

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Menggunakan pendekatan eksperimental untuk membandingkan hasil antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Uji aktivitas antibakteri dilaksanakan dari bulan Juni-Juli 2024 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bahan Alam, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Sampel Penelitian

1. Sampel tanaman

Menggunakan sampel kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) berusia ± 2 tahun, diambil secara *random* dari Shafaluna Atsiri yang berlokasi di Kebosungu I, Dlingo, Kecamatan Dlingo, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta dengan titik koordinat -7.9620117, 110.4722439.

2. Sampel bakteri

Pada pengujian digunakan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi di Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Konsentrasi infusa kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) 25%, 50%, 75% dan 100%.

2. Variabel Terikat

Diameter zona hambat dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3. Variabel Terkendali

Suhu pengeringan kayu secang, suhu ekstraksi kayu secang, usia tanaman kayu secang, waktu dan suhu inkubasi media uji.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Infusa kayu secang adalah hasil rebusan yang didapatkan dengan cara mendidihkan serbuk kayu secang dalam pelarut akuades selama 15 menit pada suhu 90°C diatas penangas air.
2. Zona hambat adalah area bening di yang terbentuk di sekitar sumuran yang tidak ditumbuhi bakteri. Diameter zona hambat diukur secara vertikal, diagonal dan horizontal dengan jangka sorong satuan milimeter (mm).
3. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi paling kecil dari infusa kayu secang yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Pada penelitian menggunakan alat yaitu autoklaf (GEA LS-B50L), ayakan mesh 40, batang L, BSC (*Biological Safety Cabinet*) (*Daihan Labtech*), beaker glass 100 mL & 500 mL (*Iwaki*), blue tip, cawan petri (10x15 Anumbra), corong kaca (*HERMA* 90 mm) gelas ukur (*Iwaki*), *hotplate* (IKA HS-7), inkubator (Mammert IN30), jangka sorong satuan mm, jarum ose, kompor listrik (Maspion), labu erlenmeyer 500 mL (*Iwaki*), lemari pendingin, *magnetic stirrer*, mikropipet 20-200 mL (Eppendorf), mikropipet 100-1000 mL (Eppendorf), oven (Mammert UN160), panci infusa, pembakar bunsen, pipet tetes,

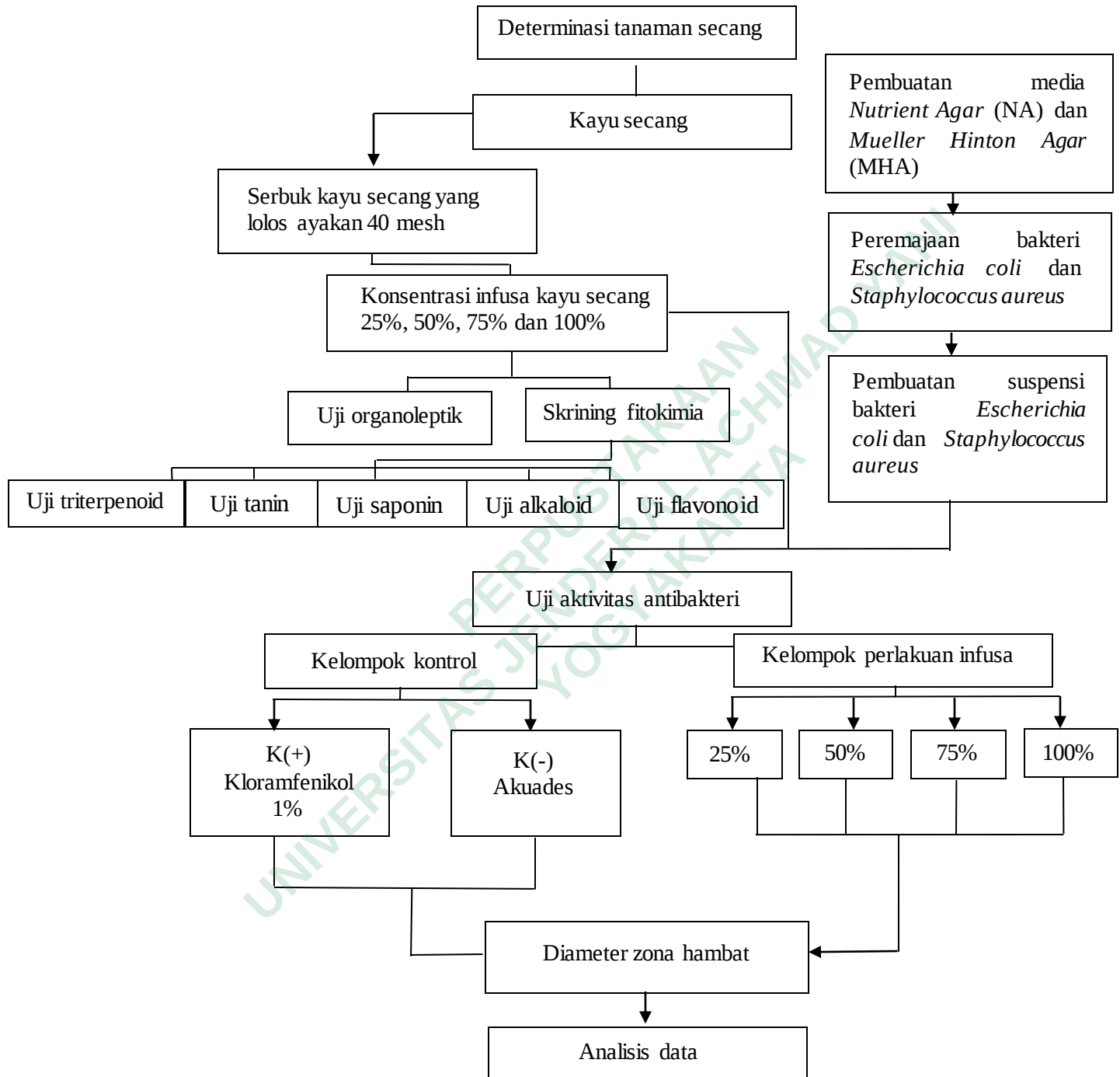
pisau, rak tabung, spatula kayu, Spektrofotometer (*Genesys 10S UV-VIS*), tabung reaksi (Iwaki), timbangan analitik (Ohaus) serta *yellow tip*.

2. Bahan

Pada penelitian menggunakan bahan seperti akuades, aluminium foil, asam klorida 2N, larutan BaCl_2 1%, bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, etanol 70%, FeCl_3 , H_2SO_4 , kertas payung, kapas, kloramfenikol, larutan NaCl 0,9% fisiologis, magnesium, media Mueller Hinton Agar (OXOID), media Nutrient Agar (Darmstadt), plastik *wrapping*, serta reagen Dragendroff, Mayer, Wagner dan serbuk kayu secang

PERPUSTAKAAN
JENDERAL ACHMAD YAN
YOGYAKARTA

G. Pelaksanaan Penelitian



Ket: K= Kontrol negatif

Gambar 5. Pelaksanaan penelitian

1. Determinasi Tanaman

Untuk memastikan keakuratan pengambilan sampel dan memverifikasi keaslian tanaman *Caesalpinia sappan* L., dilakukan identifikasi tanaman. Pemeriksaan tanaman ini dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, dengan menganalisis secara keseluruhan bagian dari tanaman secang.

2. Pembuatan Simplisia

Kayu secang yang sudah dikumpulkan secara *random* sebanyak 1 Kg dibersihkan dengan air mengalir dan dikeringkan dibawah sinar matahari. Kayu secang selanjutnya diserut dengan menggunakan pisau untuk mempermudah proses pengeringan. Guna mengurangi kadar air, simplisia dikeringkan dengan menggunakan oven pada temperatur 50°C selama 1 x 24 jam (Utami *et al.*, 2022). Simplisia kering dapat dilihat dari persentase kadar air <10% (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Simplisia dihaluskan dengan *blender* hingga menjadi serbuk kasar kayu secang, lalu diuji kadar airnya dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh. Prosedur ini dilakukan guna mengurangi ukuran partikel serbuk dan meningkatkan luas permukaannya (Hanawara *et al.*, 2020).

3. Uji Kadar Air Simplisia

Dilakukan pengujian kadar air simplisia kayu secang dengan *moisture balance*. Terlebih dahulu, alat yang akan digunakan diukur suhu dan keakuratannya sesuai dengan jumlah simplisia yang diujikan. Sebanyak 2 gram serbuk kayu secang dimasukan ke dalam alat yang telah diatur pada suhu 100°C. Dilihat hasil uji dalam bentuk persen pada layar alat *moisture balance*, ditandai dengan indikator lampu hijau yang menyala (Dhina *et al.*, 2019). Syarat kadar air simplisia adalah <10% (Kementrian Kesehatan RI, 2017).

4. Pembuatan Infusa

Dibuat larutan infusa konsentrasi 100% dengan menimbang sejumlah 100 g serbuk kayu secang kemudian direbus dengan 100 mL akuades dengan panci infusa diatas penangas air hingga mencapai suhu 90°C. Setelah mencapai suhu

yang ditentukan, *timer* diaktifkan selama 15 menit dengan sesekali dilakukan pengadukan. Setelah proses perebusan selesai, larutan didinginkan lalu disaring dengan menggunakan kertas saring ke dalam gelas ukur dan didapatkan konsentrasi infusa 100%. Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi infusa kayu secang 25%, 50% dan 75% dengan persamaan $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$. Rincian perhitungan dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

5. Uji Organoleptik

Uji organoleptik infusa kayu secang dilakukan dengan metode observasi langsung untuk mengevaluasi aspek rasa, warna, aroma, dan tekstur infusa tersebut (Naherastuti *et al.*, 2022).

6. Uji Skrining Fitokimia

a. Identifikasi Alkaloid

1 mL infusa kayu secang dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi berbeda. Pada tabung pertama, pereaksi Mayer ditambahkan sebanyak 2 tetes; jika terbentuk endapan putih, hal tersebut menandakan adanya alkaloid. Pada tabung kedua, penambahan pereaksi Dragendroff 2 tetes akan menunjukkan keberadaan alkaloid jika muncul endapan merah jingga. Tabung ketiga dengan penambahan 2 tetes pereaksi Wagner, jika timbul endapan berwarna merah coklat kehitaman mengindikasikan adanya kandungan alkaloid (A'ayun *et al.*, 2015). Hasil dinyatakan positif alkaloid apabila terdapat dua atau tiga endapan yang dimaksud (Novriyanti *et al.*, 2022)

b. Identifikasi Flavonoid

Pada tabung reaksi dengan 10 mL akuades, sebanyak 1 mL infusa kayu secang ditambahkan sembari dipanaskan diatas *waterbath* seiring dengan ditamhkannya HCl 1 mL dan 100 mg serbuk magnesium. Munculnya warna kuning atau jingga pada larutan mengindikasikan positif flavonoid (Noer *et al.*, 2018).

c. Identifikasi Saponin

Sejumlah 1 mL infusa kayu secang dimasukkan pada tabung reaksi diikuti dengan penambahan 2 mL akuades dan di didihkan diatas penangas air, kemudian di kocok dan diamati terjadinya pembentukan busa. Ditambahkan 1 tetes larutan HCl 2N dan diamati, busa stabil yang terbentuk tidak kurang dari 1-10cm menunjukkan positif adanya saponin (Yuniarti & Khairina, 2022).

d. Identifikasi Tanin

Dengan banyak 1 mL infusa kayu secang ditambahkan dengan 3 tetes larutan FeCl_3 pada tabung reaksi. Warna hijau atau biru tua yang timbul pada larutan mengindikasikan bahwa sampel mengandung tanin (Aprilyanie *et al.*, 2023).

e. Identifikasi Triterpenoid/Steroid

Tempatkan 1 mL infusa kayu secang pada drop plate, dilanjutkan dengan penambahan asam asetat anhidrat 3 tetes dan H_2SO_4 pekat 1 tetes. Terbentuknya endapan merah jingga mengindikasikan bahwa sampel mengandung triterpenoid, sedangkan terbentuknya endapan hijau, menandakan bahwa sampel mengandung steroid (Sangi *et al.*, 2008).

7. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan meliputi beaker, cawan petri dan tabung reaksi, pertama-tama dibersihkan dengan air mengalir dan kemudian dilakukan penyemprotan alkohol 70% guna memastikan alat bebas dari mikroba. Wadah berlubang kemudian ditutup rapat dengan kapas berbalut kasa sebelum dilapisi menggunakan kertas payung. Proses sterilisasi dilanjutkan dengan oven pada suhu 170°C dengan selang waktu 1 jam. Untuk peralatan yang tidak tahan panas seperti *blue tip* dan *yellow tip*, sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada temperatur 121°C tekanan 1 atm dengan selang waktu 15 menit (Syah, 2016). Sementara itu, ose disterilkan diatas api bunsen hingga ujung ose memijar, yang menandakan bahwa peralatan telah terpapar panas (Isnindar *et al.*, 2023).

b. Pembuatan Media

1) Pembuatan *Nutrient Agar* (NA) untuk Peremajaan Bakteri

Campurkan 1 gram NA ke dalam 50 mL akuades dalam labu Erlenmeyer. Gunakan hot plate dan *magnetic stirrer* untuk mengaduk hingga larut secara merata. Setelah larutan tercampur dengan baik, tutup labu dengan kapas dan aluminium foil, lalu sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sesudah proses sterilisasi, dituang secara aseptis media ke dalam tabung reaksi media ditunggu hingga memadat dengan kemiringan 45° (Kanter & Untu, 2019). Media yang belum digunakan disimpan di dalam kulkas pada suhu dingin (Napitupulu *et al.*, 2019).

2) Pembuatan *Mueller Hinton Agar* (MHA) untuk Uji Aktivitas Antibakteri

Larutkan 10,26 gram media MHA dalam 270 mL akuades menggunakan labu Erlenmeyer. Panaskan campuran di atas hot plate dengan bantuan *magnetic stirrer* hingga larutan homogen. Setelah terlarut sempurna, tutup labu dengan kapas yang dilapisi kasa, lalu lakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sesudah proses sterilisasi, tuang media pada cawan petri steril dengan ketebalan 3-4 mm (Noor *et al.*, 2020).

c. Pembuatan Suspensi Bakteri

Satu ose isolat bakteri yang telah diremajakan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisik 10 mL larutan NaCl 0,9% dalam tabung reaksi. Selanjutnya, campuran ini dihomogenkan dan di cek dengan alat Turbidimeter hingga nilai pada alat menunjukkan hasil kekeruhan yang sebanding dengan *Mc-Farland* 0,5 (Amiliah *et al.*, 2021). Jika belum sesuai ditambahkan bakteri uji atau pelarut sesuai kebutuhan hingga dicapai kekeruhan yang sesuai.

d. Pembuatan Larutan Pembanding Kontrol Positif

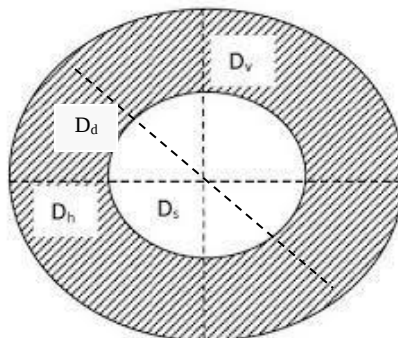
Untuk membuat larutan kloramfenikol 1%, timbang 100 mg serbuk dari kapsul kloramfenikol 250 mg dilarutkan dengan 10 mL akuades hingga larut, dan didapatkan larutan stok dengan konsentrasi kloramfenikol 1% (Afifi & Sugiarti, 2016).

e. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Sumuran

Bakteri uji diinokulasikan pada media padat *Mueller Hinton Agar* sebanyak 0,1 mL dengan menggunakan mikropipet 20-200 μ L. Suspensi kemudian diratakan dengan batang L secara menyeluruh pada permukaan media dan dibiarkan hingga mengering selama ± 5 menit (Ayen *et al.*, 2017). Lakukan pembuatan lubang sumuran pada media dengan *cork bore* berukuran 6 mm. Dibuat sebanyak 4 lubang sumuran pada tiap media uji, kemudian masukkan masing-masing 50 μ L konsentrasi uji (25%, 50%, 75% dan 100%) pada lubang sumuran. Larutan kloramfenikol 1% sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif masing-masing ditambahkan ke cawan petri kontrol sebanyak 50 μ L dengan menggunakan mikropipet. Setiap perlakuan dilakukan dalam tiga ulangan. Setelah itu, cawan uji serta cawan kontrol diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dilakukan pengamatan pada hasil inkubasi untuk mendeteksi zona hambat di sekitar sumuran. Diameter zona hambat diukur dalam arah vertikal, diagonal, dan horizontal menggunakan jangka sorong (Daud *et al.*, 2023).

H. Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh mencakup rata-rata ukuran diameter zona hambat yang diukur secara vertikal, diagonal, dan horizontal menggunakan jangka sorong, serta dihitung berdasarkan rumus yang tertera dalam **Persamaan 1**. Hasil diameter kemudian di kelompokkan berdasarkan kriteria kekuatan daya antibakteri yang mengacu pada Yusran & Muhasbir (2018), disajikan pada **Tabel 2**.



Gambar 6. Diagram Pengukuran Zona Hambat

$$\text{Rata-rata diameter zona hambat} = \left(\frac{D_h + D_v + D_d}{3} \right) \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan :

D_v : Diameter vertikal (mm)

D_h : Diameter horizontal (mm)

D_d : Diameter diagonal (mm)

D_s : Diameter sumuran (6 mm) (Ningrum & Wuryandari, 2018)

Tabel 2. Kriteria Kekuatan Daya Antibakteri (Yusran & M, 2018)

Diameter Zona Hambat	Respon Hambat Media
≤10	Lemah
10-15	Sedang
16-20	Kuat
>20	Sangat kuat

Zona hambat yang diukur dianalisis dengan perangkat lunak SPSS untuk membandingkan perbedaan antar kelompok perlakuan. Uji normalitas dilakukan sebagai langkah pertama dalam analisis ini menggunakan metode *Shapiro-Wilk*. Jika nilai Sig>0,05, data dianggap terdistribusi normal; sebaliknya, jika nilai Sig<0,05, data dianggap tidak terdistribusi normal (Ariyanti *et al.*, 2019). Homogenitas data dilihat dengan menggunakan uji *Levene*. Nilai signifikansi >0,05 menunjukkan bahwa data homogen (Pradani, 2012). Apabila data menunjukkan distribusi normal dan homogen, maka analisis dilakukan dengan metode *One Way ANOVA*, yang sering disebut sebagai analisis varians satu faktor. Jika hasil uji <0,05 menandakan adanya perbedaan pada kelompok perlakuan. Analisis *post-hoc* dengan uji *LSD (Least Significant Difference)* digunakan guna

menentukan kelompok perlakuan yang menunjukkan perbedaan. Jika data tidak memenuhi kriteria distribusi normal dan homogenitas, maka analisis selanjutnya beralih ke uji *Kruskal-Wallis* yang bersifat non-parametrik (Pradani, 2012).

PERPUSTAKAAN
JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA
UNIVERSITAS