

### **BAB III METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, dengan tujuan mengetahui pengaruh durasi rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Kayu secang dengan konsentrasi 50% direbus pada suhu 10, 20, 30, dan 40 menit, hasil rebusan yang diperoleh kemudian diuji antibakterinya menggunakan metode difusi cakram.

#### **B. Lokasi dan Waktu**

Pengujian antibakteri dan identifikasi tanaman secang (*Caesalpinia sappan* L.) dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Waktu pelaksanaan bulan Mei - Juni 2025.

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### 1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) yang di peroleh dari Shafaluna Atsiri yang berlokasi di Kebonsungu 1, Dlingo Kecamatan Dlingo, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. (Koordinat: 7.9620117, 110.4722439).

##### 2. Sampel

Sampel yang dipakai pada penelitian ini adalah bagian kulit kayunya kemudian dibuat dengan cara merebus dengan air panas hingga suhu 90<sup>0</sup>C. Sampel bakteri diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi Yogyakarta.

#### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas pada penelitian ini adalah durasi rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.).
2. Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah suhu pengeringan kayu secang, waktu inkubasi, karakteristik kayu secang, suhu rebusan kayu secang.

### **E. Definisi Operasional**

1. Rebusan kayu secang adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia menggunakan pelarut air dengan cara merebus kayu secang menggunakan panci infusa pada durasi 10, 20, 30, dan 40 menit dengan suhu 90<sup>0</sup>C.
2. Zona hambat adalah area bening yang ditemukan disekitar kertas cakram. Diameter zona hambat diukur secara vertikal, horizontal, dan diagonal.
3. Waktu inkubasi media uji adalah waktu yang dibutuhkan bakteri tumbuh pada media, dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam.

### **F. Alat dan Bahan**

1. Alat
  - a. Alat yang dipakai pada proses perebusan kayu secang (*Caesalpania sappan* L.) seperti, timbangan analitik (*ohaus*), *beaker glass* (*iwaki*), batang pengaduk, botol sampel dan tutup, corong, kertas saring, kompor (*Maspion*), *thermometer*, *stopwatch*, dan panci infusa.
  - b. Alat uji organoleptik serta uji fitokimia seperti tabung reaksi, rak tabung, timbangan analitik, *beaker glass*, labu ukur, kertas saring, *hot plate* (IKA HS- 7), pipet tetes, corong, pipet ukur, propipet.
  - c. Alat yang digunakan dalam pengujian antibakteri adalah, autoklaf (*Gea*), BSC (*Daihan Labtech*), *beaker glass*, cawan petri, *hot plate*, inkubator (*Memmert IN30*), jarum ose, jangka sorong, lemari pendingin, labu erlenmeyer (*iwaki*), *magnetic stirrer*, oven (*Memmert UN160*), pembakar bunsen, pinset, tabung reaksi, batang pengaduk, *vortex*, spidol, dan turbidimeter.

2. Bahan
  - a. Bahan yang dipakai ketika determinasi tanaman yaitu kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.).
  - b. Bahan yang dipakai pada pembuatan rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan akuades.
  - c. Bahan yang dipakai pada uji aktivitas antibakteri adalah, rebusan kayu secang dengan konsentrasi 50% (durasi rebusan 10, 20, 30 dan 40 menit), alkohol, akuades, biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kloramfenikol 30 µg/disk, kasa, *catton swab*, media NA (Darmstadt), MHA, NaCl 0,9%.
  - d. Bahan yang digunakan untuk uji fitokimia yaitu rebusan kayu secang, HCL pekat, Dragendorff, Mayer, Wagner, Akuades, Serbuk Mg, dan FeCl<sub>3</sub>.

### G. Pelaksanaan Penelitian

#### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi kayu secang dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Dilakukan dengan cara mengirimkan gambar tanaman kayu secang. Determinasi ini dibuat agar memastikan keaslian simplisia kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) yang digunakan pada penelitian.

#### 2. Persiapan Sampel Tanaman

Sampel yang dipakai pada penelitian ini adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) basah sebanyak 1 kg yang dipanen pada usia tanaman 3-4 tahun. Kayu secang yang sudah dipanen selanjutnya diserut dan dilakukan sortasi basah untuk memisahkan serutan kayu secang dari pengotor dan getah yang menempel. Kemudian serutan kayu secang disusun diatas alas oven untuk selanjutnya dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 60<sup>0</sup>C selama 1 jam atau proses pengeringan kayu secang dapat dihentikan apabila simplisia mudah dipatahkan menggunakan tangan (Aras *et al.*, 2023).

### 3. Pembuatan Rebusan dan Seri Konsentrasi

Seri konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini, merujuk pada studi yang telah dilakukan Dewi *et al.*, (2024) dengan modifikasi sampel tanaman dan bakteri uji yang digunakan. Konsentrasi yang diujikan adalah 50%. Pembuatan rebusan kayu secang dilakukan dengan cara menimbang serutan kayu secang kering sebanyak 50 gram, kemudian dimasukkan kedalam panci rebusan dan ditambahkan akuades sebanyak 100 mL sampai semua bahan terendam. Waktu mulai dihitung pada saat air yang berada pada panci rebusan mencapai suhu 90°C. Setelah 10 menit, proses pemanasan dihentikan. Dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring *Whatman* No.1 dan corong untuk memisahkan air dengan ampas kayu secang. Diukur volume air yang telah disaring tersebut, dengan demikian diperoleh konsentrasi air 50% dengan lama waktu perebusan 10 menit. Dilakukan pengulangan yang sama durasi perebusan 20 menit, 30 menit serta 40 menit.

### 4. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan untuk mengamati warna, bentuk dan aroma rebusan kayu secang (Dahlia *et al.*, 2012).

### 5. Skrining Fitokimia

#### a. Uji flavonoid

Rebusan kayu secang sebanyak 1 mL pada setiap durasi ditambahkan serbuk magnesium secukupnya digojok hingga tercampur, kemudian ditambahkan 1 tetes HCl pekat digojog hingga homogen, diamati jika berubah warna menjadi jingga menunjukkan positif mengandung flavonoid yang termasuk kedalam golongan flavon atau flavonol (Akasia *et al.*,2021).

#### b. Uji saponin

Rebusan kayu secang sebanyak 1 mL masing-masing durasi dimasukkan kedalam tabung reaksi serta ditambahkan akuades, dikocok hingga menghasilkan busa stabil. Hasil positif mengandung saponin bila menghasilkan busa stabil dalam waktu yang lama (Sari *et al.*,2020).

c. Uji tanin

Rebusan kayu secang sebanyak 1 mL dari masing-masing durasi dan  $\text{FeCl}_3$  sebanyak 3 tetes dimasukkan kedalam tabung reaksi. Hasil positif mengandung tannin jika terjadi perubahan menjadi warna biru kehitaman (Akasia, 2021).

d. Uji alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menggunakan 3 pereaksi yang berbeda, sebanyak 2 mL rebusan kayu secang dari masing-masing durasi dan HCl pekat 3 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi masing-masing ditambahkan 3 tetes reagen pereaksi. Positif alkaloid jika ditetesi reagen Wagner muncul endapan merah kecoklatan, Dragendorff muncul endapan jingga, Mayer muncul endapan putih kekuningan (Dahlia *et al.*, 2012).

6. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi alat

Sebelum dipakai alat gelas seperti cawan petri, *beaker glass*, dan erlenmeyer dicuci bersih di bawah air mengalir dan dibiarkan kering, setelah itu, alat diusap dengan alkohol 70% dan dibiarkan kering. Selanjutnya alat dibungkus dengan kertas payung dan disterilkan di oven suhu  $171^\circ\text{C}$  selama 1 jam (Kurahman *et al.*, 2022).

b. Sterilisasi bahan

Bahan yang perlu disterilkan meliputi media NA dan media MHA. Sterilisasi dilakukan dengan metode uap bertekanan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit (Handayani dan Muhtadi, 2013).

c. Pembuatan media NA (*Nutrient Agar*) untuk peremajaan bakteri

Sebanyak 1,4 gram NA (*Merck*) diletakkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dicampur dengan 70 mL akuades. Larutan ini dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Setelah itu, media disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, media dituangkan kedalam *conical tube* dibiarkan di suhu ruang hingga memadat pada posisi

miring. Kultur isolat bakteri yang akan diuji diinokulasikan ke media, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Faried & Mas, 2024).

d. Pembuatan media MHA (*Mueller Hinton agar*)

Sebanyak 9,5 gram *Mueller-Hinton Agar* ditimbang dan dilarutkan pada erlenmeyer yang berisi 250 mL akuades. Larutan dipanaskan pada *hot plate* sampai mendidih sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga larut dan homogen. Mulut erlenmeyer ditutup bersama kapas serta aluminium foil. Media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C. selama 15 menit. Sesudah selesai, media dimasukkan pada cawan petri steril di dalam BSC, selanjutnya didiamkan hingga dingin dan mengeras (Faried & Mas, 2024).

e. Pembuatan suspensi bakteri

Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang telah dibiakan disuspensikan pada larutan NaCl 0,9% didalam tabung reaksi steril kemudian di vortex sampai homogen. Suspensi bakteri selanjutnya diukur nilai kekeruhannya menggunakan alat turbidimeter hingga diperoleh tingkat kekeruhan setara dengan *McFarland* 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL). Jika larutan terlalu keruh maka perlu diencerkan menggunakan NaCl 0,9 % (Anita *et al.*, 2020).

f. Pengujian aktivitas antibakteri rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.)

Diinokulasikan bakteri uji sebanyak 0,1 mL diatas media MHA sambil diratakan menggunakan *Catton swab*. Kertas cakram kosong dicelupkan kedalam sampel uji dengan konsentrasi 50% (durasi rebusan 10, 20, 30 dan 40 menit) sebanyak 5 mL selama 5 menit. Kontrol negatif menggunakan kertas cakram kosong dan kontrol positif menggunakan kertas cakram kloramfenikol. Kertas cakram tersebut kemudian diletakkan di atas media MHA. Diinkubasi didalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam media MHA diposisikan terbalik untuk mencegah terjadinya kontaminasi selain dari bakteri uji yang disebabkan oleh uap yang jatuh dari tutup cawan petri (Chandra, 2023). Setelah diinkubasi diamati dan diukur zona hambat yang

terbentuk secara vertikal, horizontal dan diagonal menggunakan jangka sorong (Pormes *et al.*, 2016). Persamaan perhitungan zona hambat dapat dilihat pada **Persamaan (1)**. Gambar pengukuran diameter zona hambat dapat dilihat pada **Gambar 5**. Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan dapat dilihat pada **Tabel 2**.

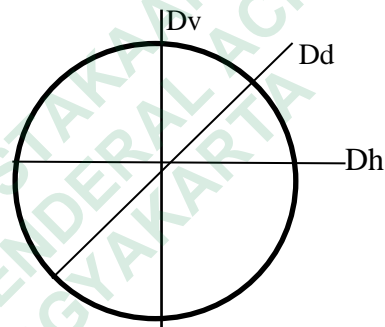
$$\text{zona hambat} = \frac{Dv + Dh + Dd}{3} \quad (\text{mm}) \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan:

Dh : Diameter horizontal

Dv : Diameter vertikal

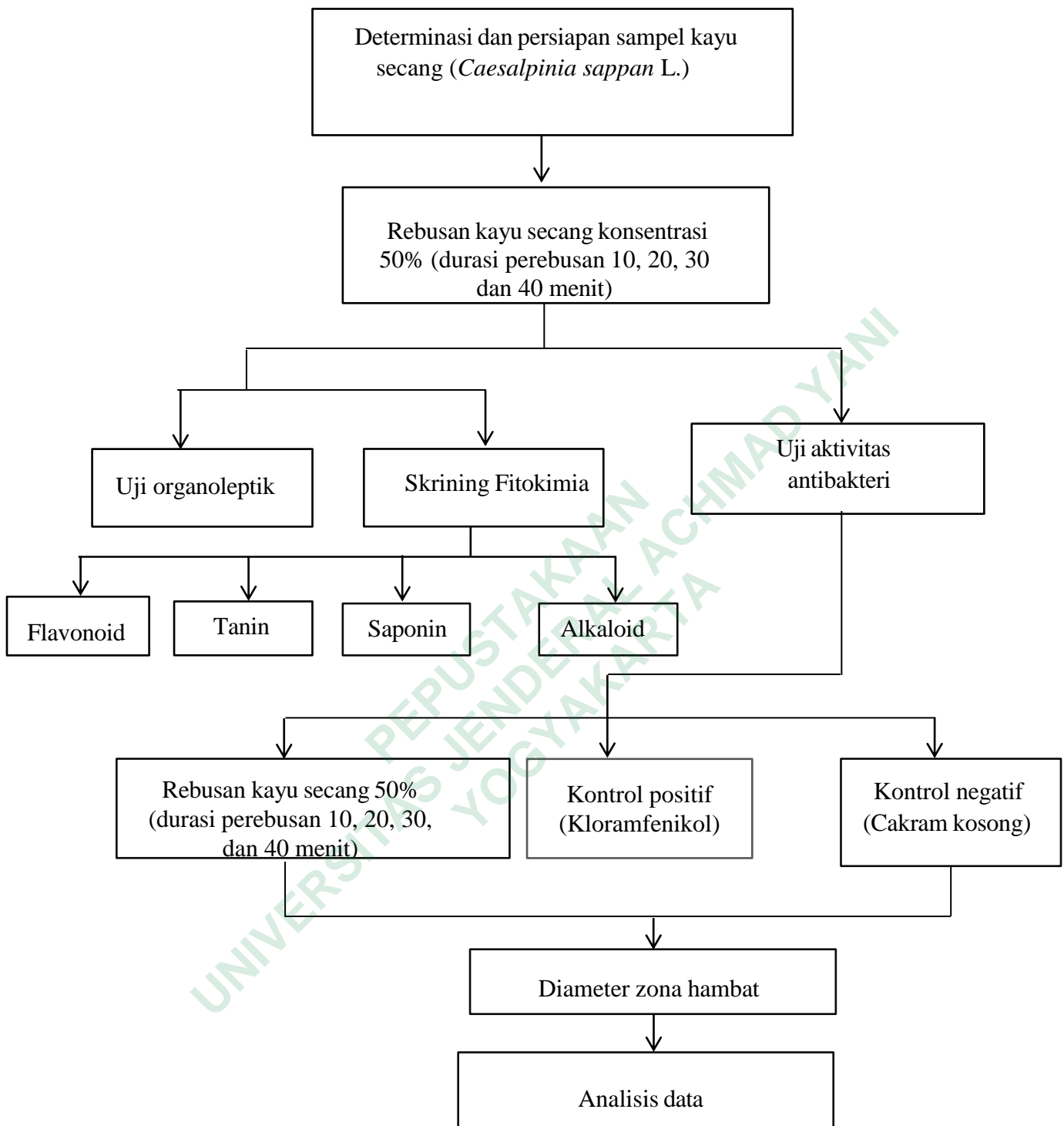
Dd : Diameter diagonal



**Gambar 5.** Pengukuran Zona Hambat

**Tabel 1.** Kategori Respon Hambatan Pertumbuhan Berdasarkan Diameter Zona Hambat Winastri *et al.*, (2020)

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤5	Lemah
5-10	Sedang
10-20	Kuat
≥21	Sangat Kuat



**Gambar 6.** Pelaksanaan penelitian

## H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Data yang dihasilkan dari penelitian ini adalah diameter zona hambat dari berbagai durasi waktu rebusan. Data tersebut dianalisis secara statistik pada aplikasi SPSS versi 26. Pada tahap awal data diuji menggunakan uji *Sphiro-Wilk* (normalitas) nilai signifikansi pada durasi 20 menit yaitu 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang artinya data tersebut tidak normal dibandingkan durasi perebusan 10, 30 dan 40 menit, uji selanjutnya yang dilakukan yaitu *Leavene's* (Homogenitas) didapat nilai signifikansi 0,012 ( $p < 0,05$ ). Uji *Kruskall wallis* dilakukan karena pada penelitian ini data yang didapat tidak memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas, didapatkan nilai 0,017 ( $p < 0,05$ ). Kemudian dilakukan uji non-parametik *Mann-Whitney* untuk membandingkan dua kelompok uji (Effendi & Juita, 2024)