 1 biopolimer dan 2 biopolimer. Sistem 1 biopolimer memiliki muatan yang berbeda dengan obat yang terjerap, sedangkan sistem 2 biopolimer memiliki gugus dengan sifat yang berbeda sehingga obat dapat terjerap dalam polimer (Gambar 4) (Martien, dkk. 2012). Nanopartikel kitosan sebagai sistem penghantar obat memiliki kelebihan dalam ukuran dan karakteristik permukaan partikel yang berperan penting dalam melintasi membran sel.



Gambar 4. Sistem Biopolimer Metode Gelasi Ionik dalam Menjerap Obat (Martien, dkk. 2012).

Keuntungan menggunakan nanopartikel kitosan yakni tergolong polimer mukoadesif alami bersifat biokompatibel, toksisitas rendah dan *biodegradable*. Partikel ini dapat menghantarkan bahan terapeutik seperti peptida, protein, vaksin, DNA, dan obat-obatan menuju target pengobatan baik melalui parenteral maupun nonparenteral. Selain itu, nanopartikel kitosan bersifat lebih stabil, permeabel, dan bioaktif (Ahmed & Bader, 2016). Hal ini dikarenakan proses ikatan silang (*cross link*) antara oligomer kitosan dengan polianion tripolifosfat menghasilkan stabilitas ikatan yang kuat (Koukaras, *et al.* 2012) (Gambar 5).



Gambar 5. Formasi Kitosan-Tripolifosfat Kompleks Melalui Metode Gelasi Ionotropik (a.) Skema dari Kompleks Kitosan-TPP Membentuk Ikatan yang kuat dan (b.) Gambar AEM, ukuran 200 nm (De Paz, *et al.* 2011).

Ultrasonikasi atau homogenitas kecepatan tinggi merupakan metode yang memanfaatkan gelombang mekanik longitudinal dengan frekuensi 20kHz untuk memecah ion-ion metal dalam molekul, sehingga diperoleh kristal dalam waktu singkat dan menghindari adanya oksidasi ion-ion metal yang mengakibatkan terbentuknya partikel amorf. Pemanfaatan gelombang ultrasonikasi untuk sintesis nanopartikel dinilai sangat efektif karena pemanfaatannya pada efek kavitasi akustik. Efek kavitasi menyebabkan terdispersinya fase minyak yang mengandung nanosfer dalam fase air, sehingga nanosfer dapat terdispersi stabil. Hal-hal yang mempengaruhi kemampuan ultrasonik yakni karakteristik ultrasonik seperti karakteristik produk (seperti viskositas dan tegangan permukaan), frekuensi, daya, amplitudo, intensitas, dan kondisi sekitar seperti suhu dan tekanan (Williams, 1983).

Karakterisasi nanopartikel dalam penelitian ini melalui analisis PSA (*Particle Siza Analyzer*) dan SEM (*Scanning Electron Microscopy*). Ukuran nanopartikel dan zeta potensial dianalisa menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) dengan prinsip *dynamic light scattering* (Choiri, *et al.*, 2016). SEM digunakan untuk melihat ukuran dan morfologi dari nanopartikel (Pal, *et al.* 2011).

Pelarut DMSO dalam penelitian ini digunakan sebagai pelarut nanopartikel rimpang *A. calamus* tersalut kitosan dan ekstrak rimpang *A. calamus*. *Dimethyl*

sulfoxide (DMSO) merupakan suatu produk dari industri kayu. Pelarut ini secara luas digunakan sebagai pelarut dalam sintesis organik dan dimanfaatkan dalam industri farmasi karena harga yang terjangkau, stabilitas yang baik, dan toksisitas rendah. DMSO diproduksi oleh sebuah industri melalui oksidasi *Dimethyl sulfide* (DMS) dengan nitrogen dioksida atau oksigen. Pelarut ini termasuk pelarut polar dan cairan tampak bening. Pelarut polar ini memiliki kemampuan menstabilkan zat antara dan titik didihnya tinggi 189°C (327°F), serta titik beku 18,5°C (65,3°F) (Wu, 2018).

2.4 Mikroba Uji

Mikroba merupakan makhluk hidup berukuran mikroskopis dan sebagian besar tidak dapat terlihat secara kasat mata. Adanya mikroba di muka bumi ini memiliki keterkaitan dengan kehidupan manusia. Sebagian mikroba memiliki manfaat bagi kehidupan manusia, sebaliknya mikroba juga dapat merugikan bagi manusia (Irianto, 2013). Penciptaan makhluk di muka bumi ini telah Allah SWT hadirkan dalam bentuk dan ukuran yang sesuai. Sesuai dengan firman Allah SWT dalam QS. Al-Furqon ayat 2 yang berbunyi:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ۝٢

Artinya : “yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan(Nya), dan Dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya.” (QS. Al-Furqon ayat 2)

Menurut Shihab (2002) dalam tafsir Al-Mishbah bahwa Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu yang ada di alam semesta ini dan Allah SWT juga membuat variasi atas penciptaan-Nya. Sehingga terciptanya makhluk dengan karakter dan ukuran yang berbeda. Seperti halnya pada penciptaan mikroba *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* yang memiliki bentuk, ukuran, dan fungsi yang beranekaragam.

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus termasuk jenis bakteri Gram positif dengan bentuk sel bulat (coccus). Umumnya koloni *Staphylococcus* berbentuk seperti buah anggur (Gambar 6). Diameter sel *S. aureus* sekitar 0,7-1,2 μm , tidak menghasilkan spora, dan tergolong fakultatif anaerobik (Steven, *et al.*, 2015). Terdapat pula *Staphylococcus* yang tergolong bakteri aerobik atau mikroaerofilik. *Staphylococcus* mudah ditumbuhkan diberbagai media. Bakteri jenis ini mencerna makanan melalui fermentasi karbohidrat, serta mampu menghasilkan pigmen berwarna putih hingga kuning tua. Organisme dapat tumbuh optimal pada suhu 37°C, sedangkan suhu yang tepat untuk menghasilkan pigmen yakni pada suhu 20°C-25°C. Koloni yang terbentuk pada permukaan media agar padat berbentuk bulat, permukaan halus, dan berkilau (Brooks, *et al.*, 2007).

Bakteri kelompok *Staphylococcus* termasuk mikroba flora normal dalam tubuh manusia. Umumnya dapat ditemukan di area kulit dan membran mukosa. Dalam kondisi abnormal, bakteri ini dapat merugikan dalam tubuh seperti infeksi patogenik, terjadinya supurasi, terbentuk abses dan sepsis. Spesies utama yang sering menyebabkan penyakit yakni *S. aureus*, *S. saprophyticus*, dan *S. epidermidis*. Kelompok *Staphylococcus* yang tergolong patogen dan sering menjadi penyebab timbulnya penyakit adalah *S. aureus* (Brooks, *et al.*, 2007).

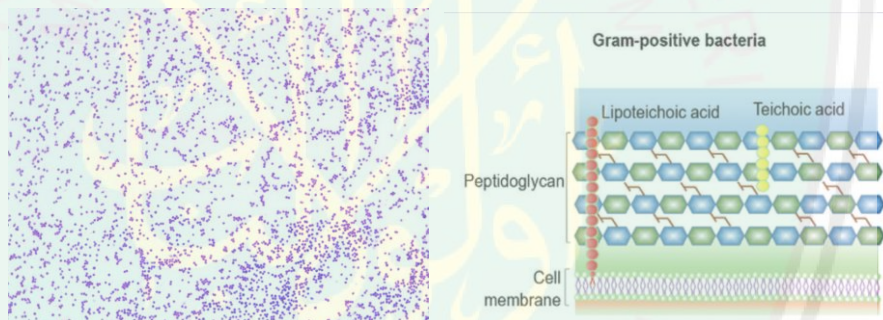
Klasifikasi dari bakteri *Staphylococcus aureus* adalah (Rosenbach, 1884):

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Bacillales
Family	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Keberadaan *S. aureus* pada kondisi tertentu menjadi patogen pada manusia. Sebanyak 23% perempuan yang terkena infeksi mukosa vagina terjadi karena *S. aureus*. Vaginitis merupakan peradangan di area vagina yang menjadi penyebab

terjadinya keputihan abnormal pada wanita (Steven, *et al.*, 2015). Vaginitis terjadi akibat berkurangnya jumlah *Lactobacilli*. Jika jumlah *Lactobacilli* berkurang, maka pH lingkungan vagina akan meningkat sehingga mendukung pertumbuhan bakteri anaerobik dan anaerobik fakultatif seperti *E. coli*, *S. aureus* dan Grup B *Streptococcus* secara berlebih. Kondisi inilah yang memicu peradangan di area vagina (Carolina, *et al.*, 2016).

S. aureus adalah bakteri yang mudah didapatkan melalui isolasi endometritis wanita. Dalam tubuh orang normal, terdapat 40% *S. aureus* yang tersebar di beberapa area tubuh. *S. aureus* memiliki karakteristik yang berbeda dari mikroba lain, yakni adanya reseptor yang memudahkan untuk melintasi membran sel inang serta protein matriks (misalnya fibronektin dan kolagen) untuk memudahkannya melekat pada tubuh inang. Memiliki kemampuan untuk memproduksi enzim lipase untuk memecah jaringan inang dan memudahkan proses invasi (Irianto, 2013).



Gambar 6. Morfologi *S. aureus* Perbesaran Total 10× (Jumaah, *et al.*, 2014) {kiri} dan Struktur Dinding Sel Bakteri Gram Positif (Liu, *et al.*, 2019) {kanan}

2.4.2 *Escherichia coli*

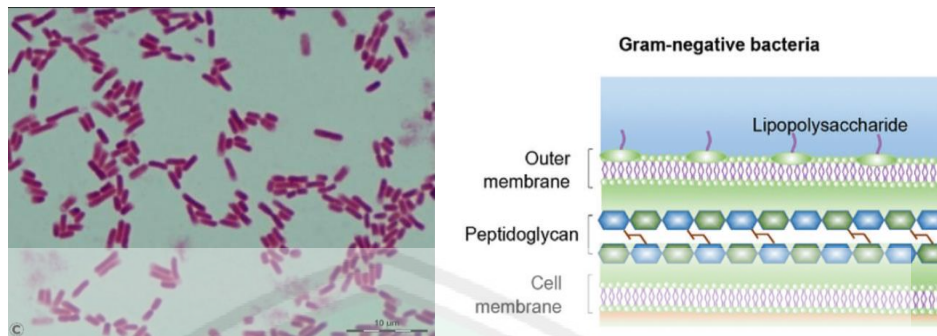
E. coli memiliki 3 lapisan envelop yakni membran sitoplasma, peptidoglikan, dan membran luar. Memiliki peptidoglikan kaku yang membentuk tubuh bakteri (Reshes, *et al.* 2008). Susunan dinding sel bakteri Gram negatif lebih kompleks dibandingkan dengan bakteri Gram positif karena tersusun atas 3 lapisan. Lapisan penyusun dinding sel bakteri Gram negatif yakni lapisan luar lipoprotein, lapisan tengah lipopolisakarida yang berperan menghalangi masuknya bahan bioaktif antibakteri, dan lapisan dalam berupa peptidoglikan dengan kandungan lipid tinggi (11-12%) (Jawetz, *et al.*, 2005).

E. coli termasuk bakteri Gram negatif tergolong fakultatif anaerob atau aerob. Bentuk sel *E. coli* yakni silindris pendek (Purwanti & Ressi, 2016) (Gambar 7). Permukaan koloni *E. coli* berbentuk cembung dan halus (Brooks, *et al.* 2007). *E. coli* mudah diperoleh melalui isolasi endometritis wanita (Irianto, 2013). *E. coli* termasuk flora normal yang mudah ditemukan di area usus besar, serviks, dan vagina (Pelczar & E.C.S. Chan, 2009).

Klasifikasi dari bakteri *Escherichia coli* yakni (Faner, *et al.* 2017):

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Species	: <i>Escherichia coli</i>

Bakteri *E. coli* mudah ditemukan berkoloni di usus besar, namun pertumbuhan bakteri yang meningkat pada saluran pencernaan atau pertumbuhan bakteri di luar area flora normal *E. coli* dapat bersifat patogen. *E. coli* dapat menghasilkan racun enterotoksin. Hal tersebut yang menjadi salah satu penyebab terjadinya diare (Purwanti & Ressi, 2016). Bakteri *E. coli* termasuk salah satu penyebab infeksi saluran kemih. Gejala dari infeksi saluran kemih antara lain keluhan sering berkemih, piuria, disuria, dan hematuria. Selain itu, infeksi pada saluran kemih bagian atas menyebabkan nyeri pinggang. (Brooks, *et al.* 2007).



Gambar 7. Morfologi *E. coli* Perbesaran Total 1000×

(<https://www.microbiologyinpictures.com/>) {kiri} dan Struktur Dinding Sel Bakteri Negatif (Liu, *et al.*, 2019) {kanan}

2.4.3 *Candida albicans*

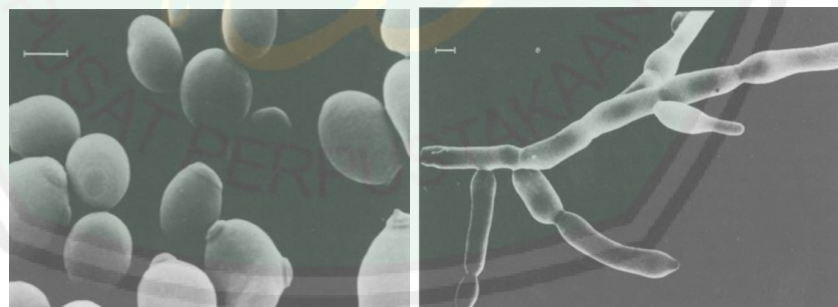
Candida albicans pada umumnya tergolong kelompok *yeast* dan memiliki filamen. Sel *C. albicans* berbentuk oval dan memiliki ukuran diameter sel yang beragam. Hifa berfilamen pada fungi ini berdiameter sekitar 2 μm , memiliki dinding sel dengan sisi paralel, memiliki pseudohifa berfilamen, dan terjadi penyempitan di persimpangan septa yang sering disebut dengan leher ibu tunas (Gambar 8). Memiliki formasi septa cincin yang menunjukkan terjadinya proses pembelahan sel antara leher ibu tunas dari pseudohifa dengan tunas hifa. *C. albicans* juga memiliki zona transisi fenotipik dari berwarna putih menjadi berwarna putih kusam. Sel putih tumbuh dengan koloni berwarna putih mengkilap, sedangkan pada sel berwarna putih kusam memiliki koloni yang tumbuh dengan permukaan datar, kasar, dan berwarna lebih gelap. Sel *C. albicans* berwarna putih kusam lebih memiliki kemampuan dalam berkonjugasi (Prasad, 2017).

Klasifikasi dari *yeast Candida albicans* yakni sebagai berikut (Guarro, *et al.* 1999):

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Ascomycota
Class	: Saccharomycetes
Order	: Saccharomycetales
Family	: Saccharomycetaceae
Genus	: <i>Candida</i>
Species	: <i>Candida albicans</i>

Candida merupakan spesies *yeast* dengan spektrum luas di lingkungan sekitar. Organisme ini melakukan simbiosis komensalisme dengan saluran genetalia wanita, kulit, dan saluran pencernaan. Spesies utama yang sering menimbulkan penyakit dalam tubuh yakni *C. albicans*. Meskipun kemampuan invasi organisme ini rendah, namun resistensi flora normal *C. albicans* dalam tubuh terhadap antibiotik atau penurunan fungsi imun secara drastis dapat menimbulkan infeksi. (Irianto, 2013). Infeksi kandidiasis vulvovaginal 75% terjadi pada wanita. Lebih dari 90% infeksi kandidiasis vulvovaginal disebabkan oleh *C. albicans* (Marchaim, *et al.* 2012).

Sebagian besar penyebab terjadinya vulvovaginitis dikarenakan adanya infeksi *Candida albicans* pada area vagina secara berlebihan. Hal ini dapat terjadi ketika pH lingkungan meningkat (basa). Selain itu, dapat terjadi akibat faktor diabetes, kadar progesteron, pengaruh antibiotik dan kehamilan. Pada pasien Diabetes Melitus memiliki kadar gula dalam darah dan urin di atas normal, sehingga dapat meningkatkan jumlah glikogen dalam epitel vagina (Cassone, *et al.*, 2014). Umumnya *yeast* penyebab kandidiasis menghasilkan blastospora (blastokonidia) untuk melakukan transmisi dan kolonisasi di area vagina, kemudian membentuk miselia (hifa) (Sobel, 2007).



Gambar 8. Morfologi Sel *C. albicans* (kiri) dan pseudohifa (kanan) bars=2 μm (Prasad, 1991)

2.5 Antimikroba

Antimikroba adalah suatu zat yang memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan mikroba, mempengaruhi aktivitas biologis dan perkembangbiakan mikroba, bahkan dapat menyebabkan kematian sel mikroba. Mekanisme

antimikroba terbagi menjadi 2 macam, antara lain bakterisidal dan bakteriostatik. Mekanisme antimikroba secara bakterisidal merupakan kemampuan antimikroba dalam membunuh sel mikroba dengan cara merusak dinding sel mikroba. Mekanisme antimikroba secara bakteriostatik yakni kemampuan antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroba, sehingga sistem imun tubuh inang memiliki waktu lebih lama untuk melakukan perlawanan terhadap infeksi (Irianto, 2013). Terdapat berbagai macam mekanisme antimikroba sebagai agen antimikroba, antara lain yakni menghambat penyusunan dinding sel mikroba, merusak atau mengganggu integritas membran sel, menghambat biosintesis sintesis protein, dan menghambat kerja enzim.

Pertama, mekanisme antimikroba dengan cara menghambat penyusunan dinding sel. Struktur tubuh mikroba terbentuk dan terlindungi matriks selnya karena adanya dinding sel. Pelisisan dinding sel dapat mengakibatkan keluarnya matriks sel, sehingga dapat menyebabkan kematian sel. Beberapa jenis antibiotik yang memiliki mekanisme antimikroba melalui lisis dinding sel adalah penisilin, basitrasin, vankomisin, fosfomisin, dan sikloserin (Radji, 2010). Sefalosporin dan penisilin dapat menghambat aktivitas enzim transpeptidase. Selain itu, basitrasin dan novobison melakukan penghambatan sintesis peptidoglikan pada tahap awal pembentukan dinding sel, sehingga memicu terjadinya pelisisan dinding sel mikroba (Harti, 2012).

Kedua, mekanisme antimikroba dengan merusak integritas dari membran sel mikroba. Fungsi membran sel mikroba adalah mengatur jalur penyaluran molekul yang keluar dan masuk sel mikroba. Selain itu, membran sel juga berperan sebagai tempat terjadinya aktivitas biologis sel, seperti biosintesis dan respirasi sel (Radji, 2010). Dengan adanya zat antimikroba dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan sel, bahkan dapat mengakibatkan terjadinya kematian sel (Pelczar & E.C.S. Chan, 2009). Berikut merupakan kelompok antibiotik yang memiliki mekanisme dalam mengganggu integritas membran yaitu poliena (contohnya amphotericin B), makrolida, polimiksin, dan nistatin (Radji, 2010). Nistatin, amphotericin B, ketoconazole, dan miconazole menyebabkan kerusakan membran plasma pada jamur dengan cara mengikat sterol membran plasma, sehingga terjadi

pelisisan membran plasma dan pelepasan matriks sel. Selain itu, polimyxin B juga dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma dengan cara melekat pada fosfolipid membran (Harti, 2012).

Ketiga, mekanisme antimikroba dengan cara menghambat proses sintesis protein. Proses replikasi DNA dan sintesis protein (transkripsi DNA dan translasi mRNA) berperan penting dalam siklus hidup suatu makhluk hidup (Radji, 2010). Aktinomisin dapat membentuk suatu kompleks dengan DNA dan menyebabkan aktivitas RNA polimerase terhambat (Harti, 2012). Beberapa contoh antibiotik yang dapat menghambat sintesis protein adalah gentamisin, streptomisin, kloramfenikol, klindamisin, tetrasiklin, rifampisin, dan eritromisin (Radji, 2010). Golongan amino-glikosida dapat menyebabkan kesalahan dalam penerjemahan kode genetik (Harti, 2012).

Keempat, mekanisme antibiotik dalam menghambat aktivitas enzim. Kerja enzim dapat dihambat oleh beberapa jenis zat kimia, sehingga dapat menyebabkan kematian sel. Hal ini disebabkan oleh terhambatnya kerja enzim menyebabkan metabolisme mikroba terganggu (Pelczar & E.C.S. Chan, 2009). Jika kerja enzim terhambat, maka sintesis metabolit esensial dalam sel juga akan terhambat. Penghambatan aktivitas enzimatis dapat dilakukan dengan adanya substansi (antimetabolit) yang memiliki bentuk mirip dengan substansi enzim. Contohnya yakni pada penghambatan secara kompetitif antara antimetabolit *sulfanilamide* dan PABA (*para-aminobenzoic acid*) pada mikroba. *Sulfanilamide* berperan mengganggu proses pembentukan asam folat oleh PABA sehingga pertumbuhan sel terhenti. Terganggunya pembentukan asam folat menyebabkan sintesis basa purin dan pirimidin terhambat (Harti, 2012).

2.6 Metode Pengujian Secara *In Vitro*

2.6.1 Metode Difusi Kertas Cakram (*Kirby-Bauer*)

Metode difusi kertas cakram atau *disk-diffusion method* (*Kirby-Bauer Test*). Prinsip dari metode difusi kertas cakram ialah difusi antimikroba terhadap media yang telah diberi kultur mikroba. Aktivitas antibiotik memiliki 3 kategori yaitu rentan, intermediet, dan resisten (Harti, 2012).

Metode difusi kertas cakram dilakukan dengan cara menempatkan kertas cakram di permukaan agar padat, lalu diukur besar zona hambat yang terbentuk. Namun, kekurangan dari metode ini adalah tidak dapat diketahui aktivitas bakterisidal antimikroba (Harti, 2012). Potensi suatu zat antimikroba dalam menghasilkan zona hambat terdapat empat kategori, antara lain yakni kategori lemah, sedang, kuat dan sangat kuat. Penentuan kategori potensi zona hambat dapat dilihat dari luas diameter zona hambat yang dihasilkan (Tabel 2).

Tabel 2. Kategori Zona Hambat Mikroba

Diameter	Kategori
≥ 20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

Sumber : A'iana (2017)

2.6.2 Metode Dilusi

Prinsip metode dilusi cair merupakan metode pengenceran beringkat dari konsentrasi antibiotik (*serial dilution*). Uji antimikroba menggunakan metode dilusi cair memiliki 2 tahap pengujian yaitu *Minimal Inhibition Concentration* (MIC) atau Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan dilanjutkan dengan uji konfirmasi melalui *Minimal Killing Concentration* (MKC) atau Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode uji KHM adalah metode pengenceran bertingkat konsentrasi antibiotik dan diinokulasikan mikroba uji. Kemudian, dilakukan inkubasi dan diamati pertumbuhan mikroba setelah inkubasi berdasarkan kekeruhan media cair. Dari uji KHM diamati konsentrasi antibiotik terendah yang menghambat pertumbuhan mikroba (suspensi terlihat jernih). Setelah positif uji KHM, kemudian dilakukan konfirmasi jumlah mikroba melalui kultur suspensi dari tabung positif KHM pada media agar padat. Dikatakan KBM positif bila diperoleh cawan tanpa adanya pertumbuhan mikroba (Harti, 2012).

2.7 Standar Uji Aktivitas Antimikroba berdasarkan CLSI

Nilai *breakpoints* adalah nilai *range* yang digunakan dalam penentuan konsentrasi antibiotik pada uji kepekaan apakah bakteri yang diuji masuk dalam kategori resisten, intermediate atau sensitif. Nilai *breakpoints* ini untuk metode difusi agar dan dilusi agar berbeda. Tiap-tiap spesies bakteri juga mempunyai atau bahkan juga sama nilai *breakpoints*-nya. Nilai *breakpoints* dapat dilihat pada *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) dulunya bernama *National Commite For Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (Sariadji & Masri, 2019). Standar kepadatan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* mengacu pada CLSI (2012) M02-A11. Uji difusi cakram yang dilakukan mengacu pada CLSI (2016) supplement M100S. Uji kadar hambat minimum *S. aureus* dan *E. coli* mengacu pada CLSI (2016) supplement M100S, sedangkan uji kadar hambat minimum *C. albicans* mengacu pada NCCLS (2002) document M27-A2.

2.8 Mekanisme Aktivitas Antimikroba

2.8.1 Aktivitas Antimikroba Nanopartikel Kitosan

Pencegahan dan penyembuhan infeksi yang disebabkan oleh bakteri pada umumnya secara medis ditangani dengan cara pemberian antibiotik. Namun, pemberian antibiotik berpotensi menyebabkan akuisisi mutasi bakteri sehingga bakteri resisten terhadap beberapa antibiotik. Untuk membuat antibiotik yang baru membutuhkan biaya yang lebih tinggi dan pengujian regulasi antibiotik dalam tubuh, sehingga memerlukan waktu yang lama dan bakteri telah memiliki waktu untuk beradaptasi terhadap antibiotik (resisten). Bakteri membentuk biofilm sebagai bentuk pertahanan terhadap antibakteri yang masuk dalam tubuh inang (Liu, *et al.* 2019).

Seiring berkembangnya zaman dan teknologi, muncul suatu metode nanoteknologi yang dinilai memiliki potensi besar dalam menciptakan antimikroba baru dengan sistem pengiriman molekul yang mampu menembus biofil. Selain itu, melalui metode ini juga dapat membunuh strain bakteri yang resisten terhadap obat. Ukuran nanopartikel sangat penting untuk penetrasi dalam biofilm bakteri dan tidak boleh melebihi ukuran saluran air dalam biofilm tersebut. Pori-pori dan saluran pada biofilm umumnya berkisar 10 nm hingga mikrometer. Namun, pada ukuran

nano diperkirakan lebih akurat dalam agregat bakteri dalam biofilm. Diameter nanopartikel yang ideal untuk mengendalikan infeksi pada biofilm yakni berkisar antara 5, 100 hingga 200 nm, tetapi tidak melebihi 500 nm (Liu, *et al.* 2019).

Nanopartikel yang mengandung zat antimikroba kompatibel dengan darah, tanpa menyerap protein darah yang melimpah dan mengubah sifat permukannya atau mengaktifkan kaskade pembekuan darah. Nanopartikel sebagai media penghantar obat berpotensi untuk menembus ke dalam biofilm. Nanopartikel menargetkan dan menstimulasi menuju biofilm dengan memanfaatkan pH asam di dalam biofilm. Terjadi proses pembalikan muatan permukaan nanopartikel dari muatan negatif ke positif untuk menciptakan tarikan lapisan ganda elektrostatik dengan permukaan sel bakteri yang bermuatan negatif (teori koloidal). Nanopartikel sebagai molekul bermuatan positif, seperti senyawa amonium kuartener yang berperan dalam infeksi biofilm yang dapat dicapai secara eksternal. Kuat daya tarik ganda elektrostatik terlokalisasi pada saat permukaan nanopartikel dengan bakteri dapat menghasilkan kerusakan membran yang parah dan kematian sel selanjutnya (*contact-killing*) (Liu, *et al.* 2019).

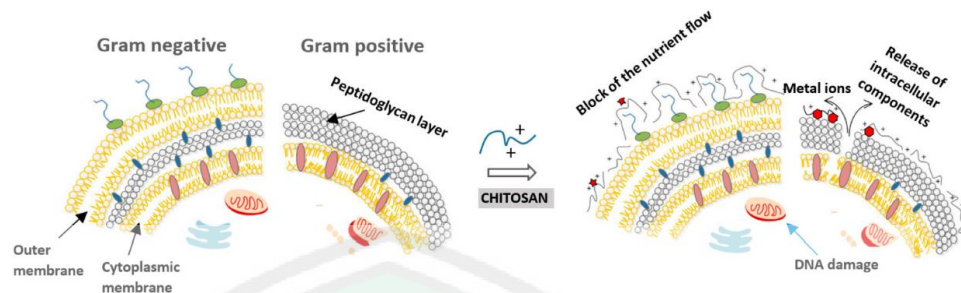
Bentuk nanopartikel memiliki kemampuan membunuh kontak karena bentuknya dapat meningkatkan gaya adhesi lokal yang dapat menghasilkan perubahan dalam tegangan permukaan membran dan kerusakan membran selanjutnya. Disebut pisau nano karena adanya tepi tajam *graphene oxide* yang dapat menusuk membran sel bakteri, sehingga terjadi kebocoran matriks intraseluler dan kematian sel. Nanopartikel dapat menghasilkan panas karena adanya resonansi plasmon. Ketika nanopartikel terlokalisasi di dalam biofilm, terjadi peningkatan suhu sehingga membunuh bakteri di dalam biofilm. Nanopartikel juga dikenal karena pelepasan ionnya yang luas dapat menghasilkan kematian sel bakteri. Selanjutnya, bentuk nanopartikel menentukan sirkulasi darah, adsorpsi protein, kerusakan sel jaringan dan penyerapan oleh sel imun. Nanopartikel berbentuk dengan memiliki daya serapan seluler tertinggi, namun menyebabkan sedikit kerusakan pada membran. Lain halnya pada nanopartikel berbentuk batang atau lainnya memiliki area kontak yang lebih besar dengan

reseptor membran sel, sehingga menyebabkan kerusakan membran yang lebih besar dan memungkinkan terjadinya peradangan kronis (Liu, *et al.* 2019).

Salah satu contoh partikel nano polimer alami adalah kitosan atau ϵ -polylysine. Umumnya nanopartikel ini digunakan untuk antimikroba bermuatan positif dan tidak terstruktur. Nanopartikel kitosan merupakan nanopartikel yang aman digunakan dibandingkan dengan nanopartikel jenis lainnya. Kitosan adalah polimer alami yang terdiri dari residu N-asetil-glukosamin dan residu glukosamin yang disusun secara acak. Sebagian besar gugus amino pada glukosamin bebas akan terprotonasi dan bermuatan positif pada pH 6,5 seperti pada proses infeksi biofilm (Liu, *et al.* 2019).

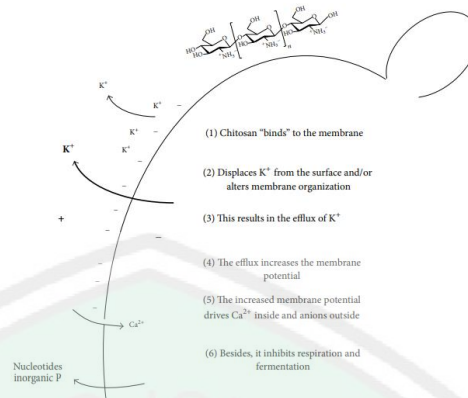
Rantai kitosan memiliki muatan positif dan dapat berinteraksi dengan muatan negatif pada permukaan sel bakteri. Hal ini mengakibatkan kerusakan membran, kebocoran komponen intraseluler, penghambatan sintesis protein dan transkripsi mRNA dengan mengikat DNA. Khasiat antimikroba kitosan umumnya lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Nanopartikel kitosan dapat dibuat dengan menggeser rasio domain hidrofobik atau hidrofilik dalam komponen kitosan, sehingga memiliki kelarutan air yang lebih baik, luas permukaan atau rasio volume, muatan kerapatan permukaan kitosan molekuler dan memiliki potensi antimikroba yang lebih baik. Nanopartikel berperan dalam melawan bakteri, jamur, dan virus (Liu, *et al.* 2019).

Aktivitas antibakteri oleh oligomer kitosan disebabkan oleh penghambatan transkripsi DNA (Liu, *et al.* 2001). Sifat polikationik kitosan menyebabkan pelepasan komponen antar sel, mengikat DNA bakteri (penghambatan mRNA), menghalangi aliran nutrisi dan mengkelat logam esensial. Interaksi antara komponen amino dengan ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} dapat mencegah pembentukan dinding sel bakteri dan memproduksi racun yang dapat menyebabkan pertumbuhan bakteri terhambat (Kravanja, *et al.* 2019) (Gambar 9).



Gambar 9. Mekanisme Antibakteri Kitosan Terhadap Bakteri Gram Negatif dan Gram Positif (Kravanja, *et al.* 2009)

Kitosan termasuk salah satu polimer yang menyusun dinding sel jamur, namun polimer kitosan juga berpotensi sebagai anti jamur. Dampak antijamur yang ditimbulkan oleh kitosan terhadap pertumbuhan *C. albicans* yakni menstimulasi terjadinya pengasaman ekstraseluler dan mengeluarkan ion positif terutama ion K^+ . Kitosan menyebabkan penurunan fosfat dalam jumlah besar, meningkatkan beda potensial sel transmembran, dan meningkatkan penyerapan Ca^{2+} . Mekanisme antifungi kitosan terhadap membran plasma diawali dengan gugus amino bermuatan positif dari kitosan yang berikatan dengan permukaan sel. Kemudian, dari hasil interaksi tersebut menyebabkan perpindahan ion K^+ dan terjadinya gangguan keseimbangan akibat perbedaan konsentrasi kation internal dan eksternal. Hal ini mengakibatkan hilangnya ion K^+ , sehingga terjadi proses hiperpolarisasi membran plasma. Hiperpolarisasi membran plasma menyebabkan penyerapan ion Ca^{2+} meningkat, hilangnya molekul bermuatan negatif pada permukaan sel, serta fungsi metabolisme sebagai fermentasi dan respirasi terganggu (Gambar 10) (Pena, *et al.* 2013).

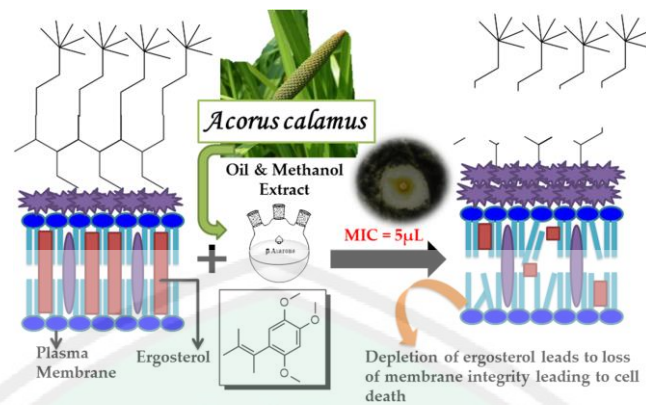


Gambar 10. Mekanisme kerja chitosan konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* (Pena, *et al.* 2013).

2.8.2 Aktivitas Antimikroba Ekstrak Rimpang Jeringau

Aktivitas antibakteri rimpang jeringau diperoleh dari kandungan minyak atsiri yang mengeluarkan senyawa aromatik. Kelompok terpenoid yang terkandung dalam minyak atsiri rimpang jeringau yakni asaron dan eusaron. Kelompok terpenoid ini memiliki kemampuan melisiskan sel bakteri melalui interaksi senyawa dengan dinding sel bakteri, sehingga terjadi peningkatan tekanan osmotik (Rita, dkk. 2017).

Sterol merupakan kelompok lipid esensial yang terdapat di sebagian besar organisme eukariotik, serta memiliki peranan penting dalam stuktural sel dan proses pensinyalan sel. Sterol pada jamur disebut dengan ergosterol (Dupont, *et al.* 2012). Aktivitas antijamur pada spesies *Candida* sp. dari senyawa asarone (alpha asarone dan beta asarone) yang terkandung dalam rimpang jeringau, memiliki peranan penting dalam proses pembentukan ergosterol serta dampaknya secara tidak langsung terhadap proliferasi, pensinyalan sel dan diferensiasi sel (Kumar, 2015). Prinsip senyawa aktif β -asarone dalam minyak atsiri *Acorus calamus* terhadap mekanisme antifungi yakni dengan cara mengganggu dan mengurangi kandungan ergosterol dalam membran plasma fungi. Dari mekanisme tersebut akan berdampak pada kematian sel (Gambar 11) (Venkatesan, *et al.* 2017).



Gambar 11. Aktivitas Antifungi Senyawa β -asarone dalam Mengurangi Komponen Ergosterol dan Menyebabkan Kematian Sel (Venkatesan, *et al.* 2017)

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dan dianalisa secara deskriptif kuantitatif. Penelitian ini menguji kemampuan antimikroba nanopartikel rimpang jeringau (*Acorus calamus* L.) tersalut kitosan secara *in vitro* terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans* dengan bahan uji pembanding antara lain ekstrak rimpang jeringau, kitosan dan nanopartikel kitosan. Sintesis nanopartikel diawali dengan ekstraksi maserasi simplisia dengan 2 kali remaserasi. Dilanjut dengan metode gelasi ionik dan ultrasonikasi untuk memperoleh nanopartikel.

Uji aktivitas antimikroba melalui 2 metode uji yakni metode difusi kertas cakram (*paper disc difussion*) dan metode dilusi cair (*broth microdilution/ tube dilution method*). Dilakukan 3 kali ulangan dalam uji aktivitas antimikroba. Dalam metode dilusi cair dilakukan 2 uji aktivitas antimikroba yakni uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Data hasil metode difusi kertas cakram berupa zona hambat atau zona hambat yang terbentuk. Data hasil uji KHM berupa tingkat turbiditas (kejernihan) suspensi setelah inkubasi, serta data hasil uji KBM berupa jumlah koloni yang tumbuh pada media agar dari suspensi hasil uji KHM.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2019 – Juli 2020 untuk sintesis nanopartikel jeringau tersalut kitosan dan nanopartikel kitosan. Lalu, dilakukan uji aktivitas antimikroba bahan uji pada bulan Oktober 2019 - Juli 2020. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan, Laboratorium Genetika dan Molekuler, Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia

Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Farmasetika Universitas Ma Chung Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Berikut variabel yang terdapat dalam penelitian ini:

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bahan uji (nanopartikel rimpang *Acorus calamus* tersalut kitosan, ekstrak rimpang *Acorus calamus*, nanopartikel kitosan, dan kitosan). Selain itu, kontrol positif (K+) yakni nistatin sebagai antijamur dan klindamisin sebagai antibakteri, serta kontrol negatif (K-) yakni DMSO sebagai pelarut bahan organik.

Konsentrasi bahan uji yang digunakan dalam uji difusi kertas cakram (*paper disc difussion*) menggunakan konsentrasi 2,5%, sedangkan uji dilusi cair (uji KHM dan uji KBM) bahan uji menggunakan (konsentrasi 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; dan 0,313%), serta K+ (konsentrasi 5% dan 2,5%) dan K- (konsentrasi 5%) (Hasan, 2015).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yakni pada metode difusi kertas cakram adalah besar diameter zona hambat yang terbentuk pada difusi kertas cakram (*paper disc difussion*). Kemudian pada metode dilusi cair yakni tingkat kekeruhan yang terlihat pada media NB (*Nutrient Broth*) dan SDB (*Sabaround Dextrose Broth*), sumuran dengan suspensi media cair yang jernih setelah diinkubasi {uji KHM}. Lalu, jumlah koloni bakteri dan jamur yang muncul pada media agar padat untuk uji Konsentrasi Bunuh Minimum {uji KBM}.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang diperlakukan dalam keadaan yang sama antara lain lokasi, waktu, pH, media, kertas cakram, *cotton swab*, inkubasi, suhu dan kelembapan.

3.4 Alat Dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini untuk ekstraksi dan sintesis nanopartikel meliputi inkubator (Mettler, Beschickung-Loading Modell 100-800, D91107 Schwabach), oven (Thermo Scientific, Heraeus, 63505 Langenselbold, Germany), Sentrifuge (Thermo Scientific [Heraeus Labokuge 200]), timbangan analitik (Sartorius 37070 Goettingen, Germany), Hotplate (Barnstead/thermolyne), vortex (Barnstead, Thermolyne Maxi Mix II, Type 37600 Mixer), beaker glass 500 mL (IWAKI), gelas ukur 100 mL (IWAKI), ultrasonic processor (Cole Pamer CV188), homogenizer (Ika T-25 ultra Turtax), rotary vacuum evaporator, deep freezer (Thermo), lemari pendingin, spatula, corong kaca, botol flakol, eppendorf 15 mL, kertas label, tisu, alat tulis, kamera digital.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini untuk uji antimikroba meliputi colony counter (Stuart SC6), autoklaf (ALP KT-30L/-30LDP, seri 802533), LAF (ESCO, AHC-4A1, 2007-26329), oven (Thermo Scientific Heraeus, 63505 Langenselbold, Germany), spektrofotometer (BIO-RAD SmartSpec™ Plus Spectrophotometer, 273 BR 0 4 0 49, U.S.A), vortex (Barnstead Thermolyne Maxi Mix II, Type 37600 Mixer), autoklaf destruksi, hot plate (Thermo Scientific CIMAREC⁺), microplate 96-well (Biologix Europe, 07-6096 Cell Culture Plate), kertas cakram 6 mm (OXOID, CT0998B, Basingstoke, UK), tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer 500 mL dan 250 mL, beaker glass 500 mL (IWAKI), gelas ukur 250 mL (IWAKI), *triangle glass*, ose, pipet tetes, mikropipet (BIO-RAD, U.S.A), tip, kapas, kasa, aluminium foil, plastik wrap, kertas label, plastik antileleh 3 kg, plastik 1 kg, pinset, spatula, masker, latex.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain 100 g serbuk simplisia rimpang jeringau (*Acorus calamus* L.), kitosan, NaTPP, asam asetat glasial (AAG), tween 80, isolat *Candida albicans* (CV.1423), *Staphylococcus aureus* (1117-SV), dan *Escherichia coli* (1906-8V) dari vagina yang terindikasi

terkena vaginitis. Media NA (MERCK), media NB (OXOID CM0001B), SDA (HiMedia M063-500G), SDB (HiMedia MV033-500G), NaCl 0,9%, kloramfenikol (120, 360 mg), DMSO (30 mL), aquades, spirtus, etanol 70%, alkohol 70% (OneMed Health Care).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus*)

Pembuatan ekstrak rimpang jeringau (*Acorus calamus*) dilakukan dengan membuat simplisia dari rimpang jeringau yang diperoleh UPT Materia Medika, Batu. 100 g serbuk simplisia kemudian direndam (maserasi) dalam 500 mL larutan etanol 70% dengan 3 kali pengulangan (2 kali remaserasi). Perlakuan ini diharapkan dapat memperoleh kandungan senyawa aktif dari rimpang dengan jumlah yang optimal. Maserat disaring menggunakan kertas saring hingga diperoleh ampas kering. Hasil ekstrak lalu dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh sediaan ekstrak pekat etanol (Ahmad, 2015).

3.5.2 Pembuatan Nanopartikel Jeringau (*Acorus calamus*) Tersalut Kitosan

Diencerkan 0,5 mL Asam Asetat Glasial (AAG) dalam 99,5 mL aquades (AAG 1%). Disisi lain dilakukan pula pelarutan 0,1 mg STPP dalam 20 mL aquades (STPP 0,5%). Dilarutkan 0,5 g kitosan 0,5% dilarutkan dalam 100 mL AAG 1%. Dihomogenkan larutan kitosan dan STPP menggunakan *magnetic stirrer*. Ditambahkan dan dilarutkan 0,1 g ekstrak jeringau (*Acorus calamus*) ke dalam larutan. Dihomogenizer 10.000 rpm selama 90 menit dan ditambahkan larutan dengan 1 mL tween 80. Disonikasi dengan frekuensi 20 kHz amplitudo 80% selama 90 menit. Dimasukkan larutan dalam tube sebanyak 15 mL. Lalu disentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Diambil bagian pelet, kemudian dimasukkan dalam *freezer* selama 24 jam. Diinkubasi dengan suhu 40°C selama 24 jam. Digerus dan disaring hasil pelet yang telah beku menggunakan ayakan 30 mesh. Diperoleh nanopartikel jeringau (*Acorus calamus* L.) tersalut kitosan (Pakki, dkk. 2016 dimodifikasi).

3.5.3 Pembuatan Nanopartikel Kitosan

Diencerkan 0,5 mL AAG dalam 99,5 mL aquades (AAG 1%). Disisi lain dilakukan pula pelarutan 0,1 mg STPP dalam 20 mL aquades (STPP 0,5%). Dilarutkan 0,5 g kitosan 0,5% dilarutkan dalam 100 mL AAG 1%. Dihomogenkan larutan kitosan dan STPP menggunakan *magnetic stirer* 1000 rpm selama 10 menit. Ditambahkan larutan dengan 1 mL tween 80, lalu dihomogenizer 10.000 rpm selama 90 menit. Disonikasi dengan frekuensi 20 kHz amplitudo 80% selama 90 menit. Dimasukkan larutan dalam tube sebanyak 15 mL. Lalu disentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Diambil bagian pelet, kemudian dimasukkan dalam *freezer* selama 24 jam. Diinkubasi dengan suhu 40°C selama 24 jam. Digerus dan disaring hasil pelet yang telah beku menggunakan ayakan 30 mesh. Diperoleh nanopartikel kitosan (Pakki, dkk. 2016 dimodifikasi).

3.5.4 Uji Antimikroba

1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat diawali dengan mencuci bersih alat yang akan digunakan dalam penelitian. Dikeringkan alat menggunakan tisu. Kemudian ditutup alat gelas (tabung reaksi, erlenmeyer, dan gelas ukur) menggunakan kapas dan kasa. Dirapatkan penutup alat gelas menggunakan kertas wrap dan aluminium foil. Sedangkan pada cawan petri dibungkus menggunakan kertas (bagian tinta tulisan tidak mengenai cawan). Seluruh alat tersebut kemudian dikemas dalam plastik tahan panas. Disterilisasi semua alat menggunakan autoklaf bersuhu 121°C dengan tekanan 15 Psi selama 30 menit. Sedangkan sterilisasi media dalam autoklaf bersuhu 121°C tekanan 15 Psi selama 15 menit. Selain itu, sterilisasi pinset dan jarum ose dapat dilakukan dengan memanaskan alat di atas api yang berpijar hingga menimbulkan warna merah pada alat (Berlian, dkk. 2016).

2. Pembuatan Media

A. *Nutrient Agar* (NA)

Pembuatan media *nutrient agar* dilakukan dengan cara ditimbang *nutrient agar* bubuk sebanyak 5 g. Kemudian dilarutkan dalam 250 mL aquades. Lalu dipanaskan dan dihomogenkan media dalam erlenmeyer menggunakan *magnetic stirrer*. Lalu media yang telah homogen disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang sudah steril dituang dalam tabung reaksi untuk media miring sebanyak 5 mL/tabung. Selain itu, media *nutrient agar* juga dituang dalam cawan petri (Berlian, dkk. 2016).

B. *Nutrient Broth* (NB)

Pembuatan media *nutrient broth* dilakukan dengan cara ditimbang *nutrient broth* bubuk sebanyak 2 g. Kemudian dilarutkan dalam 250 mL aquades. Lalu dipanaskan dan dihomogenkan media dalam erlenmeyer menggunakan *magnetic stirrer*. Lalu media yang telah homogen disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit (Berlian, dkk. 2016).

C. *Sabaround Dextrose Agar* (SDA)

Pembuatan media *sabaround dextrose agar* dilakukan dengan cara ditimbang *sabaround dextrose agar* bubuk sebanyak 16,25 g. Kemudian dilarutkan dalam 250 mL aquades. Ditambahkan 120 mg kloramfenikol sebagai antibiotik untuk bakteri (Rajalakshmi, *et al.* 2017) dan 4,8 mL NaCl 0,9% ke dalam larutan media. Lalu dipanaskan dan dihomogenkan media dalam erlenmeyer menggunakan *magnetic stirrer*. Lalu media yang telah homogen disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang sudah steril dituang dalam tabung reaksi media miring sebanyak 5 mL/tabung. Selain itu, media *sabaround dextrose agar* juga dituang dalam cawan petri (Berlian, dkk. 2016).

D. *Sabaround Dextrose Broth* (SDB)

Pembuatan media *sabaround dextrose broth* dilakukan dengan cara ditimbang *sabaround dextrose broth* bubuk sebanyak 7,5 g. Kemudian

dilarutkan dalam 250 mL aquades. Lalu dipanaskan dan dihomogenkan media dalam erlenmeyer menggunakan *magnetic stirrer*. Lalu media yang telah homogen disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit (Berlian, dkk. 2016).

3. Pengecekan Kemurnian Sediaan dan Peremajaan Biakan Mikroba Uji

A. Bakteri Uji

Pengecekan kemurnian sediaan bakteri uji dilakukan dengan cara dikultur sediaan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* indukan ke dalam media cair NB, kemudian dilanjutkan dengan identifikasi kemurnian sediaan. Lalu, diambil 1 ose suspensi bakteri uji dari media cair. Disubkultur jamur uji menggunakan metode gores (*streak plate*) pada cawan petri berisi media agar padat media NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk memastikan kemurnian dan viabilitas inokulum. Lalu setelah diinkubasi, diidentifikasi kemurnian bakteri uji berdasarkan koloni yang terbentuk di permukaan media agar (dinyatakan murni bila bentuk, jenis, dan warna koloni yang terbentuk seragam). Isolat yang telah murni dapat diremajakan dengan menginokulasikan sebanyak 1 ose sediaan bakteri ke dalam media NA miring. Ditutup bagian tabung reaksi dengan kapas dan kasa (Berlian, dkk. 2016).

B. Jamur Uji

Pengecekan kemurnian sediaan jamur uji dilakukan dengan cara dikultur sediaan *Candida albicans* indukan ke dalam media cair SDB, kemudian dilanjutkan dengan identifikasi kemurnian sediaan. Lalu, diambil 1 ose suspensi jamur uji dari media cair. Disubkultur jamur uji menggunakan metode gores (*streak plate*) pada cawan petri berisi media agar padat media SDA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk memastikan kemurnian dan viabilitas inokulum. Lalu setelah diinkubasi, diidentifikasi kemurnian jamur uji berdasarkan koloni yang terbentuk di permukaan media agar (dinyatakan murni bila bentuk, jenis, dan warna koloni yang terbentuk seragam). Isolat yang telah murni dapat diremajakan dengan menginokulasikan sebanyak 1 ose sediaan jamur ke dalam

media SDA miring. Ditutup bagian tabung reaksi dengan kapas dan kasa (Berlian, dkk. 2016).

4. Pembuatan Suspensi Mikroba Uji

A. Bakteri Uji

Dilarutkan bakteri uji dalam larutan NaCl 0,9% untuk dilihat nilai absorbansi atau kerapatan sel dalam suspensi tersebut (Makagansa, dkk. 2015). Di vortex suspensi hingga homogen selama 15 detik. Lalu, disetarakan jumlah kepadatan sel bakteri dalam suspensi setara larutan standar 0,5 McFarland. Standar 0,5 McFarland inokulum bakteri untuk digunakan dalam uji aktivitas antimikroba yakni 10^8 CFU/mL (Berlian, dkk. 2016) dan uji mikrodilusi cair yakni 5×10^5 CFU/mL (Gambar 12). Verifikasi kepadatan sel bakteri dilihat dari nilai absorbansi uji spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm dengan rentang nilai OD 0,08-0,13 = 10^8 CFU/mL (standar 0,5 McFarland) (CLSI, 2012).

B. Jamur Uji

Dilarutkan jamur uji dalam larutan NaCl 0,9% untuk dilihat nilai absorbansi atau kerapatan sel dalam suspensi tersebut (Makagansa, dkk. 2015). Di vortex suspensi hingga homogen selama 15 detik. Lalu, disetarakan jumlah kepadatan sel *yeast* dalam suspensi sesuai dengan larutan standar 0,5 McFarland. Dilakukan pengukuran kepadatan sel *yeast* menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm ($OD_{600}=0,07$), setara dengan 10^6 CFU/mL untuk fungi (McFarland Standard 1: dikonfirmasi melalui plate count) (Yuan, *et al.* 2019). Dilakukannya pengenceran bertingkat pada suspensi *yeast* dengan media cair hingga menghasilkan jumlah koloni 5×10^2 - $2,5 \times 10^3$ sel/mL (suspensi *yeast* untuk uji dilusi cair) (NCCLS, 2002).

5. Uji Zona Hambat (*Disk Diffusion Method*)

Dibuat 3 juring lingkaran pada cawan petri untuk 3 area pengulangan kertas cakram. Ditambahkan 100 μ L suspensi mikroba sesuai Mc Farland standar pada permukaan media padat. Lalu, dilakukan swab inokulum pada permukaan media padat (Hudzicki, 2009). Diamkan inokulum hingga mengering dengan membiarkan tutup cawan sedikit terbuka dalam suhu ruang. Lalu,

disiapkan larutan antimikroba dengan cara dilarutkan 25 mg serbuk antimikroba dalam 1 mL DMSO (konsentrasi 2,5%) (Mahboubi, *et al.* 2015).

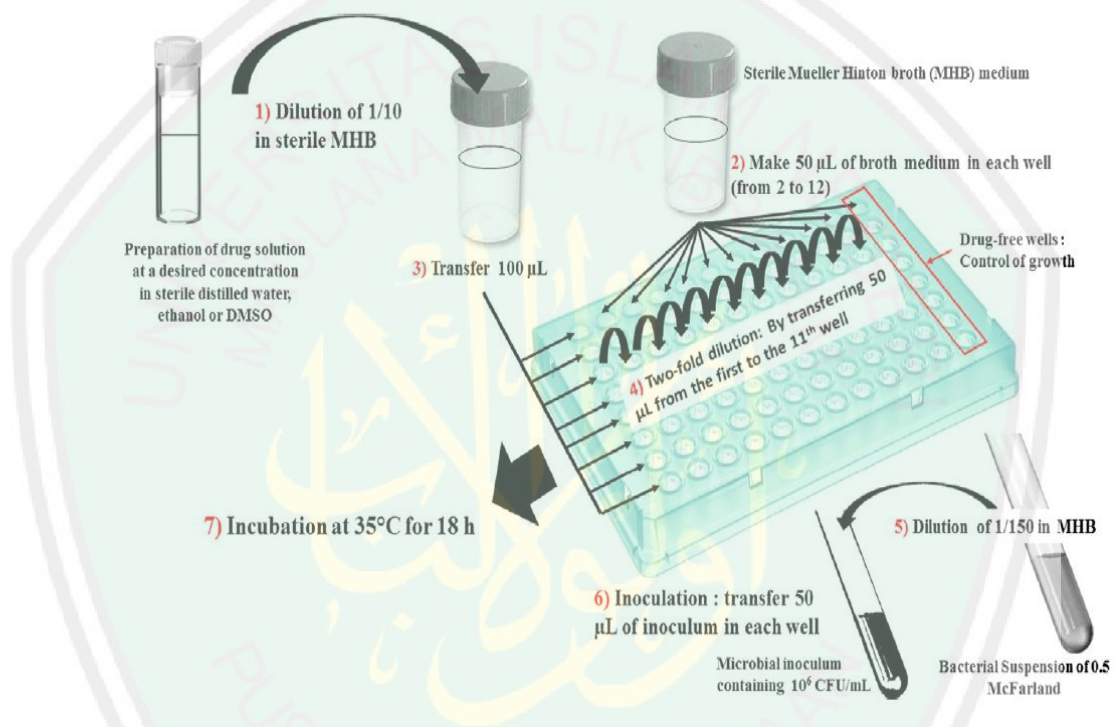
Kemudian, direndam kertas cakram steril berdiameter 6 mm (Hudzicki, 2009) dalam larutan antimikroba selama 30 menit (Al-Qudah, *et al.* 2017) dan diletakkan di atas permukaan inokulum yang telah mengering. Peletakan kertas cakram tidak boleh memiliki jarak kurang dari 24 mm untuk mengantisipasi besar zona hambat yang terbentuk, sehingga mudah untuk diukur. Pada kertas cakram berukuran 150 mm tidak boleh diberikan 12 buah dalam 1 petri, sedangkan kertas cakram berukuran 100 mm tidak boleh diberikan 5 cakram dalam 1 petri (Hudzicki, 2009). Masa inkubasi inokulum *S. aureus* dan *E. coli* yakni $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 16-18 jam (CLSI, 2016). Sedangkan untuk *yeast* diinkubasi pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 20-24 jam (Balouiri, *et al.* 2016), lalu dihitung diameter zona hambat yang terbentuk setelah masa inkubasi. Zona hambat yang terbentuk setelah inkubasi inokulum diukur menggunakan jangka sorong (mm) (Toy, dkk. 2015).

Diameter zona hambat diukur dengan cara mengukur besar diameter keseluruhan dari diameter zona hambat yang terbentuk dan diameter kertas cakram, lalu hasilnya dikurangi dengan besar diameter kertas cakram. Apabila bentuk zona hambat terlalu besar dan bersinggungan dengan zona hambat lainnya dalam satu cawan, maka diukur jari-jari zona hambat lalu dikalikan dua (Hudzicki, 2009).

6. Uji KHM dan Uji KBM (*Broth Microdilution Method*)

Mengacu pada penelitian Hasan (2015) digunakan konsentrasi bertingkat dengan konsentrasi setengah dari konsentrasi sebelumnya yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39%. Pada penelitian ini larutan antimikroba terdiri dari perlakuan yakni bahan uji dengan konsentrasi (5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,313%[b/v]), K⁺ (5% dan 2,5%), dan K⁻ (5%). Pembuatan larutan antimikroba dengan konsentrasi 5% dilakukan dengan dilarutkan 50 mg serbuk ekstrak ke dalam 1 mL DMSO. Kemudian, larutan uji diencerkan 1:10 dalam media cair steril. Lalu dimasukkan 200 μL larutan bahan

uji (konsentrasi 5%) untuk uji hambat minimum pada sumuran pertama. Dilakukan pengenceran bertingkat pada setiap bahan uji dan kontrol positif (konsentrasi 5%) dengan diambil 100 μL dari konsentrasi awal, lalu diletakkan dalam sumuran selanjutnya yang telah diberi 100 μL media cair steril. Di sisi lain, suspensi mikroba Mc Farland diencerkan 1:150 dalam media cair steril (Gambar 12). Kemudian setiap sumuran ditambahkan dengan 100 μL kultur mikroba (Devi & Deepak 2009).



Gambar 12. Metode *Broth Microdilution* untuk Uji Antimikroba berdasarkan Ketentuan CLSI (Balouiri, *et al.* 2016)

Dinkubasi inokulum *S. aureus* dan *E. coli* yakni $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 16-20 jam (CLSI, 2016). Sedangkan masa inkubasi inokulum *C. albicans* yakni 35°C selama 24-48 jam (NCCLS, 2002). Perlakuan KHM diletakkan pada *microplate 96-well plate*. *Microplate* diinkubasi dan dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm (Mabhiza, *et al.* 2016). Dari hasil KHM diperoleh konsentrasi terendah dari antimikroba yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan mikroba (tidak keruh).

Dikatakan positif KHM bila pada tabung tersebut tidak menunjukkan adanya kekeruhan dari pertumbuhan mikroba. Lalu, dilanjutkan dengan konfirmasi pertumbuhan mikroba melalui uji kadar bunuh minimum (KBM). Diambil 100 μ L suspensi dari setiap tabung, lalu diinokulasikan pada cawan petri steril (Yuan, *et al.*, 2019). Kemudian masing-masing cawan ditambahkan media agar cair, lalu diratakan agar dan suspensi mikroba (*pour plate*) (Sari, *et al.*, 2019). Diinkubasi setiap cawan dengan suhu 37°C untuk bakteri selama 24 jam dan suhu ruangan untuk jamur selama 24 jam. Uji konfirmasi jumlah koloni mikroba dilakukan dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (Yuan, *et al.* 2019). Perhitungan koloni mikroba dilakukan dengan pengamatan secara langsung menggunakan alat *digital colony counter* tanpa alat bantu mikroskop (Yunita, dkk. 2015).

7. Interpretasi Jumlah Koloni

Intepretasi jumlah koloni yang dapat dihitung sesuai standar *Total Plare Count* yakni 30-300 koloni/cawan. Perhitungan koloni menggunakan alat *colony counter*. Terdapat beberapa persyaratan intepretasi perhitungan koloni, antara lain (APHA,AWWA,WEF., 2005):

1. Dinyatakan satu koloni apabila koloni berdiri sendiri (tidak tumpang tindih atau bergabung dengan koloni lain dan terdapat jarak antar koloni).
2. Dihitung satu koloni apabila ditemukan suatu koloni saling tumpang tindih atau bersinggungan dengan koloni lain.
3. Dihitung satu koloni apabila ditemukan suatu koloni berantai atau bergabung yang tidak dapat dibedakan secara jelas koloni penyusunnya. Sedangkan apabila koloni berantai yang saling tumpang tindih dapat dibedakan koloni penyusunnya, maka setiap koloni yang berbeda dihitung satu koloni.
4. Dihitung satu koloni apabila ditemukan suatu koloni yang menyebar (*spreader*) dengan karakter sebagai berikut:
 - a. Membentuk koloni berantai yang tidak dapat dibedakan dengan jelas koloni penyusunnya.

- b. Koloni yang tumbuh di antara agar dengan bagian bawah agar.
- c. Koloni yang tumbuh di bagian lapisan air tipis permukaan agar atau bagian tepi agar.

3.5.5 Analisis Data

Data hasil uji aktivitas antimikroba nanopartikel rimpang jeringau (*Acorus calamus* L.) diperoleh dengan cara mengukur luas diameter zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong. Interpretasi hasil zona hambat diperoleh dari besarnya diameter zona hambat (Toy, dkk. 2015). Mengukur konsentrasi hambat minimum (KHM) dengan cara melihat konsentrasi terendah suspensi yang tidak menunjukkan pertumbuhan mikroba (tampak jernih). Mengevaluasi kadar bunuh minimum (KBM) dengan cara menghitung koloni yang tumbuh pada media agar padat dari suspensi hasil KHM (Devi & Deepak, 2009) menggunakan *colony counter* (*Total Plate Count*) (Yunita, dkk. 2015).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data hasil aktivitas antimikroba bahan uji (nanopartikel rimpang jeringau tersalut kitosan, ekstrak rimpang jeringau, nanopartikel kitosan dan kitosan) didapatkan melalui uji *Kirby-bauer* dan *Microdilution Tube*. Data yang didapat kemudian dianalisis secara deskriptif kuantitatif.

4.1 Aktivitas Antimikroba Berdasarkan Uji Kirby-bauer

Uji difusi cakram bertujuan untuk mengetahui kemampuan hambat sampel uji terhadap mikroba uji berdasarkan besar diameter hambat yang terbentuk. Uji difusi cakram dilakukan dengan merendam kertas cakram steril pada larutan uji, lalu diletakkan di permukaan media agar yang telah ditanami mikroba uji menggunakan metode *spread plate* (teknik swab). Konsentrasi yang digunakan adalah 2,5%. Hasil yang diperoleh berupa diameter zona hambat yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Kirby-bauer

Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm) $\pm$ SD					
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Candida albicans</i>	
	Rata-rata	Kategori Daya Hambat	Rata-rata	Kategori Daya Hambat	Rata-rata	Kategori Daya Hambat
K+	38,17 $\pm$ 3,77	Sangat Kuat	28,49 $\pm$ 1,2	Sangat Kuat	16,64 $\pm$ 0,96	Kuat
K-	0	Tidak Ada	0	Tidak Ada	0	Tidak Ada
Nanopartikel Jeringau Tersalut Kitosan	24 $\pm$ 1	Sangat Kuat	15,27 $\pm$ 1,1	Kuat	11,25 $\pm$ 2,48	Kuat
Ekstrak Jeringau	29,1 $\pm$ 1,35	Sangat Kuat	11,66 $\pm$ 0,94	Kuat	7,38 $\pm$ 0,19	Sedang
Nanopartikel Kitosan	25,31 $\pm$ 1,94	Sangat kuat	10,81 $\pm$ 1	Kuat	6,8 $\pm$ 1,04	Sedang
Kitosan	10,32 $\pm$ 1,24	Kuat	5,96 $\pm$ 0,95	Sedang	5,63 $\pm$ 0,65	Sedang

Keterangan:

K+ (Kontrol Positif) : Klindamisin (antibakteri) dan Nistatin (antifungi)

K- (Kontrol Negatif) : DMSO

Berdasarkan tabel data di atas diperoleh diameter zona hambat nanopartikel jeringau tersalut kitosan terhadap *S. aureus* sebesar 24 mm, *E. coli* sebesar 15,27 mm dan *C. albicans* sebesar 11,25 mm (Gambar 13). Diameter zona hambat ekstrak jeringau terhadap *S. aureus* sebesar 29,1 mm, *E. coli* sebesar 11,66 mm dan *C. albicans* sebesar 7,38 mm. Diameter zona hambat nanopartikel kitosan terhadap *S. aureus* sebesar 25,31 mm, *E. coli* sebesar 10,81 mm dan *C. albicans* sebesar 6,8 mm. Diameter zona hambat kitosan terhadap *S. aureus* sebesar 10,32 mm, *E. coli* sebesar 5,96 mm dan *C. albicans* sebesar 5,63 mm (Dapat dilihat pada Lampiran 6).

Dosis yang digunakan dalam uji difusi cakram yakni 25 mg/mL atau setara dengan konsentrasi 2,5%. Hasil penelitian Rita, dkk (2017) bahwa aktivitas antibakteri minyak atsiri *A. calamus* lebih tinggi terhadap *S. aureus* dibandingkan dengan *E. coli*. Berdasarkan penelitian Rita, et al (2017) besar zona hambat yang terbentuk dari minyak atsiri rimpang jeringau terhadap *C. albicans* yakni 2% (9,1 mm), 3% (10,07mm), 4-5% (10,27mm), 10% (11,23mm). Bila dibandingkan dengan hasil yang diperoleh maka dengan konsentrasi 2,5% sudah dapat menghambat mikroba dalam kategori sedang-sangat kuat.

Data hasil uji zona hambat menunjukkan bahwa baik nanopartikel rimpang jeringau tersalut kitosan, nanopartikel kitosan, kitosan, dan ekstrak jeringau memiliki kemampuan menghambat paling besar pada *S. aureus*, lalu *E. coli* dan yang terakhir yakni pada *C. albicans*. Hal ini terjadi karena karakter dinding sel setiap isolat memiliki penyusun yang berbeda, sehingga kemampuan bahan uji dalam menembus ke dalam tubuh mikroba untuk melakukan aktivitas antimikroba pun berbeda-beda. Sesuai dengan hasil uji aktivitas antibakteri yang dilakukan oleh Soleimani, et al. (2015) bahwa aktivitas antibakteri nanopartikel vancomycin tersalut kitosan menghasilkan daya hambat lebih tinggi pada bakteri Gram positif (*S. aureus*) daripada daya hambat pada bakteri Gram negatif (*E. coli*).

Dinding sel bakteri Gram positif hanya tersusun dari peptidoglikan dalam jumlah besar. Lapisan peptidoglikan terdiri dari jaringan dengan banyak pori, yang memungkinkan penetrasi molekul eksogen ke dalam sel. Sebaliknya, dinding sel bakteri Gram negatif tersusun atas membran peptidoglikan (lapisan tengah atau

bagian dalam) dan membran luar yang terdiri dari fosfolipid, lipopolisakarida, dan lipoprotein. Struktur dinding sel bilayer yang canggih ini dengan membran luar dan dalam membentuk penghalang yang kuat terhadap molekul asing dengan berat molekul tinggi (Feng, *et al.*, 2000). Dinding sel bakteri Gram negatif oleh lipopolisakarida dapat memblokir penetrasi dari komponen hidrofobik terpenoid, sedangkan pada Gram positif lebih sensitif terhadap komponen terpenoid (Beveridge, *et al.*, 1999).

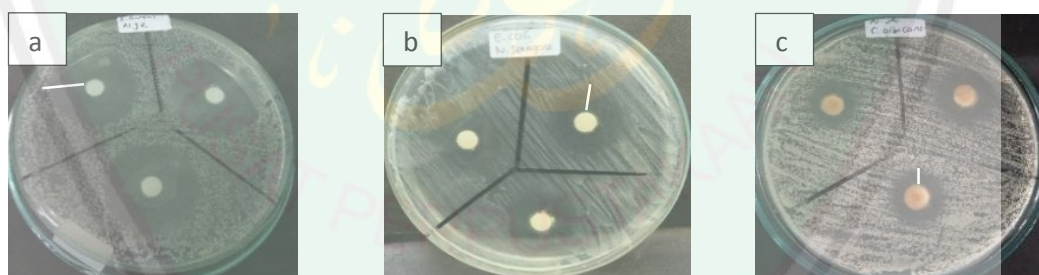
Bagian dinding hifa *C. albicans* lebih banyak mengandung kitin tiga kali lebih tinggi dibandingkan pada *yeast*. Dinding sel *C. albicans* tersusun atas dua lapisan. Inti utama dinding sel terdiri dari kerangka β -glukan-kitin yang bertugas untuk kekuatan dan bentuk dinding sel. Kitin tertelak di lapisan dalam dinding sel yang bertugas dalam pembentukan septum, viabilitas, bentuk dan integritas sel. Lapisan luar dinding sel *C. albicans* dikemas dengan mannoprotein. Komponen dalam dinding sel *C. albicans* memiliki permeabilitas dan porositas yang rendah, sehingga menghambat antimikroba untuk melewati membran sel jamur (Garcia-Rubio, *et al.*, 2020).

Hasil diameter zona hambat bahan uji dibandingkan dengan kontrol positif yang memiliki luas diameter zona hambat terhadap *S. aureus* sebesar 38,17 mm, *E. coli* sebesar 28,49 mm dan *C. albicans* sebesar 16,64 mm. Kemudian, hasil kontrol negatif mikroba menggunakan pelarut DMSO tidak menghasilkan zona hambat atau dapat dikatakan tidak memiliki potensi antimikroba.

Klindamisin adalah antibiotik turunan linkomisin yang berperan menghambat sintesis protein bakteri (Katzung, *et al.*, 2012). Mekanisme antibakteri klindamisin menghambat reproduksi bakteri dengan cara menghambat sintesis protein. Tindakan klindamisin melibatkan pemotongan pemanjangan rantai peptida memblokir situs A di ribosom, kesalahan dalam membaca kode genetik atau mencegah perlekatan rantai oligosakarida pada glikoprotein (Liling, dkk., 2020). Menurut Sabol, *et al.* (2006) klindamisin merupakan antibiotik yang dianggap dapat digunakan untuk pengobatan organisme Gram positif. Berdasarkan penelitian Bitew, *et al* (2017) 86% isolat *E. coli* rentan terhadap amikacin dan tobramycin.

Nistatin merupakan agen antifungi yang sering digunakan untuk mengobati kandidiasis, termasuk infeksi kandidiasis pada saluran pencernaan (Dowd, 2007). Nistatin termasuk dalam kelompok poliene yang dapat merusak membran sel (ergosterol) fungi. Mekanisme antifungi antibiotik ini yakni dengan merusak ergosterol secara permanen (Lubis, 2008). Nistatin mengikat ergosterol dalam membran sitoplasma jamur, membentuk saluran yang memungkinkan K^+ dan Mg^{2+} mengalami kebocoran (ion keluar dari sel). Peristiwa tersebut menyebabkan perubahan permeabilitas sel dan kematian sel (De Carvalho, *et al.*, 2019).

Pelarut dalam penelitian ini menggunakan pelarut DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) yang sekaligus digunakan sebagai kontrol negatif untuk memastikan adanya pengaruh antimikroba hanya berasal dari sampel bahan uji. Ekstrak rimpang jeringau cair mudah larut dalam DMSO. Berdasarkan penelitian Mohammadi, *et al.* (2019) DMSO merupakan pelarut organik (hidrofilik) dan memiliki stabilitas yang baik. Dalam penelitian tersebut DMSO digunakan sebagai pelarut nanopartikel kitosan. Selain itu, berdasarkan penelitian Ulfah (2020) menyatakan bahwa uji zona hambat pelarut DMSO (kontrol negatif) tidak menghasilkan aktivitas antibakteri atau bersifat netral.



Gambar 13. Hasil pengamatan uji difusi cakram (Kirby-Bauer) dari Nanopartikel jeringau tersalut kitosan terhadap (a). *Staphylococcus aureus*, (b) *Escherichia coli* dan (c) *Candida albicans*

Metode difusi cakram dipengaruhi oleh banyak faktor fisik dan kimia, antara lain pH, suhu inkubasi, kemampuan difusi antimikroba ke dalam media, stabilitas bahan obat, ukuran molekul, zat inhibitor dan sifat dari media (Jawetz, dkk., 2001). Menurut Nurliana (2009) uji aktivitas antimikroba dengan difusi

cakram dapat dipengaruhi oleh jenis antimikroba (konsentrasi dan polaritas), ukuran cakram kertas, kandungan senyawa beserta bahan yang terbawa oleh sampel uji, dan jenis mikroba uji. Efek senyawa antimikroba juga dapat tergantung pada proses ekstraksinya. Prescott (2005) menambahkan bahwa faktor yang mempengaruhi perbedaan zona hambat diantaranya yaitu jarak dan waktu pemasangan kertas cakram.

Daya hambat nanopartikel rimpang jeringau tersalut kitosan terhadap *S. aureus* lebih rendah jika dibandingkan dengan ekstrak rimpang jeringau. Kendala dalam uji difusi cakram ini adalah kelarutan sampel nanopartikel jeringau tersalut kitosan dalam DMSO yang rendah. Selain itu, sampel nanopartikel jeringau tersalut kitosan mudah menggumpal. Berdasarkan analisis SEM nanopartikel rimpang jeringau tersalut kitosan oleh Muchtaromah, *et al.* (2020) memiliki ukuran yang tergolong besar dan berbentuk seperti bongkahan kristal. Dewi (2010) menyebutkan bahwa kelarutan zat aktif larutan uji dan perbedaan kecepatan proses difusinya pada media agar mempengaruhi besar zona hambat yang terbentuk. Aglomerasi partikel bahan uji menyebabkan sampel tidak berdifusi sempurna pada kertas cakram, sehingga bahan antimikroba tidak dapat meluas pada permukaan media dan mengakibatkan mikroba dapat tumbuh disekitar kertas cakram (Prawira, 2013). Pada proses sintesis nanopartikel membutuhkan penanganan yang tepat karena partikel yang terbentuk berpotensi besar mengalami agregasi. Penjerapan obat dipengaruhi oleh interaksi obat dengan polimer, berat molekul polimer, kelarutan obat dalam matriks, dan komposisi polimer (Lanimarta, 2012). Namun, meskipun terdapat kendala dalam kelarutan sampel bahan uji, hasil zona hambat yang diperoleh relatif tinggi.

Rimpang jeringau (*Acorus calamus*) memiliki kandungan fitokimia diantaranya steroid, tannin, glikosida, diterpen, dan triterpen (Barua, *et al.*, 2014). Selain itu, aktivitas antimikroba dapat terjadi karena adanya kandungan fenol dan derivatnya seperti flavonoid, alkaloid dan saponin dalam rimpang jeringau. Fenol bertugas dalam memicu inaktivasi enzim seluler, sehingga terjadi perubahan permeabilitas membran. Fenol menyebabkan influks berlebih pada substansi ekstraseluler yang mengakibatkan kebocoran komponen intraseluler, di awali

dengan pelepasan ion K^+ yang menjadi tanda kerusakan membran. Melalui proses koagulasi, fenol dapat merusak organ intraseluler bakteri, serta merusak *proton motive force* yang berperan dalam produksi energi bagi mikroba (Purwanti & Ressi, 2016). Fenol dapat mendenaturasi protein, sehingga mengakibatkan aktivitas metabolisme sel dikatalisis oleh suatu enzim yang merupakan protein (Harborne, 1996).

Flavonoid termasuk kelompok senyawa fenol yang cenderung mengikat protein sehingga menghambat aktivitas enzim pada mikroba dan terjadi penurunan aktivitas metabolisme (Purwanti & Ressi, 2016). Flavonoid mampu berikatan dengan adhesin, polipeptida dinding sel dan *membrane-bound enzymes* (membentuk kompleks) dengan protein ekstraseluler terlarut dan dengan dinding sel. Hal ini menyebabkan mikroorganisme tidak dapat melekat dan menginvasi sel (Harborne, 1996).

Saponin mampu meningkatkan permeabilitas membran sehingga terjadi hemolisis (pecah) sel ketika berinteraksi dengan membran sel mikroba. Alkaloid bekerja sebagai antimikroba dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan sel bakteri, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat (Purwanti & Ressi, 2016). Mekanisme antifungi alkaloid dan terpenoid dengan cara menghambat respirasi sel jamur. Tannin merupakan metabolit sekunder pada tumbuhan yang mampu membentuk ikatan stabil dengan protein, akibatnya terjadi koagulasi protoplasma mikroba. Tannin berpotensi sangat toksik terhadap fungi berfilamen dan bakteri (Harborne, 1996).

Derivat fenol memiliki aktivitas antibakteri yang kuat pada bakteri Gram positif dibandingkan bakteri Gram negatif karena perbedaan komposisi lapisan dinding sel. Lapisan hidrofilik yang mengandung polisakarida pada membran bakteri Gram negatif berperan melindungi sel terhadap penetrasi molekul antibiotik dan ruang periplasma yang hanya terdapat pada bakteri Gram negatif mengandung beberapa enzim yang bisa merusak zat ekstraseluler. Flavonoid bersifat polar dan mudah menembus lapisan peptidoglikan (polar) yang banyak terkandung dalam bakteri Gram positif. Dinding sel bakteri Gram positif mengandung polisakarida (asam teikoat). Polimer tersebut mudah larut dalam air, sehingga dinding sel bakteri

Gram positif lebih polar daripada dinding sel bakteri Gram negatif (Purwanti & Ressi, 2016).

Aktivitas antibakteri rimpang jeringau diperoleh dari kandungan minyak atsiri yang mengeluarkan senyawa aromatik. Kelompok terpenoid yang terkandung dalam minyak atsiri rimpang jeringau yakni asaron dan euasaron. Kelompok terpenoid ini memiliki kemampuan melisis sel bakteri melalui interaksi senyawa dengan dinding sel bakteri, sehingga terjadi peningkatan tekanan osmotik (Rita, dkk. 2017).

Sterol merupakan kelompok lipid esensial yang terdapat di sebagian besar organisme eukariotik, serta memiliki peranan penting dalam struktural sel dan proses pensinyalan sel. Sterol pada jamur disebut dengan ergosterol (Dupont, *et al.* 2012). Aktivitas antijamur pada spesies *Candida* sp. dari senyawa asarone (α -asarone dan β -asarone) yang terkandung dalam rimpang jeringau, memiliki peranan penting dalam proses pembentukan ergosterol serta dampaknya secara tidak langsung terhadap proliferasi, pensinyalan sel dan diferensiasi sel (Kumar, 2015). Prinsip senyawa aktif β -asarone dalam minyak atsiri *Acorus calamus* terhadap mekanisme antifungi yakni dengan cara mengganggu dan mengurangi kandungan ergosterol dalam membran plasma fungi. Dari mekanisme tersebut akan berdampak pada kematian sel (Venkatesan, *et al.* 2017).

Aktivitas rimpang jeringau (*A. calamus* L.) tersalur kitosan juga memperoleh dampak positif dari penggunaan kitosan sebagai penyalut bahan alam. Nanopartikel sebagai molekul bermuatan positif, seperti senyawa amonium kuarterner yang berperan dalam infeksi biofilm yang dapat dicapai secara eksternal. Kuat daya tarik ganda elektrostatik terlokalisasi pada saat permukaan nanopartikel dengan bakteri dapat menghasilkan kerusakan membran yang parah dan kematian sel selanjutnya (*contact-killing*) (Liu, *et al.* 2019).

Bentuk nanopartikel memiliki kemampuan membunuh kontak karena bentuknya dapat meningkatkan gaya adhesi lokal yang dapat menghasilkan perubahan dalam tegangan permukaan membran dan kerusakan membran selanjutnya. Meskipun nanopartikel berbentuk *sferis* lebih mudah melintasi membran sel, namun nanopartikel yang tidak berbentuk *sferis* atau tidak beraturan

memiliki bentuk permukaan yang disebut pisau nano karena adanya tepi tajam *graphene oxide* yang dapat menusuk membran sel bakteri, sehingga terjadi kebocoran matriks intraseluler dan kematian sel. Selain itu, nanopartikel dapat menghasilkan panas karena adanya resonansi plasmon. Ketika nanopartikel terlokalisasi di dalam biofilm, terjadi peningkatan suhu sehingga membunuh bakteri di dalam biofilm. Nanopartikel juga dikenal karena pelepasan ionnya yang luas dapat menghasilkan kematian sel bakteri (Liu, *et al.*, 2019).

Rantai kitosan memiliki muatan positif dan dapat berinteraksi dengan permukaan sel bakteri bermuatan negatif, akibatnya terjadi kerusakan membran, kebocoran komponen intraseluler, penghambatan sintesis protein dan transkripsi mRNA dengan mengikat DNA. Khasiat antimikroba kitosan umumnya lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif daripada bakteri Gram negatif. Nanopartikel berperan dalam melawan bakteri, jamur, dan virus (Liu, *et al.* 2019). Aktivitas antibakteri oleh oligomer kitosan disebabkan oleh penghambatan transkripsi DNA (Liu, *et al.* 2001).

Sifat polikationik kitosan menyebabkan pelepasan komponen antar sel, mengikat DNA bakteri (penghambatan mRNA), menghalangi aliran nutrisi dan mengkelat logam esensial. Interaksi antara komponen amino dengan ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} dapat mencegah pembentukan dinding sel bakteri dan memproduksi racun yang dapat menyebabkan pertumbuhan bakteri terhambat (Kravanja, *et al.* 2019).

Target antifungi kitosan terhadap *C. albicans* yakni melalui penghambatan adhesi sel, sehingga dapat mengganggu tahap awal dalam pembentukan biofilm, mengganggu terbentuknya kolonisasi, menghambat perkembangan patogenesis dan infeksi. Ikatan kuat kitosan pada sel jamur dapat menurunkan muatan permukaan negatif dari membran jamur. Akibatnya konsentrasi kation (K^+) di permukaan sel menurun, sehingga mengganggu keseimbangan antara konsentrasi internal dengan eksternal sel. Selain itu, interaksi tersebut mengakibatkan perbedaan potensial listrik membran (De Carvalho, *et al.*, 2019). Hilangnya ion K^+ menyebabkan penyerapan ion Ca^{2+} meningkat (hiperpolarisasi membran plasma), sehingga fungsi metabolisme sebagai fermentasi dan respirasi sel terganggu (Pena, *et al.* 2013).

Aktivitas antimikroba nanopartikel kitosan lebih tinggi dibandingkan serbuk kitosan. Hal ini dikarenakan polikationik nanopartikel kitosan memiliki luas permukaan dan kerapatan muatan yang lebih tinggi daripada serbuk kitosan, serta dapat berinteraksi lebih tinggi dengan permukaan sel bakteri yang bermuatan negatif (Shi, *et al.* 2006).

Kemampuan antibakteri kitosan berdasarkan penelitian Honary, *et al.* (2011) menyatakan bahwa nanopartikel kitosan tersalut perak memiliki kemampuan antibakteri yang tinggi terhadap *Staphylococcus aureus*, ketika ukuran partikel lebih diperkecil dapat meningkatkan area permukaan partikel. Nanopartikel kitosan juga mampu menghambat pembentukan hifa, pseudohifa, dan klamidokonidia secara proporsional dengan peningkatan konsentrasinya. Namun, sulit menghambat biofilm *C. albicans* dewasa (Gondim, *et al.*, 2018).

4.2 Aktivitas Antimikroba Berdasarkan Uji Microdilution Tube

4.2.1 Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Parameter potensi obat antimikroba yang paling banyak digunakan adalah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) (Tabel 4). Parameter ini digunakan untuk mengetahui standar konsentrasi obat terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara *in vitro* setelah masa inkubasi. Tujuan utama dilakukan uji KHM untuk memperoleh perspektif klinis penentuan dosis yang tepat dalam mengoptimalkan pembunuhan bakteri dan meminimalkan peluang munculnya resistensi (Dorey, *et al.*, 2016).

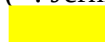
Tabel 4. Hasil uji konsentrasi hambat minimum secara kualitatif

Perlakuan	Mikroba Uji	Ulangan	Konsentrasi (%)				
			5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,313%
K+	<i>S. aureus</i>	1	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	1	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-
	<i>C. albicans</i>	1	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-
K-	<i>S. aureus</i>	1	+++	+++	+++	+++	+++
		2	+++	+++	+++	+++	+++
		3	+++	+++	+++	+++	+++

	<i>E. coli</i>	1	+++	+++	+++	+++	+++
		2	+++	+++	+++	+++	+++
		3	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>C. albicans</i>	1	+++	+++	+++	+++	+++
		2	+++	+++	+++	+++	+++
		3	+++	+++	+++	+++	+++
Nanopartikel Jeringau Tersalut Kitosan	<i>S. aureus</i>	1	-	+	++	+++	+++
		2	-	+	++	+++	+++
		3	-	+	++	+++	+++
	<i>E. coli</i>	1	-	+	+++	+++	+++
		2	-	++	++	+++	+++
		3	-	++	++	+++	+++
	<i>C. albicans</i>	1	-	++	+++	+++	+++
		2	-	++	+++	+++	+++
		3	-	++	+++	+++	+++
Ekstrak Jeringau	<i>S. aureus</i>	1	-	+	++	+++	+++
		2	-	+	++	+++	+++
		3	-	+	++	+++	+++
	<i>E. coli</i>	1	-	++	+++	+++	+++
		2	-	++	+++	+++	+++
		3	-	++	+++	+++	+++
	<i>C. albicans</i>	1	-	-	+++	+++	+++
		2	-	-	+++	+++	+++
		3	-	-	+++	+++	+++
Nanopartikel Kitosan	<i>S. aureus</i>	1	-	+	+	+++	+++
		2	-	-	-	+++	+++
		3	-	+	+	+++	+++
	<i>E. coli</i>	1	+++	+++	+++	+++	+++
		2	+++	+++	+++	+++	+++
		3	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>C. albicans</i>	1	-	++	++	+++	+++
		2	-	+	+	++	+++
		3	-	++	++	+++	+++
Kitosan	<i>S. aureus</i>	1	-	+	++	+++	+++
		2	-	+	++	+++	+++
		3	-	++	++	+++	+++
	<i>E. coli</i>	1	+	++	+++	+++	+++
		2	+	+	++	+++	+++
		3	+	++	+++	+++	+++
	<i>C. albicans</i>	1	-	++	++	+++	+++
		2	-	++	++	+++	+++
		3	-	++	++	+++	+++

Keterangan:

(- : Jernih, +: Sedikit Keruh, ++: Keruh, +++: Sangat keruh)



: Positif KHM



: Tidak diperoleh Nilai KHM

K+ (Kontrol Positif) : Klindamisin (antibakteri) dan Nistatin (antifungi)

K- (Kontrol Negatif) : DMSO

Konsentrasi hambat minimum dianalisa berdasarkan konsentrasi terkecil yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba dalam suspensi (suspensi tampak jernih) setelah masa inkubasi. Data tersebut digunakan sebagai konsentrasi acuan penentuan dosis antimikroba terendah yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba (Mahboubi, *et al.* 2015).

Berdasarkan data hasil konsentrasi hambat minimum (KHM) secara kualitatif (Gambar pengamatan uji turbidimetri dapat dilihat pada Lampiran 6) diperoleh nilai positif KHM yakni nanopartikel jeringau tersalut kitosan terhadap *S. aureus*, *E. coli*, dan *C. albicans* pada konsentrasi 5% (50 mg/mL), ekstrak jeringau terhadap *S. aureus* dan *E. coli* pada konsentrasi 5%, nanopartikel kitosan dan kitosan terhadap *S. aureus* dan *C. albicans* pada konsentrasi 5%. Lalu, nilai positif KHM konsentrasi 2,5% diperoleh pada ekstrak jeringau terhadap *C. albicans*. Namun, terdapat sampel yang keruh setelah inkubasi (tidak diperoleh nilai KHM kualitatif) meskipun pada konsentrasi uji tertinggi (5%) yakni pada nanopartikel kitosan dan kitosan terhadap *E. coli*.

Berdasarkan penelitian Devi & Deepak (2009) nilai KHM ekstrak rimpang *A. calamus* memiliki aktivitas antibakteri pada konsentrasi berkisar 16-42 mg/mL dalam DMSO, sedangkan pada *C. albicans* berkisar 4 mg/mL. Nanopartikel kitosan juga memiliki potensi antifungi. Berdasarkan penelitian Gondim, *et al.* (2018) menyatakan bahwa nanopartikel kitosan (30,1 µg/mL) dan sodium hipoklorit (625 µg/mL) pada uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) memiliki kekuatan mereduksi pertumbuhan *C. albicans* yang sama dalam waktu 8 jam. Nanopartikel kitosan menghambat biofilm *C. albicans* dan menyebabkan perubahan kecil terhadap kekasaran dan kekerasan permukaan resin akrilik, sehingga mengurangi biofilm *C. albicans*.

Berdasarkan hasil uji mikrodilusi sampel uji dinilai terdapat ketidakakuratan hasil apabila ditinjau berdasarkan pengamatan secara visual. Disisi lain, pengukuran nilai kadar hambat minimum juga dapat dilakukan melalui metode *turbidimetri* menggunakan alat spektrofotometer. Alat ini bekerja dengan menghasilkan nilai *Optical Density* (OD) berdasarkan tingkat kekeruhan suspensi. Namun, penggunaan metode *turbidimetri* juga memiliki kelemahan dalam

kesalahan membaca jumlah koloni mikroba dikarenakan kepekaannya terhadap kekeruhan suspensi yang dapat disebabkan oleh faktor lain selain sel mikroba. Seperti halnya pada sampel nanopartikel kitosan maupun sampel kitosan memiliki kekeruhan suspensi berwarna putih yang hampir sama dengan kekeruhan suspensi yang benar-benar ditumbuhi oleh mikroba. Hal ini menyebabkan pengamatan kekeruhan suspensi baik secara langsung maupun menggunakan alat spektrofotometer dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor pengganggu yang dapat terbaca sebagai pertumbuhan mikroba.

Tingkat kekeruhan kultur mikroba dapat dihitung menggunakan alat spektrofotometer OD 600 untuk mengetahui jumlah kepadatan mikroba. Namun, kekurangan dari alat ini yakni mendeteksi jumlah berdasarkan daya serap dari cahaya yang dipancarkan ke arah setiap partikel sampel secara acak. Oleh sebab itu, tidak hanya sel mikroba hidup yang terbaca tetapi sel lain seperti sel mikroba yang telah mati, debris sel, serta partikel lain yang dapat terbaca. Alat ini bergantung pada sebaran cahaya yang menyerap berdasarkan ukuran dan bentuk, sehingga alat ini tidak bisa menghitung dalam arti fisik secara pasti (Eppendorf, 2015). Kekurangan penggunaan spektrofotometer UV-Vis yakni dalam selektivitas untuk membedakan sampel dengan partikel-partikel lain atau kontaminan yang dapat menyerap cahaya dengan panjang gelombang yang sama (Wuon, dkk., 2018).

4.2.2 Uji Total Plate Count

Penentuan KHM pada penelitian ini dilakukan secara kualitatif (kejernihan suspensi) dan secara kuantitatif (*total plate count*) dengan metode *Pour plate* dari hasil uji mikrodilusi cair sebagai uji penegas agar hasil yang diperoleh lebih valid. Sampel uji yang digunakan adalah semua konsentrasi masing-masing sumuran, diambil 100 μ L suspensi dari setiap sumuran. Kemudian dituang dalam cawan petri steril, lalu ditambahkan media agar yang masih cair dan diratakan. Hasil *Pour Plate* pada media agar dapat dilihat pada Lampiran 6. Konsentrasi bunuh minimum ditinjau berdasarkan konsentrasi terkecil yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba dalam media kultur setelah inkubasi (Mahboubi, *et al.* 2015).

Tabel 5. Hasil *total plate count* sampel uji

Perlakuan	Mikroba Uji	Konsentrasi (%)				
		5%	2,5%	1,25	0,625	0,313
K+	<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	0
	<i>E.coli</i>	0	0	0	0	0
	<i>C.albicans</i>	0	0	0	0	0
K-	<i>S.aureus</i>	∞	∞	∞	∞	∞
	<i>E.coli</i>	∞	∞	∞	∞	∞
	<i>C.albicans</i>	∞	∞	∞	∞	∞
Ekstrak Jeringau	<i>S.aureus</i>	0	17,1x10 ⁴	∞	∞	∞
	<i>E. coli</i>	0	∞	∞	∞	∞
	<i>C. albicans</i>	5,4x10 ²	2,5x10 ⁴	∞	∞	∞
Nanopartikel Jeringau Tersalut Kitosan	<i>S. aureus</i>	0	17,2x10 ³	∞	∞	∞
	<i>E. coli</i>	0	∞	∞	∞	∞
	<i>C. albicans</i>	11,5x10 ³	18,6x10 ³	40,4x10 ³	∞	∞
Kitosan	<i>S.aureus</i>	0	∞	∞	∞	∞
	<i>E.coli</i>	9,6x10 ²	∞	∞	∞	∞
	<i>C.albicans</i>	0	6,7x10 ³	5x10 ⁴	∞	∞
Nanopartikel Kitosan	<i>S.aureus</i>	0	2,5x10 ³	20,7x10 ⁴	∞	∞
	<i>E.coli</i>	0	0	7,1x10 ⁴	∞	∞
	<i>C.albicans</i>	6,3x10 ³	20,5x10 ³	5,2x10 ⁴	∞	∞

Keterangan:

(∞ : TBUD atau tidak dapat dihitung)

 : Positif KBM : KHM Kuantitatif : Tidak diperoleh nilai KBM

Metode tuang (*Pour Plate*) dan hitung cawan (*Plate Count*) digunakan untuk menghitung dan menganalisa populasi mikroba (Sari, *et al.*, 2019). Prinsip metode hitung cawan yakni menumbuhkan sel-sel mikroba yang masih hidup pada cawan berisi media padat, sehingga mikroba dapat tumbuh dan berkembang biak. Metode ini ditujukan untuk mengkonfirmasi jumlah koloni yang masih hidup setelah diberi perlakuan antimikroba. Perhitungan koloni mikroba dilakukan secara langsung dan tanpa bantuan alat mikroskop. Koloni mikroba dihitung menggunakan *colony counter*. Data hasil disajikan dalam bentuk tabel sesuai dengan jumlah koloni sesuai *Standards Plate Count* (SPC). Rataan jumlah koloni yang dihitung berdasarkan SPC yakni berkisar 30-300 CFU (*Colony Forming Unit*). Metode ini bertujuan untuk meminimalisir kesalahan analisa (*statistical error*). Kisaran 30-300 koloni digunakan sebagai acuan dalam menentukan semua faktor yang berpengaruh dalam hasil akhir (Yunita, dkk., 2015). Dikatakan turbidimetri (TBUD) ketika jumlah koloni lebih dari 300 CFU/g (Sukmawati & Fatimah, 2018).

Adanya aktivitas hambat pertumbuhan mikroba oleh sampel uji dapat diketahui melalui kerapatan jumlah koloni yang tumbuh dalam cawan petri setelah inkubasi. Kemampuan antibakteri dapat diketahui berdasarkan nilai KHM dan KBM terhadap mikroba uji. Konsentrasi terendah dalam menghambat pertumbuhan mikroba disebut dengan nilai KHM. Kemampuan bakteriostatik antibakteri menjadi bakteriosida dapat terjadi jika kadar antibakteri ditingkatkan dari kadar KHM (Prihantoro dkk, 2006).

Nilai KHM kuantitatif berdasarkan (Tabel 5) antara lain yakni nanopartikel jeringau tersalut kitosan terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 2,5% sebanyak $17,2 \times 10^3$ CFU/mL, nanopartikel jeringau tersalut kitosan terhadap *E. coli* pada konsentrasi 2,5% < Nilai KHM < 5%, dan nanopartikel jeringau tersalut kitosan terhadap *C. albicans* pada konsentrasi 1,25% sebanyak $40,4 \times 10^3$ CFU/mL. Ekstrak jeringau terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 2,5% sebanyak $17,1 \times 10^4$ CFU/mL, ekstrak jeringau terhadap *E. coli* pada konsentrasi 2,5% < Nilai KHM < 5%, dan ekstrak jeringau terhadap *C. albicans* pada konsentrasi 2,5% sebanyak $2,5 \times 10^4$ CFU/mL. Nanopartikel kitosan terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 1,25% sebanyak $20,7 \times 10^4$ CFU/mL, nanopartikel kitosan terhadap *E. coli* pada

konsentrasi 1,25% sebanyak $7,1 \times 10^4$ CFU/mL, dan nanopartikel kitosan terhadap *C. albicans* pada konsentrasi 1,25% sebanyak $5,2 \times 10^4$ CFU/mL. Kitosan terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 2,5% < Nilai KHM < 5% kitosan terhadap *E. coli* pada konsentrasi 5% sebanyak $9,6 \times 10^2$ CFU/mL, dan kitosan terhadap *C. albicans* pada konsentrasi 1,25% sebanyak 5×10^4 CFU/mL.

Pelczar dan Chan (1998) menyatakan bahwa dikatakan antimikroba yang baik apabila dalam konsentrasi rendah telah menghambat pertumbuhan mikroba. Berdasarkan (Tabel 5) data hasil *Total Plate Count* diperoleh beberapa konsentrasi yang positif KBM (tidak tumbuh koloni). Pertama, nanopartikel jeringau tersalut kitosan, ekstrak jeringau, nanopartikel kitosan dan kitosan terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 5%. Lalu, nanopartikel jeringau tersalut kitosan 5%, ekstrak jeringau 5%, dan nanopartikel kitosan 2,5% terhadap *E. coli*. Kemudian pada kitosan konsentrasi 5% terhadap *C. albicans*. Namun, terdapat beberapa konsentrasi yang tidak diperoleh nilai KBM (tumbuh koloni) yakni pada kitosan terhadap *E. coli* dan bahan uji nanopartikel jeringau tersalut kitosan, ekstrak jeringau, dan nanopartikel kitosan terhadap *C. albicans*.

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas zat antimikroba antara lain konsentrasi atau intensitas zat antimikroba, jumlah mikroorganisme, spesies mikroorganisme, suhu, derajat keasaman (pH) (Pelczar, 1986). Menurut Rizvi & Saleh (2018) semakin kecil ukuran partikel, maka rasio permukaan partikel terhadap volumenya semakin besar. Hal ini menyiratkan bahwa akan lebih banyak kandungan bahan obat yang mendekati permukaan partikel dibandingkan partikel berukuran besar. Zat yang berada di dekat permukaan partikel akan memudahkan proses pelepasan, sehingga lebih mudah menunjukkan kemampuan zat aktifnya.

Pembuatan sediaan nanopartikel cenderung terjadi agregasi, aglomerasi dan ketidakstabilan fisika lainnya. Ukuran partikel yang diperkecil melalui proses *nanomilling* maupun *high pressure homogenizer* memerlukan jenis teknik yang optimal, komposisi bahan penstabil (seperti surfaktan dan kosurfaktan) serta lama proses yang tepat. Oleh karena itu, perlu parameter evaluasi seperti ukuran dan morfologi partikel (Lucida, 2015). Menurut Guterres, *et al.* (2007) bahwa morfologi suatu permukaan nanopartikel berpengaruh terhadap kemampuannya dalam

menembus suatu membran sel target. Jika nanopartikel memiliki permukaan yang bulat akan mempermudah nanopartikel tersebut memasuki sel.

Menurut Wangchuk & Loukas (2018), stabilitas dan kelarutan senyawa pada larutan uji mempengaruhi terhadap nilai KHM yang dihasilkan. Partikel dalam ukuran nano berpotensi mudah mengalami agregasi (Bali, *et al.*, 2019). Menurut Mardiyati (2012) nanopartikel yang memiliki polidispersitas tinggi, tingkat keseragamannya rendah yang salah satu penyebabnya adalah terjadinya agregasi partikel. Agregasi partikel dapat menyebabkan ukuran partikel meningkat bahkan menjadi berukuran mikro (Nugraheni, 2015). Perubahan tersebut berpengaruh terhadap laju disolusi atau tingkat kelarutan sediaan (Binarjo, 2015). Menurut Kumar (2011) obat yang memiliki tingkat kelarutan rendah maka efektivitasnya akan berkurang dan menyebabkan kebutuhan dosis meningkat.

Tekstur nanopartikel rimpang jeringau tersalut kitosan yang dihasilkan cenderung mudah menggumpal (agglomerasi). Berdasarkan penelitian Norodin, *et al* (2017) menyatakan bahwa ekstrak yang mengandung minyak atsiri dan memiliki tekstur berminyak akan mudah menggumpal. Selain itu, dengan ukuran partikel $\leq 0,355$ mm memudahkan partikel menggumpal. Varona, *et al.* (2013) menyatakan bahwa peningkatan oli atau polimer untuk enkapsulasi akan meningkatkan ukuran partikel dan aglomerasi semakin banyak. Kemudian, kandungan minyak atsiri yang tinggi serta terdapat bagian yang tidak terenkapsulasi mengakibatkan minyak tersebut menempel pada partikel sehingga partikel lengket dan menggumpal.

Ukuran nanopartikel rimpang *A. calamus* tersalut kitosan berdasarkan laporan penelitian Muchtaromah, *et al.* (2020) berukuran sekitar 913 nm hingga 1,76 μ m, serta distribusi persebaran partikel sebesar 1159 nm. Ukuran nanopartikel kitosan yakni sekitar 405 nm hingga 1,02 μ m, serta distribusi persebaran partikel sebesar 713 nm. Berdasarkan penelitian tersebut menyatakan bahwa durasi sonikasi larutan nanopartikel mempengaruhi ukuran partikel yang dihasilkan. Semakin lama durasi sonikasi larutan, maka semakin kecil partikel yang dihasilkan.

Semakin lama waktu sonikasi dan tinggi amplitudo akan menurunkan nilai kekeruhan pada larutan. Hal tersebut terjadi karena larutan menjadi lebih homogen dan ukuran partikel sangat kecil, sehingga kondisi homogen akan lebih bertahan

saat masa penyimpanan. Alat ultrasonikator memanfaatkan gelombang amplitudo sehingga terjadi pengecilan ukuran partikel. Semakin kecil ukuran partikel yang dihasilkan, maka memudahkan partikel untuk larut (Rusdiana dkk, 2018).

Adanya keterkaitan antara konsentrasi kitosan dengan tripolifosfat terhadap ukuran nanopartikel yang terbentuk. Semakin besar konsentrasi kitosan dan tripolifosfat yang digunakan dalam sintesis nanopartikel, maka ukuran partikel yang terbentuk semakin besar. Selain itu, pH juga mempengaruhi ukuran nanopartikel. Perbedaan pH berpengaruh pada jumlah ion amin yang akan terprotonasi. Semakin tinggi konsentrasi kitosan, maka pH semakin menurun dan ukuran nanopartikel yang terbentuk semakin besar (Pakki, dkk., 2016).

Untuk pengendalian infeksi biofilm mikroba, ada beberapa hal yang perlu diperhatikan antara lain ukuran partikel, bentuk, sifat permukaan dan interior dari nanopartikel yang terbentuk. Ukuran nanopartikel sangat berpengaruh terhadap kemampuan penetrasi partikel ke dalam biofilm bakteri dan ukuran partikel tidak boleh melebihi dimensi saluran air dalam biofilm. Saluran dan pori-pori bakteri umumnya berkisar 10 nm (mengacu pada saluran air yang menjadi area agregat bakteri dalam biofilm) hingga beberapa mikrometer (pori-pori atau lubang biofilm). Permukaan nanopartikel bermuatan positif menarik lapisan ganda elektrostatis terhadap permukaan sel bakteri yang bermuatan negatif (Liu, *et al.*, 2019).

Bentuk nanopartikel berpengaruh terhadap kemampuan meningkatkan gaya adhesi lokal yang dapat menghasilkan perubahan tegangan permukaan membran dan menyebabkan kerusakan membran. Bentuk nanopartikel juga dapat menyebabkan kebocoran konstituen intraseluler dan kematian sel. Nanopartikel berbentuk bulat memiliki daya serapan seluler tertinggi, namun menyebabkan sedikit kerusakan pada membran. Lain halnya pada nanopartikel berbentuk batang atau lainnya memiliki area kontak yang lebih besar dengan reseptor membran sel, sehingga menyebabkan kerusakan membran yang lebih besar dan memungkinkan terjadinya peradangan kronis (Liu, *et al.*, 2019).

Bentuk nanopartikel rimpang jeringau tersalut kitosan tidak berbentuk bulat (*sferis*), melainkan berbentuk prisma atau seperti pecahan kristal yang memiliki beberapa sudut. Saputra (2016) menyatakan bahwa semakin banyak partikel yang

tidak sferis, maka semakin banyak terdapat sudut pada partikel. Keberadaan sudut pada partikel-partikel mempermudah terjadinya kontak antar sudut, sehingga terjadi aglomerasi.

Interior nanopartikel berpengaruh terhadap kemampuan memuat agen antimikroba sehingga tepat menuju target. Hal ini dikarenakan agen antimikroba dalam bentuk nanopartikel dapat kehilangan muatannya sebelum mencapai area infeksi, sehingga diperlukan konjugasi menjadi nanocarrier yang dapat melindungi bahan antimikroba melalui ikatan kimiawi dan mudah terurai ketika mencapai target (Liu, *et al.*, 2019).

Selain dari sifat fisik nanopartikel, kelarutan partikel dalam pelarut sangat berpengaruh dalam kemampuan aktivitas antimikroba. Dalam uji mikrodilusi cair ini digunakan media cair sebagai pelarut suspensi sekaligus media pengencer suspensi. Berdasarkan penelitian antimikroba *A. calamus* oleh Radusiene, *et al* (2008) yakni terdapat kendala pada kelarutan minyak atsiri terhadap media cair, sehingga dimungkinkan dapat mengurangi kemampuan aktivitas antimikroba jika dibandingkan dengan antibiotik sebagai kontrol positif.

Kendala lain saat uji mikrodilusi cair yakni kelarutan bahan kitosan dalam DMSO yang rendah. Kitosan merupakan polisakarida kation yang memiliki pH netral, mengandung kelompok amino bebas sehingga tidak larut dalam air. Pada pH asam, kelompok amino mengalami protonasi sehingga dapat membuat kitosan larut dalam air (Sannan, *et al.*, 1976). Umumnya digunakan asam asetat 1-3% cair untuk melarutkan kitosan (Nicol, 1991). Nihayah (2016) menambahkan bahwa kelarutan kitosan dalam air dan beberapa pelarut organik seperti dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), pelarut alkohol organik dan piridin tergolong rendah (sulit larut). Kitosan mudah larut dalam asam organik atau mineral encer melalui protonasi gugus amino bebas (NH_2 menjadi NH_3) pada pH kurang dari 6,5. Kitosan mudah larut dalam asam format, asam asetat dan asam glutamat. Bertambahnya berat molekul kitosan akan membuat tingkat kelarutan semakin menurun.

Nanopartikel merupakan kelompok *Solid Colloidal Drug Delivery System* yang dapat disimpan dalam bentuk padat. Penyimpanan nanopartikel selama satu tahun masih dapat diencerkan kembali mejadi larutan *colloidal*, serta masih

memiliki sifat *in vitro* maupun *in vivo* yang baik. Batas umur simpan nanopartikel yang baik masih belum diketahui (Hasan, dkk., 2012). Berdasarkan penelitian organoleptik Rahmat, dkk (2016) nanopartikel ekstrak nanas tersalut kitosan tidak mengalami perubahan warna maupun bau setelah dilakukan pengamatan selama empat minggu pada suhu kamar dan 4°C. Nanopartikel dengan tingkat kelarutan rendah dapat diatasi dengan cara mengurangi ukuran nanopartikel, sehingga meningkatkan penguraian partikel dalam pelarut (Horter & Dressman, 2001).

Penciptaan alam semesta beserta isinya tidak mungkin tanpa disertai alasan dan manfaat di dalamnya. Di Bumi terdapat berbagai macam tanaman tumbuh dengan karakter yang berbeda. Sedangkan diciptakannya manusia bertujuan untuk merawat serta memanfaatkan seluruh bahan alam termasuk beragam jenis tanaman yang ada. Allah SWT berfirman dalam Al-Qur'an surat Al-An'am: 141, yang berbunyi:

وَهُوَ الَّذِي أَنْشَأَ جَنَّاتٍ مَّعْرُوشَاتٍ وَغَيْرَ مَعْرُوشَاتٍ وَالنَّخْلَ وَالزَّرْعَ مُخْتَلِفًا أَكْلُهُمُ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُتَشَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ كُلُوا مِنْ ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَءَاتُوا حَقَّهُ يَوْمَ حَصَادِهِ وَلَا تُسْرِفُوا إِنَّهُ لَا يُحِبُّ الْمُسْرِفِينَ ﴿١٤١﴾

Artinya : “Dan Dialah yang menjadikan kebun-kebun yang berjunjung dan yang tidak berjunjung, pohon korma, tanam-tanaman yang bermacam-macam buahnya, zaitun dan delima yang serupa (bentuk dan warnanya) dan tidak sama (rasanya). **Makanlah dari buahnya (yang bermacam-macam itu) bila dia berbuah, dan tunaikanlah haknya di hari memetik hasilnya** (dengan disedekahkan kepada fakir miskin); dan janganlah kamu berlebih-lebihan. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang yang berlebih-lebihan” (Al-An'am :141).

Ayat tersebut menggambarkan betapa besar nikmat Allah SWT serta melarang segala yang mengantarkan kepada melupakan nikmat-nikmat-Nya. “*Wahuwalladzii= Dan Dia yang*”, maka tiada selain-Nya yang “*Ansya-a*” menumbuhkan atau menjadikan ketidakadaan menjadi kebun anggur atau yang lainnya “*Ma'ruusyaatin= berjunjung*” yakni disanggah oleh tiang atau pohon yang kokoh “*Wa ghairu ma'ruusyaatin*” maupun tidak berjunjung (menjalar dan merambat) (Shihab, 2002). Jeringau (*A. calamus* L.) tergolong tanaman yang

termasuk dalam jenis “*Ghairu ma’ruusyaatin*”, sebab tanaman ini tergolong herba dengan batang berupa stolon yang bercabang (Balakumbahan, *et al.*, 2010).

Ayat ini menjelaskan bahwa Allah SWT memerintahkan manusia untuk memakan buah yang bermacam-macam, serta mensesdekahkan hasil yang diperolehnya kepada orang yang membutuhkan (larangan untuk berlaku berlebihan) (Shihab, 2002). Pemanfaatan bahan alam tidak hanya dapat digunakan sebagai bahan pangan, melainkan dapat digunakan sebagai pengobatan seperti obat antimikroba alami. Rimpang jeringau (*Acorus calamus*) memiliki potensi sebagai antimikroba alami.

Aktivitas antimikroba dapat diketahui melalui beberapa uji, antara lain yakni uji zona hambat dan uji dilusi bertingkat. Uji zona hambat dilakukan sebagai konfirmasi adanya kemampuan agen antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroba. Kemudian, uji dilusi bertingkat (Uji KHM dan Uji KBM) bertujuan untuk mengetahui kadar antimikroba uji yang tepat dalam menghambat dan membunuh mikroba. Hasil yang diperoleh digunakan sebagai tolak ukur dalam pemberian dosis perlakuan untuk menghambat pertumbuhan mikroba secara optimal. Allah SWT berfirman dalam Al-Qur’an surat Al- Hijr ayat 19 yang berbunyi:

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَّوْزُونٍ ﴿١٩﴾

Artinya : “Dan Kami telah menghamparkan bumi dan menjadikan padanya gunung-gunung dan Kami tumbuhkan padanya **segala sesuatu menurut ukuran**”(QS. Al-Hijr:19).

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah memberikan segala hal di bumi sesuai ukurannya. Segala sesuatu telah Allah jadikan dengan “*mauzun*” ukuran (ditimbang). Timbangan dan imbang (keseimbangan). Mengukur segala kejadian di bumi, seperti datangnya hujan dalam setahun agar keseimbangan kehidupan di bumi terjaga (Hamka, 1999). Ibnu Abbas mengatakan tentang “*min kulli syai’in mauzun*” artinya segala sesuatu dengan ukuran, “*mauzun*” artinya maklum (diketahui, tentu). Demikian juga dikatakn oleh Sa’id bin Jubair, Ikrimah, Abu Malik, Mujahis, Abu Hakam bin ‘Uyainah, Al-Hasan bin Muhammad, Abu Shalih

dan Qatadah. Sebagian ulama mengatakan “*mauzun*” artinya ditentukan kadarnya (Abdullah, 2007).

Penentuan kadar atau takaran dalam mencari kandidat obat antimikroba sangatlah penting guna memperoleh hasil yang maksimal. Selain itu, pentingnya takaran dalam perlakuan uji aktivitas antimikroba juga untuk mengetahui adanya potensi resistensi terhadap mikroba uji. Kesesuaian kadar dijelaskan dalam Al-Qur'an surat Al-A'raf ayat 31, yang berbunyi:

يٰۤاٰدَمُ خُذْ زِينَتَكَ عِنْدَ كُلِّ مَسْجِدٍ وَكُلْ وَشَرِبْ وَلَا تُسْرِفْ اِنَّهٗ لَا يُحِبُّ الْمُسْرِفِيْنَ ﴿٣١﴾

Artinya : “Hai anak Adam, pakailah pakaianmu yang indah di setiap (memasuki) mesjid, makan dan minumlah, dan janganlah berlebih-lebihan. **Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang-orang yang berlebih-lebihan**”(QS. Al-A'raf: 31).

Ayat di atas mengatakan bahwa Allah tidak menyukai hal-hal yang berlebihan. Berlebihan dalam artian melampaui batas yang patut (Hamka, 1999). Al-Jazairi (2007) menjelaskan bahwa “*Wala Tusrifuu*” pada ayat tersebut mengandung arti jangan berlebih-lebihan dalam makan dan minum. “*Israaf*” artinya melampaui batas dari yang semestinya dalam segala sesuatu. Hal ini menunjukkan bahwa segala sesuatu ada takarannya, sehingga manusia harus sadar betul akan kebutuhan segala hal. Segala sesuatu yang berlebihan akan memberikan dampak yang buruk. Sama halnya dalam pemberian konsentrasi kandidat antimikroba. Konsentrasi yang terlalu tinggi juga berpotensi menyebabkan kekebalan pada mikroba target, sehingga terjadi resistensi.

Uji aktivitas antimikroba nanopartikel jeringau merupakan suatu upaya pengembangan obat alami dalam bidang nanoteknologi. Resistensi mikroba terhadap antibiotik, serta manfaat bahan alam yang melimpah memerlukan pendayagunaan yang tepat. Seiring berkembangnya zaman, manusia mengembangkan teknologi untuk memperoleh kehidupan yang lebih baik kedepannya. Allah swt memerintahkan agar manusia berusaha memperbaiki

kehidupannya yang terdapat dalam Al-Qur'an surat Al-Mulk ayat 15 yang berbunyi:

هُوَ الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ ذُلُولًا فَامْشُوا فِي مَنَاكِبِهَا وَكُلُوا مِن رِّزْقِهِ ۚ وَإِلَيْهِ
النُّشُورُ ﴿١٥﴾

Artinya : “Dialah yang menjadikan bumi untuk kamu yang mudah dijelajahi, maka jelajahi lah di segala penjurunya dan makanlah sebagian dari rezeki-Nya. Dan hanya kepada-Nya-lah kamu (kembali setelah) dibangkitkan”(QS. Mulk: 15).

Tafsir Al-Azhar dalam memaknai kata “Dzalulan” yang artinya rendah, di bawah kaki manusia atau dibawah pijakan manusia. Hal ini menunjukkan bahwa bumi ini merupakan pijakan manusia. “ *Famsyuu fii manaa kibihaa = Maka berjalanlah kamu di segala penjurunya.*” Diumpamakanlah manusia berjalan di atas permukaan bumi sebagai berjalan di atas pundak atau bahu bumi. Artinya bumi yang telah dibuat pijakan oleh Allah untuk manusia, hendaklah engkau kuasai, keluarkan kekayaannya, galihlah buminya, timbalah lautnya, tebanglah kayunya, ambilah ikannya. “*Wa kuluu min rizqihii = Dan makanlah daripada rezekiNya.*” Yakni usahakanlah dengan segala daya upaya yang ada padamu. Dengan akal, fikiran dan kecerdasan. Kamu tidak boleh berpangku tangan menunggu rezeki. Rezeki akan didapat menurut besar usaha dan perjuangan. “*Dan kepada-Nyalah akan pulang.*” (Hamka, 1999).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dari penelitian ini adalah:

1. Nilai daya hambat nanopartikel jeringau tersalut kitosan terhadap *S. aureus* sebesar 24 ± 1 mm (Sangat Kuat), pada *E. coli* sebesar $15,27 \pm 1,1$ mm (Kuat), dan pada *C. albicans* sebesar $11,25 \pm 2,48$ mm (Kuat).
2. Nilai KHM nanopartikel jeringau tersalut kitosan terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 2,5% sebanyak $17,2 \times 10^3$ CFU/mL, terhadap *E. coli* pada konsentrasi 2,5% < Nilai KHM < 5%, dan terhadap *C. albicans* pada konsentrasi 1,25% sebanyak $40,4 \times 10^3$ CFU/mL. Nilai KBM nanopartikel jeringau tersalut kitosan yakni pada *S. aureus* sebesar 5%, *E. coli* sebesar 5% dan pada *C. albicans* tidak diperoleh nilai KBM.

5.2 Saran

Saran dari penelitian ini antara lain :

1. Perlu dilakukan penelitian kandungan kadar senyawa ekstrak rimpang jeringau, nanopartikel rimpang jeringau tersalut kitosan, kitosan dan nanopartikel kitosan.
2. Perlu dilakukan uji fisikokimia pada ekstrak rimpang jeringau, nanopartikel rimpang jeringau tersalut kitosan, kitosan dan nanopartikel kitosan.
3. Perlu dicari formulasi dan teknik yang lebih tepat dalam sintesis nanopartikel rimpang jeringau.
4. Sebaiknya uji difusi cakram dilakukan dengan variasi konsentrasi bahan uji.
5. Penelitian lebih lanjut terhadap pengaruh nanopartikel rimpang jeringau tersalut kitosan terhadap mikroba selain *S. aureus*, *E. coli* dan *C. albicans*.
6. Perlu adanya uji tambahan yang lebih spesifik dalam karakterisasi nanopartikel.

7. Perlu dilakukan uji lebih lanjut dari uji antimikroba secara *in vitro* menjadi secara *in vivo*.



DAFTAR PUSTAKA

- A'iana, Lu'Lu', Rafika Sari & Pratiwi Apridamayanti. 2017. Penentuan Nilai FICI Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe vera* (L.) Burm.f.) dan Gentamisin Sulfat Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Pharm Sci Res*. Vol 4(3).
- Abdullah. 2007. *Lubaabut Tafsir Min Ibni Katsir*. Jilid 5. Penerjemah M. Abdul Ghafur dan Abu Ihsan al-Astsari. Jakarta: Pustaka Imam Asy-Syafi'i.
- Ahmad, Mujahidin. 2015. Skrining Aktivitas Antioksidan Jamu Subur Kandungan Komersial. *El-Hayah*. Vol 5(2).
- Ahmed, T. A., & Bader M. A. 2016. Preparation, Characterization, and Potential Application of Chitosan, Chitosan Derivates, and Chitosan Metal Nanoparticles in Pharmaceutical Drug Delivery. *Drug Design, Development and Therapy*. 10:483-507.
- Al-Jauziyah, Ibnu Qayyim. 2000. *Zadul Ma'ad*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Al-Jazairi, S.A.B.J. 2007. *Tafsir Al-Qur'an Al-Aisar*. Bandung: ITB.
- Al-Qudah, I.H., Ahmed Al-Radaideh, Nader A., & Asok M. 2017. Comparison of Antibacterial Efficacy of Miswak Extract to Conventional Mouth Washes-A Microbiological Study. *Biosciences Biotechnology Research ASIA*. Vol 14(1): 99-104.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). 2005. *APHA Method 9215: Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater*. Washington, D.C: APHA.
- Anisah, Siti K., & Ari H. Y. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Protobiont*. Vol 3(3): 1-5.
- Aniszewski, Tadeusz. 2007. *Alkaloid Secret of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Amsterdam: Elsevier.
- Balakumbahan, R., K. Rajamani, & K. Kumanan. 2010. *Acorus calamus*: An Overview. *Journal of Medicinal Plant Research*. Vol 4 (25).
- Bali, Hanie Yavarpour, Maryam Ghasemi-Kasman & Marzieh Pirzadeh. 2019. Curcumin-Loaded Nanoparticles: A Novel Therapeutic Strategy in Treatment of Central Nervous System Disorders. *International Journal of Nanomedicine*. 14: 4449-4460.
- Balouiri, M., Moulay S., & Saad K.I. 2016. Methods for *In Vitro* Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Vol 6: 71-79.

- Barua, C.C., Suparna S., Anindhya S.D., Anindita T., Nayan J.H., Acheenta G.B., Ananta M.B., & Iswar B. 2014. A Comparative Study of the *In Vitro* Antioxidant Property of Different Extract of *Acorus calamus* Linn. *J. Nat. Prod. Resour.* Vol 4(1): 8-18.
- Berlian, Zainal, Awalul Fatiqin, & Eka Agustina. 2016. Penggunaan Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) dalam Menghambat bakteri *Escherichia coli* pada Bahan Pangan. *Jurnal Bioilmi.* Vol 2(1).
- Beveridge, T. J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *J. Bacteriol.* 1999. 181(16), 4725–4733.
- Binarjo, Annas. 2015. Stabilitas Fisika dan Kimia Rekristal dan Dispersi Padat Piroksikam-PEG 6000. *Pharmaciana.* Vol 5(1): 63-68.
- Bitew, Adane, Yeshiwork Abebaw, Delayehu Bekele, Amete Mihret. 2017. Research Article: Prevalence of Bacterial Vaginosis and Associated Risk Factors among Woman Complaining of Genital Tract Infection. *Hindawi International Journal of Microbiology.*
- Brooks, G.F., Janet S.B, & Stephen A.M. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg.* Edisi 23. Alih Bahada Huriawati H., dkk. Jakarta: EGC.
- Carolina M. A. Santos, Maria C.V. Pires, Thiago L. Leao, Zulema P. Hernandez, Marisleydys L. Rodriguez, Ariane K.S Martins, Lilian S. Miranda, Flaviano S. martins & Jacques R. Nicoli. 2016. Selection of Lactobacillus Strains As Potential Probiotics for Vaginitis Treatment. *Microbiology.* 162: 1195-1207. DOI 10.1099/mic.0.000302.
- Cassone, A. 2014. Vulvovaginal *Candida albicans* Infections: Pathogenesis, Immunity and Vaccine Prospec. *Int. J. Obs. Gyn.* Vol 122(6): 758-794. DOI: <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12994> .
- Choiri, Z., Ronny M., Nanung D. D., & Zuprizal. 2016. Biosintesis dan Karakterisasi Nano-enkapsulasi Ekstrak Buah Mengkudu (*Moringa citrifolia*) dengan Kitosan-Sodium Tripolifosfat sebagai Kandidat Antioksidan Alami. *Prosiding Simposium Nasional Penelitian dan Pengembangan Tropik Tahun 2016 “Pengembangan Peternakan Berbasis Plasma Nutfah dan Kearifan Lokal Mendukung Agroekologi Berkelanjutan”*. Yogyakarta: Fakultas Peternakan UGM.
- CLSI. 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Eleventh Edition.* CLSI document M02-A11. Wayne, PA: CLSI.
- CLSI. 2016. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: CLSI.
- De Carvalho, Fabiola Galbiatti, Tais Chaves M., Natalia Moreira T., Brenna Louise C.G., Hugo Lemes C., Rogerio Lacerda dos Santos, Alan Reis de Oliveira, & Angelo Marcio L.D. 2019. Synthesis and Characterization of TPP/Chitosan

- Nanoparticles: Colloidal Mechanism of Reaction and Antifungal Effect on *C. albicans* Biofilm Formation. *Materials Science & Engineering C*. 104.
- De Paz, L.E.C., Anton R., Kenneth A.H., Duncan S.S., & Peter L.W. 2011. Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on *Streptococcus mutans* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 77.
- Devi, S. A., & Deepak G. 2009. Antimicrobial Activity of *Acorus calamus* (L.) Rhizome and Leaf Extract. *Acta Biologica Szegediensis*. Vol 53(1): 45-59.
- Dewi, Fajar Kusuma. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L). Terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.
- Dirjen POM. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan Pertama. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Halaman 3-5, 10-11.
- Donders G.G.G., G Bellen., & D. Rezeberga. 2011. Aerobic Vaginitis in Pregnancy. *BJOG*. 118: 1163-1170.
- Donders, Gilbert G. G., Katerina Ruban, & Gert Bellen. 2015. Selecting Anti-Microbial Treatment of Aerobic Vaginitis. *Curr Infect Dis Rep*.
- Dorey, L., S. Hobson, & P. Lees. 2016. Factors Influencing the Potency of Marbofloxacin for Pig Pneumonia Pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*. *Research in Veterinary Science*.
- Dowd, Frank J. 2007. *Candida albicans Infections*. USA: Elsevier Inc.
- Dupont, S., Guillaume L., Thierry F., Philippe C., Patrick G., & Laurent B. 2012. Ergosterol Biosynthesis: A Fungal Pathway for Life on Land?. *Evolution*. 66-9: 2961-2968.
- Eppendorf. 2015. OD600 Measurements Using Different Photometers. *White Paper*. No 28: 1-4.
- Faner, R., Oriol S., Alvar A., Eric B., James D. C., Gary B. H., Chaysavanh M., Philip L. M., Roger P., Vicente P. B., Julia P., Sanjay S., Jordi D., & Eduard M. 2017. The Microbiome in Respiratory Medicine: Current Challenges and Future Perspective. *Eur Respir J*. Vol 49. <https://doi.org/10.1183/13993003.02086-2016>.
- Feng, Q.L., J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, & J.O. Kim. 2000. *A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. John Wiley & Sons, Inc.
- Ganesan, R.M., & H. Gurumalles P. 2015. Synthesis of Gold Nanoparticles using Herbal *Acorus calamus* Rhizome Extract and Coating on Cotton Fabric for Antibacterial and UV Blocking Applications. *Arabian Journal of Chemistry*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.017>.

- Garcia-Rubio, Rocio, Haroldo C. de Oliveira, Johanna Rivera, & Nuria Trevijano-Contador. 2020. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology*. Vol 10.
- Ginting, E. 2013. Carotenoid Extraction of Orange-Fleshed Sweet Potato and its Application as Natural Food Colorant. *J. Teknol dan Industri Pangan*. Vol 24.
- Gondim, Brenna Louise Cavalcanti, Lucio Roberto Cancado Castellano, Ricardo Dias de Castro, Giovanna Machado, Hugo Lemes Carlo, Ana Maria Gondim Valenca, Fabiola Galbiatti de Carvalho. 2018. Effect of Chitosan Nanoparticles on the Inhibition of *Candida* spp. Biofilm on Denture Base Surface. *Archive of Oral Biology*. Vol 94.
- Guarro, J., Josep G., & Alberto M.S. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol 12 (3).
- Guterres, Silvia S., Marta P. Alves, & Adriana R. Pohlmann. 2007. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*. p. 147-157.
- HAMKA (Haji Abdul Malik Karim Amrullah). 1999. *Tafsir Al-Azhar*. Jilid 4. Singapura: Pustaka Nasional PTE.
- HAMKA (Haji Abdul Malik Karim Amrullah). 1999. *Tafsir Al-Azhar*. Jilid 5. Singapura: Pustaka Nasional PTE.
- HAMKA (Haji Abdul Malik Karim Amrullah). 1999. *Tafsir Al-Azhar*. Jilid 10. Singapura: Pustaka Nasional PTE.
- Harborne J.B. 1996. *Metode Fitokimia*. Ed. Ke-2. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Harti, A.S. 2012. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Kesehatan*. Yogyakarta: Nuha Medika.
- Hasan, Muhammad Nur. 2015. Pengaruh Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) dalam Beberapa Pelarut Organik Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Antifungi Secara *in vitro*. Skripsi. Malang: UIN Malang.
- Hasan, Zainal H.A.E, I Made Artika, Vita Rosaline Fahri, & Nurmala Sari. 2012. Penerapan Teknologi Nanopartikel untuk Sediaan Obat (Antibiotik Berbasis Bahan Alam, Propolis *Trigona* spp). *Chem. Prog*. Vol 5(1).
- Hastuti, R. D., Diding P., & Sri H. H. 2013. Perbedaan Kadar Caffeic Acid Phenethyl Ester pada Propolis Ekstrak Etanol dan Propolis Ekstrak Air. *Biofarmasi*. Vol 11(2).
- Honary S., Ghajar K., Khazaeli P., Shalchian P. 2011. Preparation, Characterization and Antibacterial Properties of Silver-Chitosan Nanocomposites Using Different Molecular Weight Grades of Chitosan. *Trop J Pharm Res*. Vol 10(1):69.

- Horter D. & Dressman J.B. 2001. Influence of Physicochemical Properties on Dissolution of Drugs in the Gastrointestinal Tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 46: 75-87.
- Hudzicki, J. 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*.
- Irianto, Koes. 2013. *Mikrobiologi Medis Pencegahan-Pangan-Lingkungan*. Bandung: Alfabeta.
- Jawetz, E., J.L. Melnick, & E.A. Adelberg. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika.
- Jawetz, Melinick & Adelberg's. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology)*. Jakarta: Salemba Medika.
- Jumaah, N., Sanmukh R.J., & Doblin S. 2014. Prevalence of Bacterial Contamination When Using a Diversion Pouch During Blood Collection: A Single Center Study in Malaysia. *Malays J Med Sci*. Vol 21(3): 47-53.
- Kaban, J., Hakim B., Asteria K.D., & Daniel. 2006. Pembuatan Membran Kompleks Polielektrolit Alginat Kitosan. *Jurnal Sains Kimia*. Vol 10 (1).
- Kasten, M.J. 1999. Clindamycin, Metronidazole, and Chloramphenicol. *Mayo Foundation for Medical Education and Research*. 74:825-833.
- Katzung, B.G., S.B. Masters, & A.J Trevor. 2012. *Basic & Clinical Pharmacology*. 12th Ed. United States: McGraw-Hill Companies.
- Kemenag. 2020. *Qur'an Kemenag*. (Online). <https://quran.kemenag.go.id/index.php/sura/26/80>. Diakses pada tanggal 11 Januari 2020.
- Khare, C. P. 2004. *Indian Herbal Remedies: Rational Western Theraphy, Ayurvedic and Other Traditional Usage, Botany*. (Online). Springer: Germany. <https://books.google.co.id/books?id=463ERB3VeUoC&pg=PA20&dq=acorus+calamus&hl=id&sa=X&ved=0ahUKEwiLtsKi6bjmAhUC8XMBHdt3DxMQ6AEISDAD#v=onepage&q=acorus%20calamus&f=false>. Diakses pada 16 Desember 2019.
- Koukaras, E.N., Sofia A.P., Dimitrios N.B., & George E.F. 2012. Insight on the Formation of Chitosan Nanoparticles Through Ionotropic Gelation with Tripolyphosphate. *Molecular Pharmaceutics*. 9: 2856-2862.
- Kravanja, G., Mateja P., Zeljko K., Maja L. 2019. Review: Chitosan-Based(Nano)Materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules*. Vol 24.
- Kritchenkov, S. Andreii., Anton R.E., Ilya S.K., Natallia V.D., Olga V.V., Tatsiana V.S., Aleh V.K., & Yury A.S. 2019. Synthesis of Novel 1*H*-tetrazole Derivates of Chitosan Via Metal-catalyzed 1,3-dipolar Cycloaddition. Catalitic and Antibacterial Properties of [3-(1*H*-tetrazole-5-yl)ethyl]Chitosan

- and Its Nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol 132.
- Kumar, Anuj, Sangram Keshri Sahoo, Kumud Padhee, Prithi Pal Singh Kochar, Ajit Satapathy & Naveen Pathak. 2011. Review on Solubility Enhancement Techniques for Hydrophobic Drugs. *Pharmacie Globale*. Vol 3(3): 1-7.
- Kumar, S.N., S.R. Aravind, T.T. Sreelekha, Jubi J., & B.S Dileep K. 2015. Asarone from *Acorus calamus* in Combination with Azoles and Amphotericin B: A Novel Synergistic Combination to Compete Against Human Pathogenic *Candida* Species In Vitro. *Appl Biochem Biotechnol*.
- Kurniasih, M., Kapti R., Tien S., & Ira S. 2018. Adsorpsi Ion Ni(II) Menggunakan Crosslink Kitosan Tripolifosfat. *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan*. Vol 13 (2): 174-181.
- Lakshmi K., Aishwarya J.R., Chitrakleha S., & Menezes G.A. 2013. Review on Infectious Vaginitis. *Review Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science*. Vol 4(3).
- Lanimarta, Yurika. 2012. Pembuatan dan Uji Penetrasi Nanopartikel Kurkumin Dendrimer Polamidoamin (PAMAM) Generasi 4 dalam Sediaan Gel dengan Menggunakan Sel Difusi Franz. *Skripsi*. Depok: FMIPA UI.
- Leba, Maria Aloisia Uron. 2017. *Buku Ajar Ekstraksi dan Real Kromatografi*. Yogyakarta: Deepublish.
- Li, Fu-Shuang & Jing-Ke W. 2017. Demystifying Traditional Herbal Medicine with Modern Approaches. *Nature Plants*. Vol 3(17109).
- Liling, Vania V., Yessie K. Lengkey, Christel N. Sambou, & Reky R. Palandi. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Buah Pepaya *Carica papaya* L. Terhadap Bakteri Penyebab Jerawat *Propionibacterium acnes*. *Jurnal Biofarmasetikal Tropis*. Vol 3(1): 112-121.
- Lin, Yu-Hsin., Kiran S., Kurt M.L., Jyuhn-Huarng J., Fwu-Long M., Han-Wen Y., & Hsing-Wen S. 2008. Multi-Ion-Crosslinked Nanoparticles with pH-Responsive Characteristics for Oral Delivery of Protein Drugs. *Journal of Controlled Release*. Vol 132: 141-149.
- Liu, X.F., Yun L.G., Dong Z.Y., Zhi L., & Kang D.Y. 2001. Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol 79.
- Liu, Yong, Linqi Shi, Linzhi Su, Henny C. van der Mei, Paul C. Jutte, Yijin Ren, & Henk J. Busscher. 2019. Nanotechnology-Based Antimicrobials and Delivery Systems for Biofilm-Infection Control. *Chem. Soc. Rev.* Vol 48: 428-446.
- Lubis, Ramona D. 2008. *Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara*. USU Press.

- Lucida, Henny. 2015. Abstract Book: Nanopartikel untuk Sediaan Farmasi. Pertemuan Ilmiah Tahunan & RAKERNAS IAI 2015. Sumatera Selatan. ([http://repository.uinjkt.ac.id/dspace/bitstream/123456789/35774/1/ISMIAR NI%20KOMALA%20-%20FKIK](http://repository.uinjkt.ac.id/dspace/bitstream/123456789/35774/1/ISMIAR%20KOMALA%20-%20FKIK)). Diakses pada 28 September 2020.
- Mabhiza, D., Tariro C., & Stanley M. 2016. Antibacterial Properties of Alkaloid Extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia adoensis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medicinal Chemistry*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6304163>
- Mahboubi, Arash, Jinous Asgarpanah, Parisa Nosrati Sadaghiyani, Mehrdad Faizi. 2015. Total Phenolis and Flavonoid Content and Antibacterial Activity of *Punica granatum* L. var. *Pleniflora* Flowers (Golnar) Against Bacterial Strains Causing Foodborne Diseases. *BMC Complementary & Alternative Medicine*. Vol 15 (366).
- Makagansa, Christine, Christine F. Mamujaja, Lucia C. Mandey. 2015. Kajian Aktivitas Anti-Bakteri Ekstrak Biji Pangi (*Pangium edule Reinw*) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* secara In Vitro. *J. Ilmu dan Teknologi Pangan*. Vol 3(1).
- Marchaim, Dror, Leslie Lemanek, Suchitha Bheemreddy, Keith S. Kaye, Jack D. Sobel. 2012. Flucanazole-Resistant *Candida albicans* Vulvovaginitis. *Obstetrics & Gynecology*. Vol 120 (6).
- Mardliyati, Etik, Sjaikhurizal El Muttaqien & Damai Ria Setyawati. 2012. Sintesis Nnaopartikel Kitosan-Tripolyphosphate dengan Metode Gelasi Ionik: Pengaruh Konsentrasi dan Rasio Volume Terhadap Karakteristik Partikel. *Prosiding Pertemuan Ilmiah Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Bahan*. ISSN 1411-2213.
- Martien, R., Adhyatmika, Iramie D.K.I., Verda F., & Dian P.S. 2012. Perkembangan Teknologi Nanopartikel sebagai Sistem Penghantaran Obat. *Majalah Farmaseutik*. Vol 8(1).
- Mohammadi, M., Saeed N., & Mohammad P. 2019. Immobilization of Endoglucanase Cel9A on Chitosan Nanoparticles Leads to Its Stabilization Against Organic Solvents: The Use of Polyols to Improve the Stability. *3 Biotech*. Vol 9: 269.
- Mohammed, M.A., Jaweria T.M.S., Kishor M.W., & Ellen K.W. 2017. Review: An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics*. Vol 9 (53).
- Monhanraj, V.J. & Y. Chen. 2006. Nanoparticles- A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. Vol 5 (1): 561-573.
- Muchtaromah, Bayyinatul, Didik Wahyudi, Mujahidin Ahmad, & Rahmi Annisa. 2020. Nanoparticle Characterization of *Allium sativum*, *Curcuma mangga*

- and *Acorus calamus* as a Basic of Nanotechnology on Jamu Subur Kandungan Madura. *Pharmacogn J.* Vol 12(5): 1152-1159.
- Muchtaromah, Bayyinatul, Mujahidin Ahmad, Koestanti E. S., Ma'rifatul Y., & Labone V. 2017. Phytochemicals, Antioxidant and Antifungal Properties of *Acorus calamus*, *Curcuma mangga*, and *Allium sativum*. *KnE Life Science*.
- NCCLS. 2002. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition*. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. USA: NCCLS.
- Nicol, S. 1991. Life After Death for Empty Shells. *New Sci.* Vol 129: 46-48.
- Nihayah, Anisa Nurun. 2016. Pelapisan Kitosan pada Buah Stroberi (*Fragaria vesca*) sebagai Upaya Memperpanjang Umur Simpan. *Jurnal Inovasi Proses*. Vol 1(1).
- Norodin, N.S.M., L.M. Salleh, Hartati, & N.M. Mustafa. 2017. Supercritical Carbon Dioxide (SC-CO₂) Extraction of Essential Oil from *Swietenia mahagoni* Seeds. *Materials Sciences and Engineering*. Vol 162. Doi: 10.1088/1757-899X/162/1/012030.
- Nugraheni, Ade, Nanang Yunarto & Novi Sulistyaningrum. 2015. Optimasi Formula Mikroenkapsulasi Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dengan Penyalut Berbasis Air. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. Vol 5(2): 98-105.
- Nurliana, M. Sudarwanto, L.I. Sudirman, & A.W Sanjaya. 2009. Prospek Makanan Tradisional Aceh sebagai Makanan Kesehatan: Deteksi Awal Aktivitas Antimikrob Minyak Pliek I dan Ekstrak Kasar dari Pliek U. *Forum Pascasarjana*. Vol 32(1): 1-10.
- Pakki, Ermina, Sumarheni, Aisyah F., Ismail, Syarfina Safirahidzni. 2016. Formulasi Nanopartikel Ekstrak Bawang Dayak (*Elrutherine americana* (Aubl) Merr) dengan Variasi Konsentrasi Kitosan-Tripolifosfat (TPP). *J. Trop. Pharm. Chem.* Vol 3 (4).
- Pal, Sovan Lal, Utpal Jana, P. K. Manna, G. P. Mohanta, & R. Manavalan. 2011. Nanoparticle: An Overview of Preparation and Characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. (6): 228-234.
- Pelczar, M.J & Chan, E.C.S. 1998. *Dasar-dasar Mikrobiologi (Jilid 2)*. Jakarta: UI Press.
- Pelczar, Michael J., & Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI-Press.
- Pelczar, Michael J., & E.C.S. Chan. 2009. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 2*. Penerjemah Ratna Siri Hadietomo, dkk. Jakarta: UI Press.

- Pena, A., Norma S.S., & Martha Calahorra. 2013. Effects of Chitosan on *Candida albicans*: Conditions for Its Antifungal Activity. *BioMed Research International*.
- Poeloengan, Masniari, Andriani, Susan M Noer, Iyep Komala & Mirza Hasna. 2007. Uji daya antibakteri ekstrak etanol kulit batang bungur (*Largerstoremia speciosa* Pers) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara in vitro, *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*, Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor, diakses pada tanggal 7 September 2020 < http://bbalitvet.litbang.deptan.go.id/ind/attachments/247_80.pdf.>
- Prasad, R (Ed). 1991. *Candida albicans Cellular and Molecular Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-75253-7.
- Prasad, R. 2017. *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*. 2nd Edition. Switzerland: Springer International Publishing AG. (Online). https://books.google.co.id/books?id=IJ8NDgAAQBAJ&pg=PA44&dq=candida+albicans+morphology&hl=id&sa=X&ved=0ahUKEwieiO3Ut7_mAhUIWX0KH5C2MQ6AEIKTAA#v=onepage&q=candida%20albicans%20morphology&f=true. Diakses pada tanggal 18 Desember 2019.
- Prawira, Mahmud Yudha, Sarwiyono, & Puguh Surjowardojo. 2013. Daya Hambat Daun Kekok Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Penyebab Penyakit Mastitis pada Sapi Perah. Malang: Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
- Prescott, L.M. *et al*. 2005. *Microbiology*. New York: McGraw-Hill.
- Prihantoro, Teguh, Rasjad Indra, & Sumarno. 2006. Efek Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum*) Terhadap *Shigella dysenteriae* Secara In Vitro. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol. XXII, No.3.
- Purwanti, Nera Umilia & Ressi Susanti. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri dan Antifungal Ekstrak Etanol Rimpang *Acorus* sp. *Jurnal Kesehatan Khatulistiwa*. Vol 2(1).
- Puspitasari, Anita Dwi & Lean Syam Proyogo. 2017. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*. Vol 2(1).
- Rabea, E.I., Mohamed E.-T.B., Christian V.S., Guy S., & Walter S. 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*. Vol 4(6).
- Radji, M. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Radusiene, J., D. Peciulyte, & A. Judzentiene. 2008. Volatile Constituents of *Acorus calamus* and Their Antimicrobial Activity. *Acta Hort*. 765.

- Rahmat, Deni, Dian Ratih L., Liliek Nurhidayati, & Meilda Ayu Bathini. 2016. Peningkatan Aktivitas Antimikroba Ekstrak Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) dengan Pembentukan Nanopartikel. *Jurnal Sains dan Kesehatan*. Vol 1(5).
- Rajalakshmi R., Sangeetha D., & Udhaya V. 2017. Effect of Antifungal Drugs Against *Candida* Isolates from Diabetic Women with Vaginitis. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*. Vol 5 (4).
- Rajput, Sandeep B., Madan B. Tonge, S. Mohan Karuppayil. 2014. Review: An Overview on Traditional Uses and Pharmacological Profile of *Acorus calamus* Linn. (Sweet flag) and Other *Acorus* Species. *Phytomedicine*. Vol 21.
- Rawat, M., Deependra S., S. Saraf., & Swarnlata S. 2006. Nanocarriers: promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biol.Pharm.Bull.* Vol 29(9).
- Reddy, J. N., Rani M., Arvind K. G., & S. Sudha R. 2014. Biological Activities of Green Silver Nanoparticles Synthesized with *Acorus calamus* Rhizome Extract. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.024>
- Reshes, Galina, Sharon Vanounou, Itzhak Fishov, Mario Feingold. 2008. Cell Shape Dynamics in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal*. Vol 94.
- Rita, Wiwik Susanah, I Wayan Suirta, Putu Prisanti Putri Utami. 2017. Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* Linn.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Cakra Kimia*. Vol 5(2).
- Rita, Wiwik Susanah, Retno Kawuri, & I Made Dira Swantara. 2017. The Essential Oil Contents of Jeringau (*Acorus calamus* L.) Rhizomes and Their Antifungal Activity Against *Candida albicans*. *Journal of Health Sciences and Medicine UNUD Journals*. Vol 1(1).
- Rizvi, Syed A.A. & Ayman M. Saleh. 2018. Review Applications of Nanoparticle Systems in Drug Delivery Technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 26: 64-70.
- Roberts, G.A.F. 1992. *Chitin Chemistry*. Houndmills, Basingstoke, Hampshire RG21 2XS and London: The Macmillan Press Ltd.
- Rosenbach, F.G. 1884. *Mikro-Organismen bei den Wund-infections-Krankheiten des Menschen*. Wiesbaden, J.F. Bergmann.
- Rusdiana, Ika Agustin, Erilza Hambali, & Mulyorini Rahayuningsih. 2018. Pengaruh Sonikasi terhadap Sifat Fisik Formula Herbisida yang Ditambahkan Surfaktan Dietanolamida. *Agroradix*. Vol 1(2): 34-40.

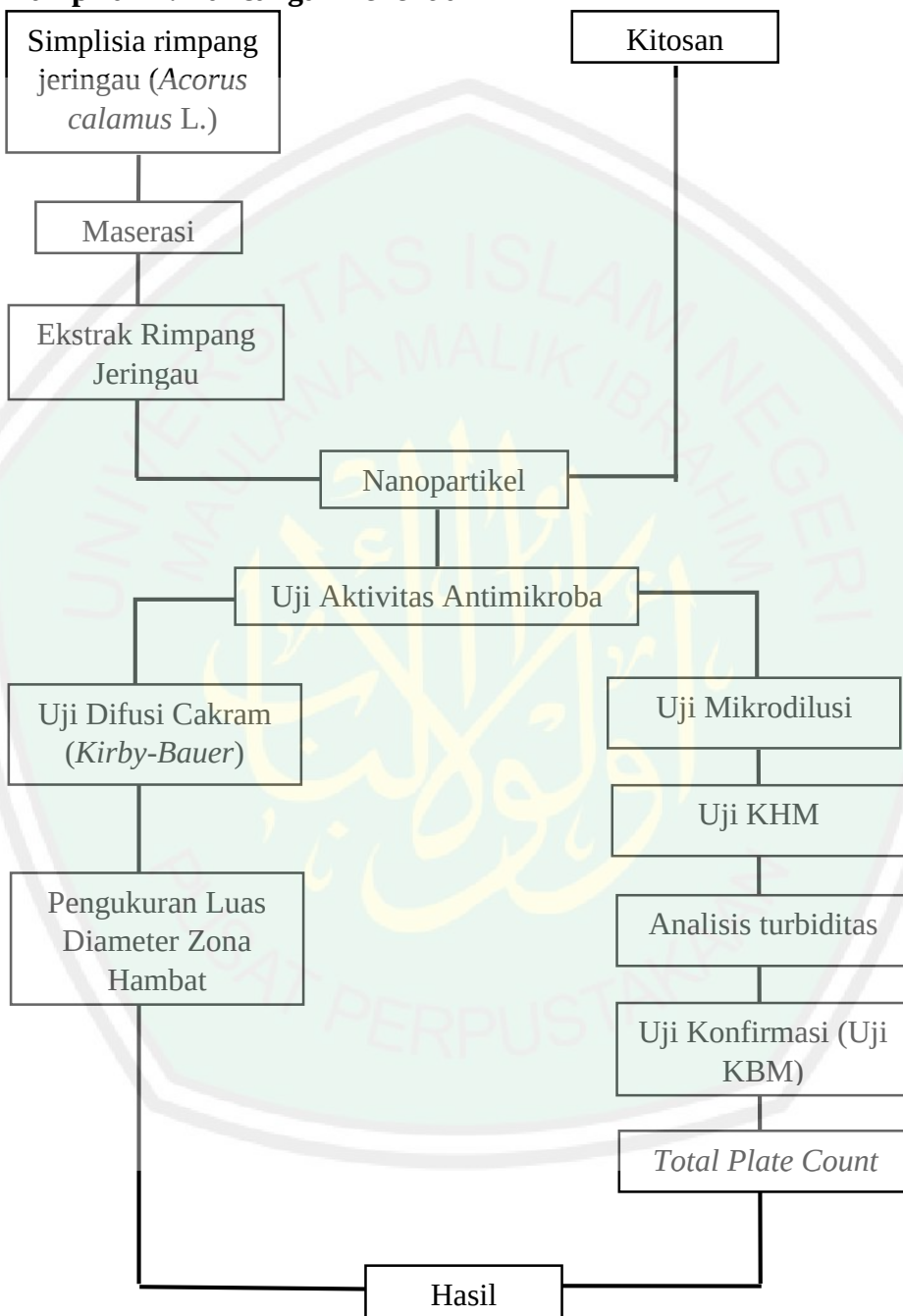
- Rustini, N. L. 2010. Aktivitas Antijamur Minyak Atsiri Rimpang Dringo (*Acorus calamus* L.) Terhadap Jamur *Botryotiplodia theobromae* Penyebab Busuk Buah Pisang. *Jurnal Kimia*. Vol 4 (2): 173-179.
- Sabol, Kalthryn E., Kelly L. Echevarria, & James S. Lewis II. 2006. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: New Bug, Old Drugs. *The Annals of Pharmacotherapy*. Vol 40.
- Sannan, T., K. Kurita, & Y. Iwakura. 1976. Studies on Chitin, 2: Effect of Deacetylation on Solubility. *Makromol. Chem*. Vol 177: 3589-3600.
- Saputra, Gia. 2016. Karakterisasi Nanoenkapsulasi Kitosan-Ekstrak Etanol 70% Daun Sirih (*Piper betle* Linn) dengan Metode Gelasi Ionik. *Naskah Publikasi*. Pontianak: Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura.
- Sari, Gina Lova, Yulinah Trihadiningrum, & Ni'matuzahroh. 2019. Isolation and Identification of Native Bacteria from Total Petroleum Hydrocarbon Polluted Soil in Wonocolo Public Oilfields, Indonesia. *Journal of Ecological Engineering*. Vol 20 (8): 60-64.
- Sariadji K. & Masri Sembiring. 2019. Kajian Pustaka: Uji Kepekaan Antibiotik pada *Corynebacterium diphtheriae*. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*. Vol 8.2: 121-133.
- Seidemann, J. 2005. *World Spice Plants, Economic Usage, Botany, Txonomy*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. (Online). https://books.google.co.id/books?id=fhN0VK2608QC&printsec=frontcover&dq=World+Spice+Plants:+Economic+Usage,+Botany,+Taxonomy+Oleh+Johannes+Seidemann&hl=id&sa=X&ved=0ahUKEwjxmOaA_svmAhXSXSsKHU0ACUAQ6AEIKTAA#v=onepage&q=World%20Spice%20Plants%20Economic%20Usage%2C%20Botany%2C%20Taxonomy%20Oleh%20Johannes%20Seidemann&f=false. Diakses pada 23 Desember 2019.
- Shi, Zhilong, K. G. Neoh, E.T. Kang, & W. Wang. 2006. Antibacterial and Mechanical Properties of Bone Cement Impregnated with Chitosan Nanoparticles. *Biomaterials*. Vol 27: 2440-2449.
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Vol 4. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Vol 9. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Vol 10. Jakarta: Lentera Hati.
- Sobel, Jack D. 2007. Vulvovaginal Candidosis. *Lancet*. 369: 1961-1971.
- Sobel, Jack D. 2007. Vulvovaginal Candidosis. *Lancet*. Vol 369: 1961-1971.

- Soleimani, Neda, Ashraf Mohabati Mobarez, Mahroo Seyed Jafari Olia, & Fatemeh Atyabi. 2015. Synthesis, Characterization and Effect of the Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticle on Vancomycin-Resistant Enterococcus and Other Gram Negative or Gram Positive Bacteria. *International Journal of Pure & Applied Sciences & Technology*. Vol 26 (1): 14-23.
- Steven Y. C. Tong, Joshua S. Davis, Emily Eichenberger, Thomas L. Holland, Vance G. Fowler, Jr. 2015. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* Vol 28 (3). DOI: 10.1128/CMR.00134-14.
- Sukmawati & Fatimah Hardianti. 2018. Analisis *Total Plate Count* (TPC) Mikroba pada Ikan Asin Kakap di Kota Sorong Papua Barat. *Jurnal Biodjati*. Vol 3(1).
- Toy, Torar S. S., Benedictus S. Lampus, Bernat S. P. Hutagulung. 2015. Uji Daya Hambat Ekstrak Rumpun Laut *Gracilaria* sp. terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal e-GiGi (eG)*. Vol 3 (1).
- Ulfah, M. 2020. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Aseton Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Farmasi Muhammadiyah Kuningan*. Vol 5(1): 25-31.
- Varona, Salima, Angel Martin, Maria Jose Cocero, & Catarina M.M Duarte. 2013. Encapsulation of Lavandin Essential Oil in Poly-(ϵ -caprolactones) by PGSS Process. *Chemical Engineering Technology*. Vol 36(7): 1187-1192.
- Venkatesan, R., Prakash S.K., Gnanamani A., & Kadalmani B. 2017. β -Asarone Exhibits Antifungal Activity by Inhibiting Ergosterol Biosynthesis in *Aspergillus niger* ATCC 16888. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B. Biol. Sci.*
- Wang, Y., Yujie G., Hui D., Shejiang L., Xu H., Jianzhou G., & Dan L. 2017. Subcritical Ethanol Extraction of Flavonoids from *Moringa oleifera* Leaf and Evaluation of Antioxidant Activity. *Food Chemistry*. Vol 218: 152-158.
- Wang, Zhi-liang, Lan-yong F., Zheng-ai X., Qin Q., Teng-hua Y., Yu-tong W., Yuan-yuan H., & Yong-hong Z. 2016. Diagnosis and Microecological Characteristics of Aerobic Vaginitis Outpatients Based on Performed Enzymes. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. Vol 55:40-44.
- Wangchuk, Phurpa & Alex Loukas. 2018. Techniques and Technologies for the Biodiscovery of Novel Small Molecule Drug Lead Compounds from Natural Products and Drug Discovery. Amsterdam: Elsevier (<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102081-4.00016-2>).
- Williams, A. R. 1983. *Panel Discussion on Mechanism and Biological Effects*. New York: Academic Press.
- World Health Report (WHO). 2002. *WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005*. Geneva: WHO (document: WHO/EDM/TRM/2002.1).

- Wu, Xiao-Feng (ed.). 2018. *Solvents as Reagents in Organic Synthesis: Reaction and Applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Wuon, Kleysia D., Damajanty H.C. Pangemanan, & P.S. Anindita. 2018. Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Getah Kulit Buah Pisang Goroho (*Musa acuminata* L.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal e-GiGi (eG)*. Vol 6 (2).
- Yuan, Y., Feng Z., Haibin S., & Yugen Z. 2019. Structural Design of Microbicidal Cationic Oligomers and Their Synergistic Interaction with Azoles Against *Candida albicans*. *Scientific Reports*. Vol 9: 11885. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48322-x>.
- Yunita, Merisa, Yusuf Hendrawan, & Rini Yulianingsih. 2015. Analisis Kuantitatif Mikrobiologi pada Makanan Penerbangan (*Aerofood ACS*) Gaaruda Indonesia Berdasarkan TPC (*Total Plate Count*) dengan Metode *Pour Plate*. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*. Vol 3 (3).

LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



Lampiran 2. Preparasi Sampel

2.1 Ekstraksi Maserasi

Simplisia Rimpang Jeringau

- Ditimbang 100 g simplisia rimpang jeringau dengan menggunakan neraca analitik.
- Dimasukkan dalam botol kaca 1 liter.
- Dituangkan 500 mL etanol 70% untuk merendam simplisia.
- Diaduk menggunakan sendok agar tercampur rata.
- Didiamkan selama 24 jam dalam kondisi gelap.
- Dimaserasi kembali ampas dengan menggunakan pelarut yang sama selama 24 jam (dilakukan 2 kali remaserasi).
- Dilakukan penguapan pada filtrat yang dihasilkan menggunakan *rotary vacum evaporator*.

Ekstrak Rimpang Jeringau

2.2 Sintesis Nanopartikel

Kitosan

- Ditimbang sebanyak 3 g kitosan menggunakan neraca analitik.
- Dilarutkan asam asetat glasial sebanyak 3 mL ke dalam 597 mL aquades sambil dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 800-1000 rpm.
- Ditambahkan larutan STPP sebanyak 0,6 g dalam 120 mL aquades.
- Dicampurkan kedua larutan (STPP dan asam asetat glasial), kemudian ditambahkan kitosan dan dihomogenkan pada kecepatan 800-1000 rpm.
- Ditambahkan 0,6 g ekstrak rimpang jeringau ke dalam larutan kitosan, lalu dihomogenkan kembali.
- Dilakukan proses homogenisasi kembali menggunakan disperser pada kecepatan 10.000 rpm selama 90 menit, serta ditambahkan 1 mL tween 80.
- Dilakukan sonikasi menggunakan ultrasonicator pada frekuensi 20 kHz dan amplitude 80% selama 90 menit.
- Disentrifugasi untuk memisahkan pelarut (*supernatant*) dengan sampel terlarut (*pellet*).
- Diinkubasi sampel di dalam *freezer* selama 24 jam.
- Dikeringkan sampel dalam oven suhu 37°C hingga kering.
- Dihaluskan sampel menggunakan mortar dan alu hingga halus.
- Disaring sampel menggunakan ayakan 30 mesh.

Nanopartikel Jeringau

2.3 Sterilisasi Alat

Alat gelas

- Ditutup mulut alat gelas dengan aluminium foil atau kapas dan kasa, kemudian dilapisi dengan plastik *wrap*.
- Dibungkus cawan petri dengan kertas putih, kemudian dimasukkan dalam plastik tahan panas.
- Dimasukkan ke dalam autoklaf dengan tekanan 15 psi pada suhu 121°C selama 15-30 menit.

Alat gelas steril

2.4 Pembuatan Media

NA

- Ditimbang serbuk media NA sebanyak 5 g.
- Dimasukkan ke dalam gelas beker 250 mL.
- Ditambahkan aquades steril sebanyak 250 mL (NA racikan 20g/L).
- Dihomogenkan larutan dengan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*.
- Dipanaskan media hingga mendidih.
- Dituang media dalam erlenmeyer 300 mL.
- Ditutup mulut erlenmeyer dengan aluminium foil dan dilapisi dengan plastik *wrap*.
- Dimasukkan erlenmeyer dalam autoklaf untuk disterilisasi.

NA steril

SDA

- Ditimbang serbuk media SDA sebanyak 16,25 g.
- Dimasukkan ke dalam gelas beker 250 mL.
- Ditambahkan aquades steril sebanyak 250 mL.
- Ditambahkan NaCl 0,9% sebanyak 4,8 mL dan kloramfenikol 120 mg.
- Dihomogenkan larutan dengan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*.
- Dipanaskan media hingga mendidih.
- Dituang media dalam erlenmeyer 300 mL.
- Ditutup mulut erlenmeyer dengan aluminium foil dan dilapisi dengan plastik *wrap*.
- Dimasukkan erlenmeyer dalam autoklaf untuk disterilisasi.

SDA steril

NB

- Ditimbang serbuk media NB sebanyak 2 g.
- Dimasukkan ke dalam gelas beker 250 mL.
- Ditambahkan aquades steril sebanyak 250 mL.
- Dihomogenkan larutan dengan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*.
- Dipanaskan media hingga mendidih.
- Dituang media dalam erlenmeyer 300 mL.
- Ditutup mulut erlenmeyer dengan aluminium foil dan dilapisi dengan plastik *wrap*.
- Dimasukkan erlenmeyer dalam autoklaf untuk disterilisasi.

NB steril

SDB

- Ditimbang serbuk media SDB sebanyak 7,5 g.
- Dimasukkan ke dalam gelas beker 250 mL.
- Ditambahkan aquades steril sebanyak 250 mL.
- Dihomogenkan larutan dengan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*.
- Dipanaskan media hingga mendidih.
- Dituang media dalam erlenmeyer 300 mL.
- Ditutup mulut erlenmeyer dengan aluminium foil dan dilapisi dengan plastik *wrap*.
- Dimasukkan erlenmeyer dalam autoklaf untuk disterilisasi.

SDB steril

2.5 Identifikasi Kemurnian Mikroba

NA dan SDA steril

- Dituangkan media NA dan SDA pada cawan petri steril.
- Diambil 1 ose mikroba dari media indukan.
- Dilakukan *streak* pada permukaan media (NA untuk bakteri dan SDA untuk jamur).
- Diinkubasi dalam suhu 37°C selama 24 jam.
- Diidentifikasi bentuk, warna dan tekstur koloni yang tumbuh pada permukaan media.

Isolat murni

2.6 Regenerasi Mikroba

NA dan SDA steril

- Dituang media NA dan SDA ke dalam tabung reaksi steril.
- Diletakkan tabung reaksi pada posisi 45°, hingga media memadat.
- Diambil masing-masing 1 ose mikroba dan di *streak* pada permukaan media (NA untuk bakteri dan SDA untuk jamur).
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Isolat murni peremajaan

2.7 Pembuatan Suspensi Mikroba Uji

Isolat murni

- Diambil masing-masing 1 ose mikroba uji.
- Diinokulasikan pada masing-masing media cair steril (NB untuk bakteri dan SDB untuk jamur).
- Dihomogenkan dengan vortex.
- Diinkubasi inokulum selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Dihomogenkan dengan vortex.
- Dibuat suspensi mikroba uji dari inokulum media cair dengan perbandingan 1:9 untuk bakteri dan 1:11 untuk jamur dalam NaCl 0,9%.
- Diukur menggunakan nilai OD spektrofotometer sesuai standar Mc Farland mikroba uji.

Mikroba Mc Farland

2.8 Pembuatan Stok Larutan Uji 2,5%

Bahan uji

- Ditimbang masing-masing bahan uji baik ekstrak dan nanopartikel sebanyak 25 mg.
- Dimasukkan dalam tube 2 mL dengan label yang berbeda.
- Ditambahkan 1 mL DMSO ke dalam masing-masing tube.
- Dihomogenkan menggunakan vortex.

Larutan uji

2.9 Uji Daya Hambat (Uji Kirby-Bauer)

Media NA dan SDA steril

- Dituangkan media NA dan SDA cair ke dalam cawan petri steril.
- Ditunggu hingga media memadat.
- Direndam kertas cakram 6 mm steril ke dalam larutan uji antimikroba selama 30 menit.
- Diambil 100 μ L suspensi mikroba uji dan dituang di permukaan media padat.
- Diratakan mikroba uji di permukaan media padat menggunakan *cotton swab*.
- Dibuat 3 jaring area di bagian bawah cawan petri.
- Diletakkan 3 buah kertas cakram yang telah direndam larutan antimikroba pada masing-masing area jaring.
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- Diukur diameter zona bening menggunakan jangka sorong.
- Dianalisis.

Hasil

2.10 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

96-well plate steril

- Ditentukan kode perlakuan untuk setiap sumuran pada *well*-96 steril (huruf A-H=menunjukkan perlakuan larutan uji dan kontrol beserta ulangan, angka 1-12=menunjukkan konsentrasi perlakuan).
- Diencerkan sampel uji dalam media cair steril (NB untuk bakteri dan SDB untuk jamur) dengan perbandingan 1:10.
- Diencerkan mikroba uji dari inokulum Mc Farland dalam media cair steril (NB untuk bakteri dan SDB untuk jamur) dengan perbandingan 1:150.
- Diisi setiap sumuran pertama dengan 200 μ L sampel uji yang telah diencerkan.
- Diisi sumuran ke-2 hingga ke-5 dengan 100 μ L media cair steril.
- Dilakukan pengenceran bertingkat dengan mengambil 100 μ L dari sumuran pertama, lalu dimasukkan ke sumuran ke-2 dan seterusnya.
- Diisi masing-masing sumuran dengan suspensi mikroba uji yang telah dicairkan.
- Ditutup permukaan sumuran dan dilapisi dengan plastik *wrap*.
- *Dishaker* 120 rpm selama 10-15 menit.

- Diinkubasi dalam suhu 37°C selama 24 jam.
- Dishaker 120 rpm selama 10-15 menit.
- Diamati secara langsung kekeruhan larutan disetiap sumuran.
- Dianalisa data yang diperoleh.

Hasil

Skema perlakuan uji berdasarkan konsentrasi pada well-96

Keterangan:

Well 1:

Bahan Uji	Konsentrasi
A(1-5): Nanopartikel Jeringau+ <i>S.aureus</i> U1	1&7: Konsentrasi 5%
A(7-11): Nanopartikel Jeringau+ <i>E.coli</i> U1	2&8: Konsentrasi 2,5%
B(1-5): Nanopartikel Jeringau+ <i>S.aureus</i> U2	3&9: Konsentrasi 1,25%
B(7-11): Nanopartikel Jeringau+ <i>E.coli</i> U2	4&10: Konsentrasi 0,625%
C(1-5): Nanopartikel Jeringau+ <i>S.aureus</i> U3	5&11: Konsentrasi 0,313%
C(7-11): Nanopartikel Jeringau+ <i>E.coli</i> U3	6&12 (A): Konsentrasi 5%
D(1-5): Ekstrak Jeringau+ <i>S.aureus</i> U1	6&12 (B): Konsentrasi 2,5%
D(7-11): Ekstrak Jeringau+ <i>E.coli</i> U1	6&12 (C): Konsentrasi 1,25%
E(1-5): Ekstrak Jeringau+ <i>S.aureus</i> U2	6&12 (D): Konsentrasi 0,62,5%
E(7-11): Ekstrak Jeringau+ <i>E.coli</i> U2	6&12 (E): Konsentrasi 0,313%
F(1-5): Ekstrak Jeringau+ <i>S.aureus</i> U3	
F(7-11): Ekstrak Jeringau+ <i>E.coli</i> U3	
G(1-5): Kitosan + <i>S.aureus</i> U1	
G(7-11): Kitosan+ <i>E.coli</i> U1	
H(1-5): Kitosan+ <i>S.aureus</i> U2	
H(7-11): Kitosan+ <i>E.coli</i> U2	
A-E(6): Kitosan+ <i>S.aureus</i> U3	
A-E(12): Kitosan+ <i>E.coli</i> U3	
F(6): K- (DMSO)+ <i>S.aureus</i>	
F(12): K- (DMSO)+ <i>E.coli</i>	

Well 2:

Bahan Uji	Konsentrasi
F(1-5): Nanopartikel Kitosan+ <i>S.aureus</i> U1 F(7-11): Nanopartikel Kitosan+ <i>E.coli</i> U1 G(1-5): Nanopartikel Kitosan+ <i>S.aureus</i> U2 G(7-11): Nanopartikel Kitosan+ <i>E.coli</i> U2 A-E(6): Nanopartikel Kitosan+ <i>S.aureus</i> U3 A-E(12): Nanopartikel Kitosan+ <i>E.coli</i> U3	1&7: Konsentrasi 5% 2&8: Konsentrasi 2,5% 3&9: Konsentrasi 1,25% 4&10: Konsentrasi 0,625% 5&11: Konsentrasi 0,313%
F(6): K+ (Klindamisin) 5%+ <i>S.aureus</i> F(12): K+ (Klindamisin) 5%+ <i>E.coli</i> G(6): K+ (Klindamisin) 2,5%+ <i>S.aureus</i> G(12): K+ (Klindamisin) 2,5%+ <i>E.coli</i>	6&12 (A): Konsentrasi 5% 6&12 (B): Konsentrasi 2,5% 6&12 (C): Konsentrasi 1,25% 6&12 (D): Konsentrasi 0,62,5% 6&12 (E): Konsentrasi 0,313%

Well 3:

Bahan Uji	Konsentrasi
A(7-11): Nanopartikel jeringau+ <i>C.albicans</i> U1 B(7-11): Nanopartikel jeringau+ <i>C.albicans</i> U2 C(7-11): Nanopartikel jeringau+ <i>C.albicans</i> U3 D(7-11): Ekstrak jeringau+ <i>C.albicans</i> U1 E(7-11): Ekstrak jeringau+ <i>C.albicans</i> U2 F(7-11): Ekstrak jeringau+ <i>C.albicans</i> U3 G(1-5): Kitosan+ <i>C.albicans</i> U1 G(7-11): Nanopartikel kitosan+ <i>C.albicans</i> U1 H(1-5): Kitosan+ <i>C.albicans</i> U2 H(7-11): Nanopartikel kitosan+ <i>C.albicans</i> U2 A-E(6): Kitosan+ <i>C.albicans</i> U3 A-E(12): Nanopartikel kitosan+ <i>C.albicans</i> U3	1&7: Konsentrasi 5% 2&8: Konsentrasi 2,5% 3&9: Konsentrasi 1,25% 4&10: Konsentrasi 0,625% 5&11: Konsentrasi 0,313%
F(6): K+(Nystatin) 5%+ <i>C.albicans</i> G(6): K+(Nystatin) 2,5%+ <i>C.albicans</i> F(12): K-(DMSO) 5%+ <i>C.albicans</i>	6&12 (A): Konsentrasi 5% 6&12 (B): Konsentrasi 2,5% 6&12 (C): Konsentrasi 1,25% 6&12 (D): Konsentrasi 0,62,5% 6&12 (E): Konsentrasi 0,313%

2.11 Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Mikroba uji

- Dituang 100 μ L mikroba uji pada cawan petri steril
- Dituangkan media NA dan SDA cair pada masing-masing cawan petri berisi inokulum (*pour plate*).
- Diratakan inokulum dengan menggoyangkan cawan petri.
- Dilabeli dan dilapisi tepian cawan petri menggunakan plastik *wrap*.
- Diinkubasi bakteri pada suhu 37°C selama 24 jam dan jamur pada suhu ruang selama 24 jam.
- Dihitung dan jumlah koloni yang tumbuh menggunakan *colony counter*.
- Dianalisa data yang diperoleh.

Hasil

Lampiran 3. Rumus-Rumus

3.1 Rumus Diameter Zona Hambat

Diameter zona hambat = Diameter zona bening – Diameter kertas cakram

3.2 Rumus Standar Deviasi

Rumus Varian

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Rumus Standar Deviasi

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Keterangan:

S^2 : ragam atau varian sampel

S : standar deviasi

N : jumlah data

i : nomor data (i : 1,2,3 .. N)

x_i : data ke- i (i : 1,2,3 .. N)

$\bar{x}$: rata-rata sampel

3.3 Rumus *Total Plate Count*

$$\Sigma_{sel} = \Sigma_{koloni} \times \frac{1}{fp} \times \frac{1}{\Sigma_{inokulum}}$$

Lampiran 4. Data Hasil Uji Aktivitas Antimikroba

4.1 Tabel Diameter Zona Hambat (Kirby-Bauer Test)

No	Mikroba	Perlakuan	Diameter (mm)			Rata-rata (mm)	Kekuatan zona hambat
			U1	U2	U3		
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kontrol positif	34,34	38,29	41,87	38,17 ± 3,77	Sangat Kuat
		Kontrol negatif	0	0	0	0	Tidak Ada
		Ekstrak jeringau	30,64	28,49	28,16	29,1 ± 1,35	Sangat Kuat
		Nanopartikel jeringau	23	25	24	24 ± 1	Kuat
		Kitosan	11,25	8,92	10,8	10,32 ± 1,24	Kuat
		Nanopartikel Kitosan	27,54	24,35	24,04	25,31 ± 1,94	Sedang
2.	<i>Escherichia coli</i>	Kontrol positif	27,57	28,06	29,85	28,49 ± 1,2	Sangat Kuat
		Kontrol negatif	0	0	0	0	Tidak Ada
		Ekstrak jeringau	10,58	12,08	12,31	11,66 ± 0,94	Sedang
		Nanopartikel jeringau	15,58	16,18	14,05	15,27 ± 1,1	Kuat
		Kitosan	6,98	5,1	5,79	5,96 ± 0,95	Sedang
		Nanopartikel Kitosan	11,38	9,65	11,40	10,81 ± 1	Sedang
3	<i>Candida albicans</i>	Kontrol positif	15,61	16,78	17,52	16,64 ± 0,96	Kuat
		Kontrol negatif	0	0	0	0	Tidak Ada
		Ekstrak jeringau	7,39	7,18	7,56	7,38 ± 0,19	Sedang

	Nanopartikel jeringau	14	10,54	9,2	11,25 ± 2,48	Sedang
	Kitosan	4,94	6,22	5,73	5,63 ± 0,65	Sedang
	Nanopartikel Kitosan	8	6,3	6,1	6,8 ± 1,04	Sedang

4.2 Hasil Total Plate Count

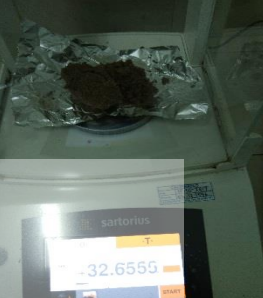
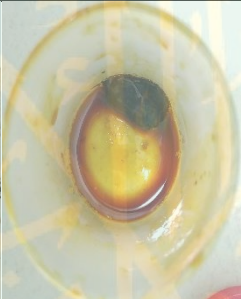
<i>Staphylococcus aureus</i>	Konsentrasi Sampel				
	5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,313%
A (NJR, U1)	0	18	∞	∞	∞
B (NJR, U2)	0	96	∞	∞	∞
C (NJR, U3)	0	∞	∞	∞	∞
D (EJR, U1)	0	756	∞	∞	∞
E (EJR, U2)	0	376	∞	∞	∞
F (EJR, U3)	0	∞	∞	∞	∞
G (Kit, U1)	0	∞	∞	∞	∞
H (Kit, U2)	0	∞	∞	∞	∞
I (Kit, U3)	0	∞	∞	∞	∞
J (NKit U1)	0	4	560	∞	∞
K (NKit U2)	0	10	812	∞	∞
L (NKit U3)	0	35	∞	∞	∞
M (K+)	0	0	0	0	0
N (K-)	∞	∞	∞	∞	∞

<i>Escherichia coli</i>	Konsentrasi Sampel				
	5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,313%
A (NJR, U1)	0	∞	∞	∞	∞
B (NJR, U2)	0	∞	∞	∞	∞
C (NJR, U3)	0	∞	∞	∞	∞
D (EJR, U1)	0	∞	∞	∞	∞
E (EJR, U2)	0	∞	∞	∞	∞
F (EJR, U3)	0	∞	∞	∞	∞
G (Kit, U1)	18	∞	∞	∞	∞
H (Kit, U2)	1	∞	∞	∞	∞
I (Kit, U3)	0	∞	∞	∞	∞
J (NKit U1)	0	0	∞	∞	∞
K (NKit U2)	0	0	341	∞	∞
L (NKit U3)	0	0	860	∞	∞
M (K+)	0	0	0	0	0
N (K-)	∞	∞	∞	∞	∞

<i>Candida albicans</i>	Konsentrasi Sampel				
	5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,313%
A (NJR, U1)	161	216	∞	∞	∞
B (NJR, U2)	18	45	115	∞	∞
C (NJR, U3)	12	47	108	∞	∞
D (EJR, U1)	0	127	∞	∞	∞
E (EJR, U2)	3	9	105	∞	∞
F (EJR, U3)	6	∞	∞	∞	∞
G (Kit, U1)	0	4	106	∞	∞
H (Kit, U2)	0	10	170	∞	∞
I (Kit, U3)	0	97	∞	∞	∞
J (NKit, U1)	24	113	314	∞	∞
K (NKit, U2)	30	129	337	∞	∞
L (NKit, U3)	51	98	215	∞	∞
M (K+)	0	0	0	0	0
N (K-)	∞	∞	∞	∞	∞

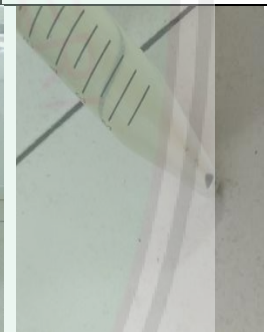
Lampiran 5. Gambar Dokumentasi Penelitian

5.1 Proses Ekstraksi

			
Penimbangan simplisia rimpang jeringau	Perendaman simplisia jeringau dalam etanol 70%, lalu diaduk menggunakan sendok	Proses penyaringan filtrat dan rendemen, serta mengukur filtrat yang diperoleh	Ditimbang hasil rendemen
			
Proses penguapan filtrat menggunakan rotary vacuum evaporator	Ekstrak Rimpang Jeringau	Ekstrak jeringau di dalam botol selai dilapisi aluminium foil, disimpan dalam freezer -13°C	

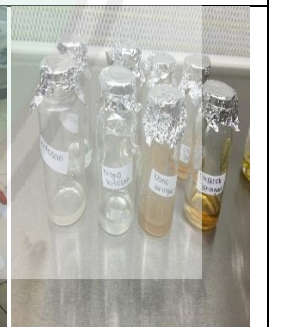
5.2 Proses Sintesis Nanopartikel

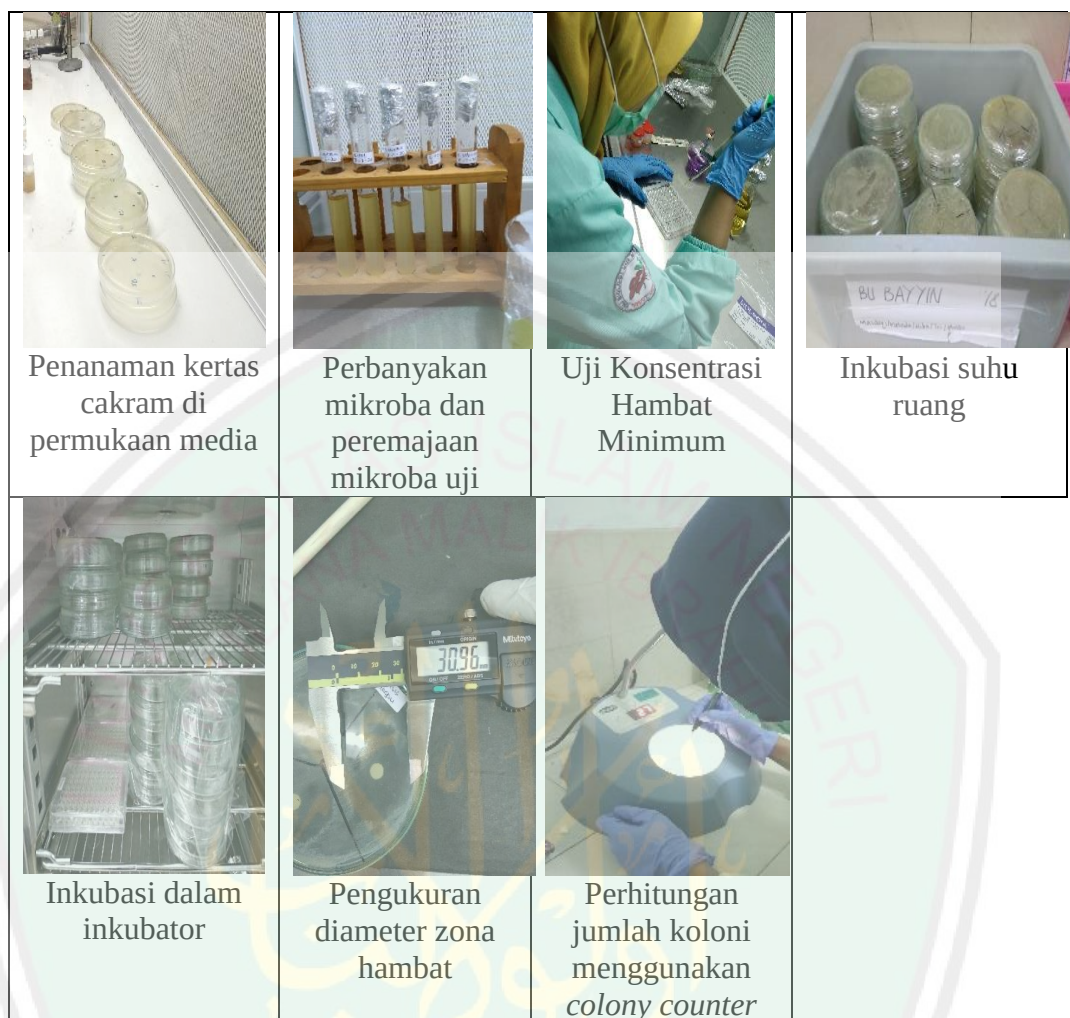
			
Kitosan	Penimbangan ekstrak jeringau	Penimbangan kitosan	Penimbangan STPP

			
Homogenisasi larutan kitosan-STPP	Pencampuran ekstrak dengan larutan kitosan-STPP	Homogenisasi menggunakan <i>homogenizer ultra turrax</i> , serta penambahan tween 80	Sonikasi larutan
			
Hasil sonikasi larutan	Larutan dituang dalam tube 15 mL	Sentrifugasi larutan	Pelet yang diperoleh
			
Pembekuan pelet pada <i>freezer</i>	Pelet dikeringkan dalam oven	Hasil pelet yang dioven (kanan) dan penumbukan pelet	Hasil penumbukan pelet

			
Penyaringan serbuk nanopartikel menggunakan ayakan 30 mesh	Ditimbang hasil serbuk nanopartikel jeringau	Serbuk nanopartikel dibungkus alumunium foil dan di dalam plastik	Nanopartikel diletakkan dalam wadah dan disimpan dalam freezer -13°C

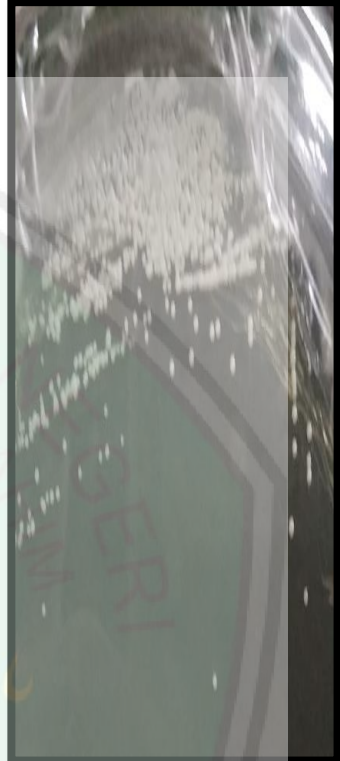
5.3 Proses Uji Aktivitas Antimikroba

			
Sterilisasi alat dan bahan dalam autoklaf	Persiapan media inokulasi	Isolat murni	Persiapan mikroba uji
			
Pengukuran OD sesuai standar Mc Farland	Kertas cakram steril (Kiri) dan 96-well plate (kanan)	Penimbangan bahan untuk larutan uji	Larutan uji untuk perendaman kertas cakram

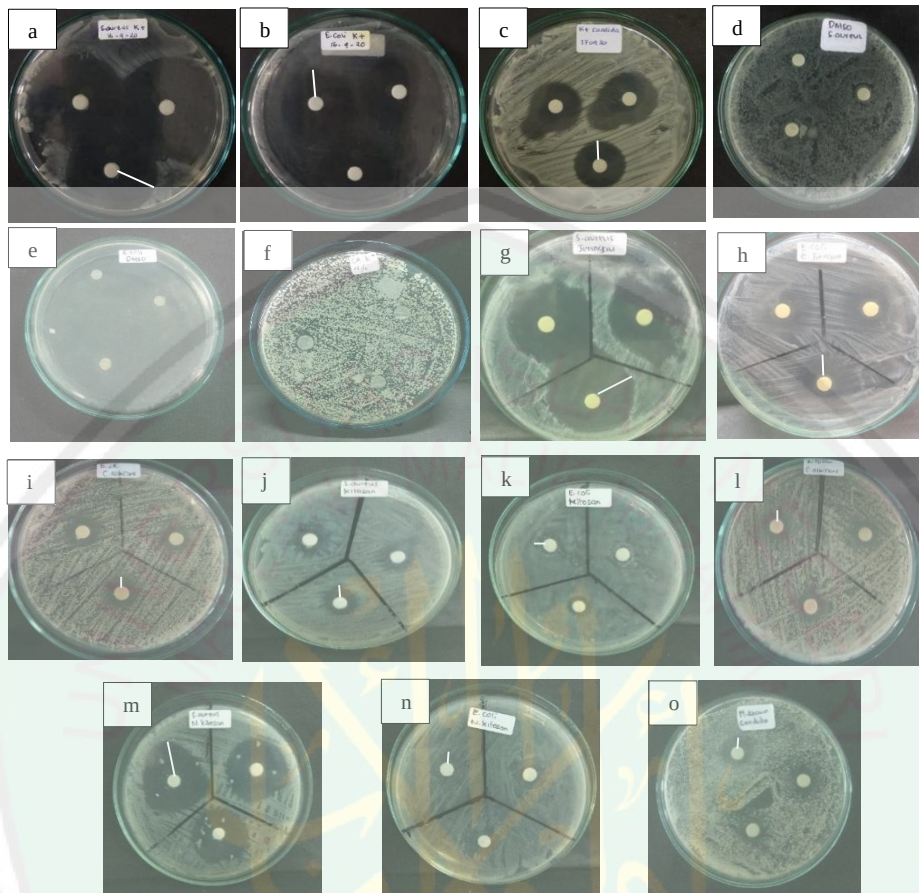


Lampiran 6. Gambar Data Hasil Penelitian

6.1 Hasil Identifikasi Kemurnian Mikroba

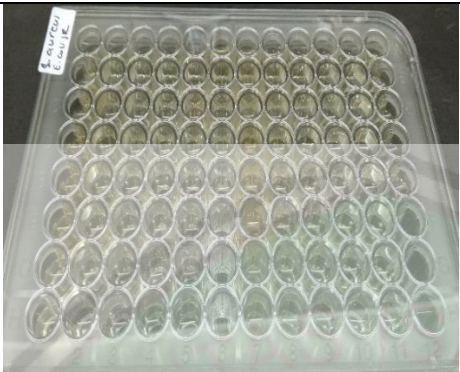
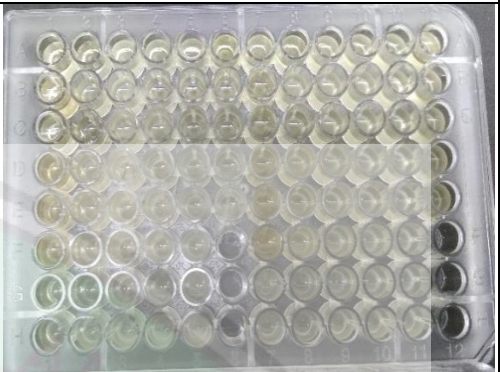
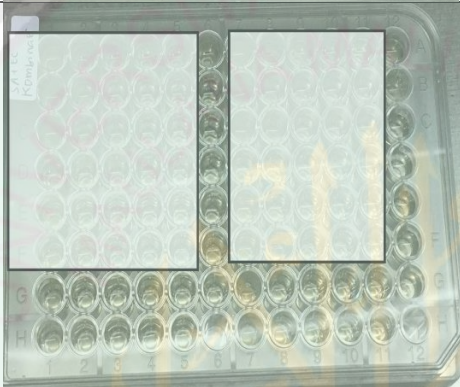
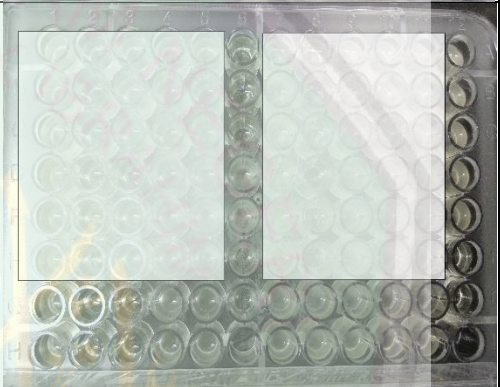
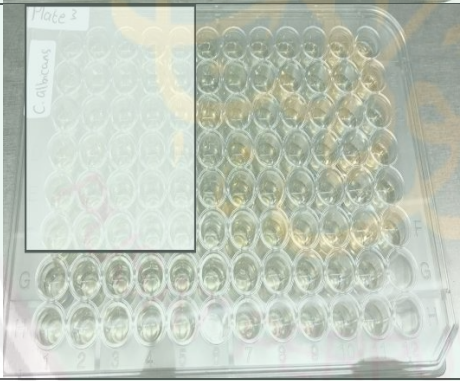
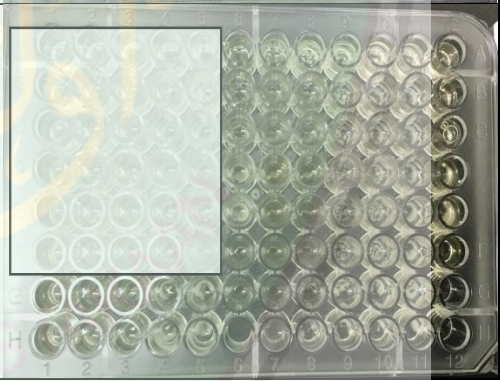
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
		

6.2 Hasil Uji Difusi Cakram

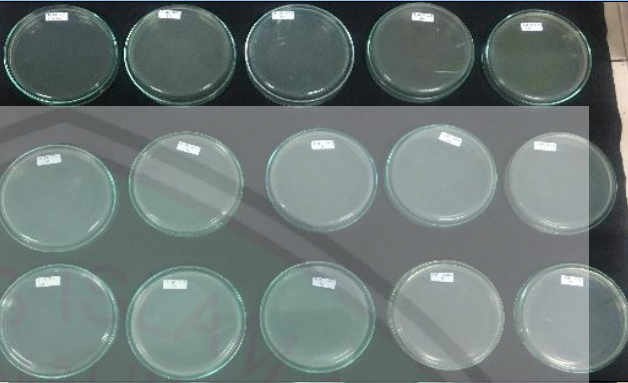
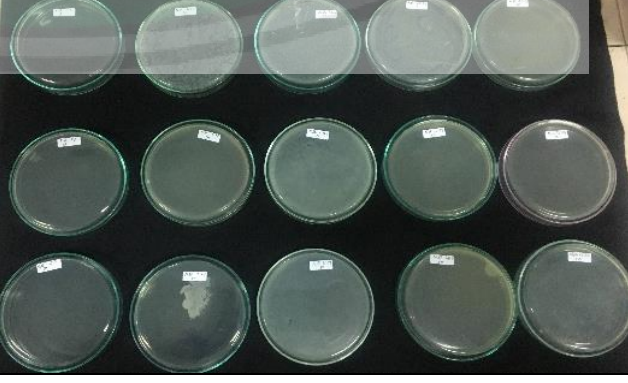


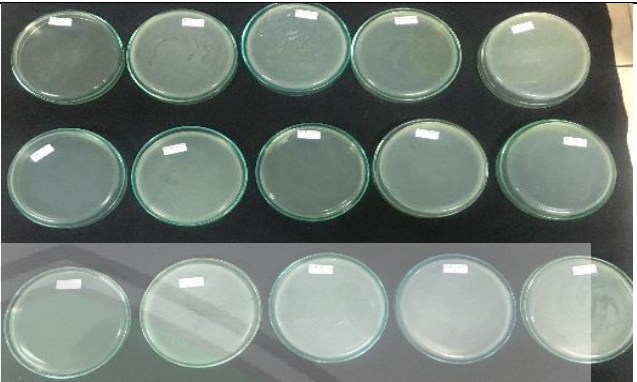
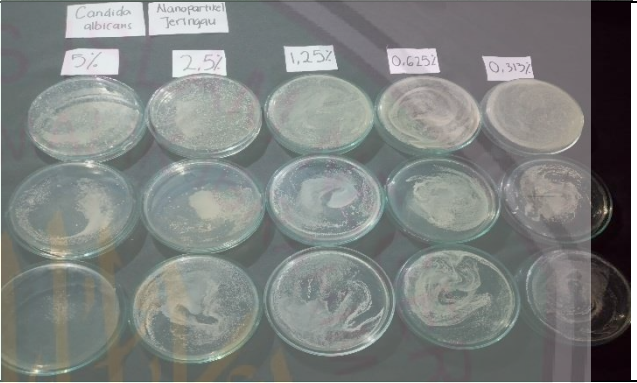
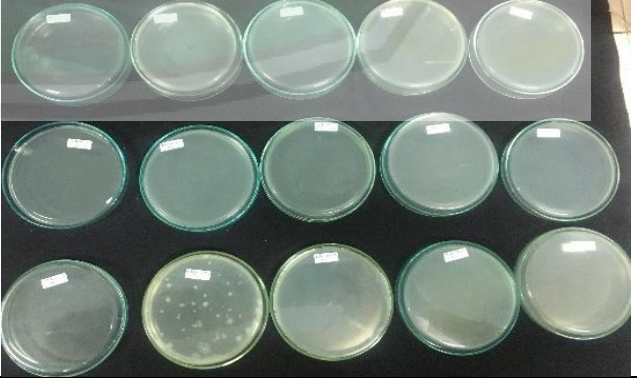
L.G.1. Hasil pengamatan uji difusi cakram (a) Kontrol positif *S. aureus*, (b) Kontrol positif *E. coli*, (c) Kontrol positif *C. albicans*, (d) Kontrol negatif *S. aureus*, (e) Kontrol negatif *E. coli*, (f) Kontrol negatif *C. albicans*, (g) Ekstrak jaringan terhadap *S. aureus*, (h) Ekstrak jaringan terhadap *E. coli*, (i) Ekstrak jaringan terhadap *C. albicans*, (j) Kitosan terhadap *S. aureus*, (k) Kitosan terhadap *E. coli*, (l) Kitosan terhadap *C. albicans*, (m) Nanopartikel Kitosan terhadap *S. aureus*, (n) Nanopartikel kitosan terhadap *E. coli*, (o) Nanopartikel kitosan terhadap *C. albicans*.

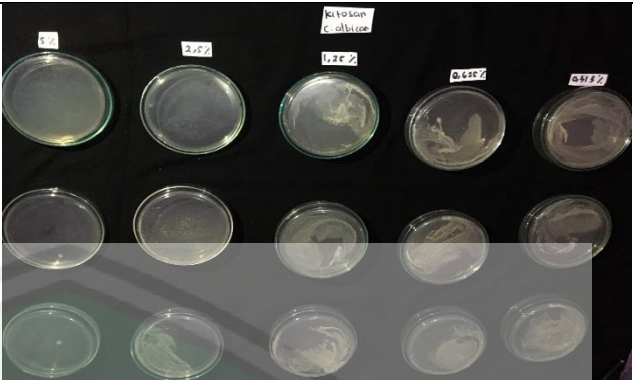
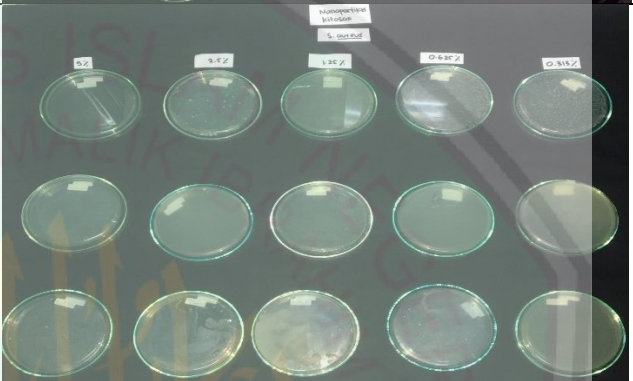
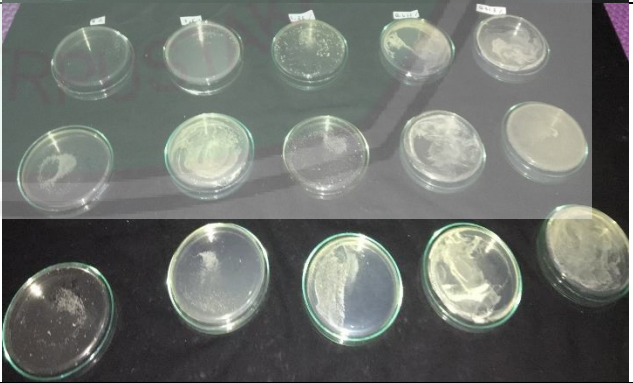
6.3 Hasil Uji Kualitatif KHM

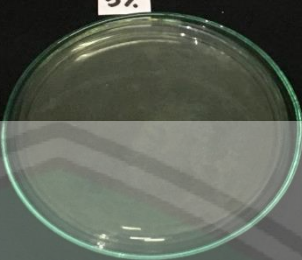
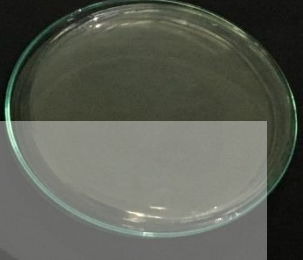
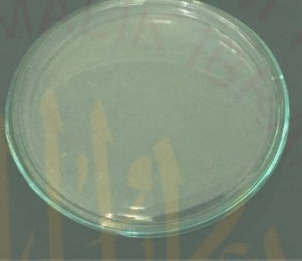
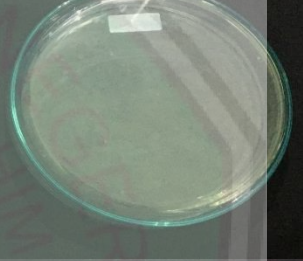
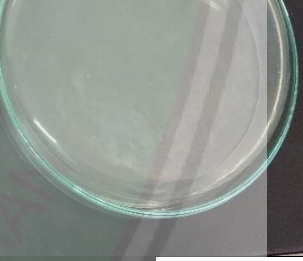
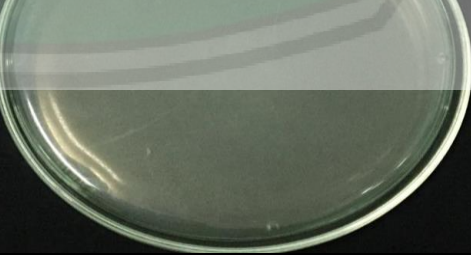
No	Sebelum Inkubasi	Sesudah Inkubasi
1		
2		
3		

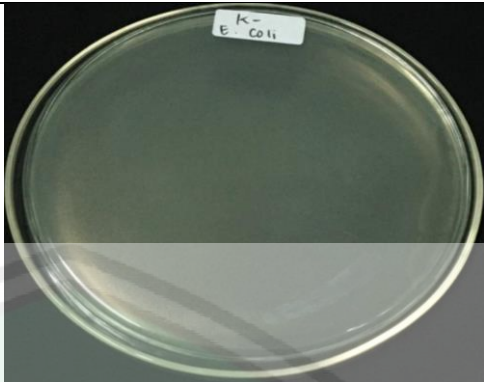
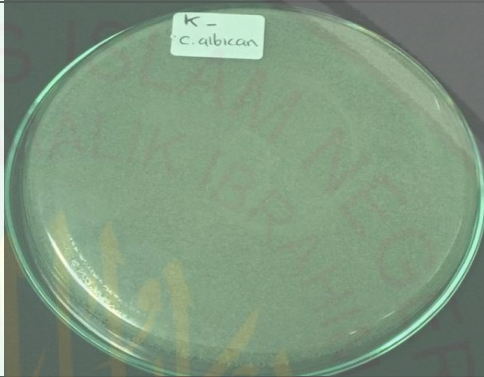
6.4 Hasil Uji KBM (Total Plate Count)

Sampel Uji	Mikroba Uji	Gambar
Ekstrak Jeringau	<i>S. aureus</i>	
	<i>E. coli</i>	
	<i>C. albicans</i>	
Nanopartikel Jeringau	<i>S. aureus</i>	

	<i>E. coli</i>	
	<i>C. albicans</i>	
	<i>S. aureus</i>	
Kitosan	<i>E. coli</i>	

	<i>C. albicans</i>	
Nanopartikel Kitosan	<i>S. aureus</i>	
	<i>E. coli</i>	
	<i>C. albicans</i>	

K+ (Klindamisin/ Nystatin)	<i>S. aureus</i>	 
	<i>E. coli</i>	 
	<i>C. albicans</i>	 
K- (DMSO)	<i>S. aureus</i>	

	<i>E. coli</i>		
	<i>C. albicans</i>		

Lampiran 7. Lembar Bukti Konsultasi Skripsi



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933; Fax. (0341) 558933

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Isneini Sholika Rohma
NIM : 16620077
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Genap TA 2019/2020
Pembimbing : Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si
Judul Skripsi : Aktivitas Antimikroba Nanopartikel Jeringau (*Acorus calamus* L.) Tersalut Kitosan Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	18/12/2019	Judul dan Rumusan Masalah	
2.	19/12/2019	Revisi Rumusan Masalah	
3.	20/12/2019	Latar Belakang dan Batasan Masalah	
4.	21/12/2019	Revisi Latar Belakang	
5.	22/12/2019	BAB III	
6.	6/1/2020	Revisi Latar Belakang	
7.	8/1/2020	BAB II	
8.	3/2/2020	Acc Proposal	
9.	15/6/2020	Revisi Proposal	
10.	16/9/2020	Revisi BAB I	
11.	21/9/2020	Revisi Latar Belakang	
12.	23/9/2020	Data Hasil	
13.	3/10/2020	Pembahasan	
14.	5/10/2020	Acc Skripsi	

Pembimbing Skripsi,

Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul M., M.Si
NIP. 197109192000032001

Malang, 5 Oktober 2020
Ketua Program Studi,



Dr. Evika Sandi Sayitri, M.P
NIP. 197410182003122002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Isneini Sholika Rohma
NIM : 16620077
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Genap TA 2019/2020
Pembimbing : Mujahidin Ahmad, M. Sc
Judul Skripsi : Aktivitas Antimikroba Nanopartikel Jeringau (*Acorus calamus* L.) Tersalut Kitosan Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans*

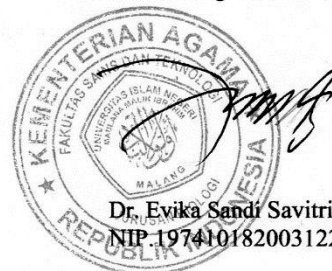
[illegible]

Pembimbing Skripsi,

Malang, 5 Oktober 2020
Ketua Program Studi,



Mujahidin Ahmad, M. Sc
NIP. 198605122019031002



Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP.197410182003122002