

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan tujuan untuk melihat aktivitas antibakteri infusa daun secang (*Caesalpinia sappan* L.) pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode sumuran.

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Farmasi, Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan Mei – Juli 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini yaitu tanaman secang (*Caesalpinia sappan* L.) yang diambil dari Shafaluna Atsiri yang berlokasi di Kebosungu I, Kepanewon Dlingo, Daerah Istimewa Yogyakarta dengan titik kordinat -7.9620117, 110.4722439.

2. Sampel

Sampel dari penelitian ini yaitu daun secang sebanyak 2 kg dalam kondisi yang masih segar dan tidak rusak, serta bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas: Variasi konsentrasi infusa daun secang (*Caesalpinia sappan* L.)
2. Variabel Terikat: Diameter zona hambat pada bakteri uji.
3. Variabel Terkendali: Waktu inkubasi media uji, suhu pengeringan daun secang, karakteristik daun secang (segar dan tidak rusak).

E. Definisi Operasional Variabel

1. Infusa daun secang adalah larutan yang dibuat dengan mendidihkan daun secang dalam air selama 15 menit pada suhu 90°C untuk mengekstrak senyawa-senyawa aktif yang terkandung didalamnya. Konsentrasi infusa daun secang pada penelitian ini yaitu 20%, 40%, 60% dan 80%.
2. Diameter zona hambat bakteri adalah area disekitar sumuran yang tidak ditumbuhi bakteri dan diukur secara vertikal, diagonal dan horizontal dengan jangka sorong.
3. Konsentrasi Hambat Minimum adalah konsentrasi minimum zat antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan organisme setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam didalam inkubator.

F. Alat dan Bahan

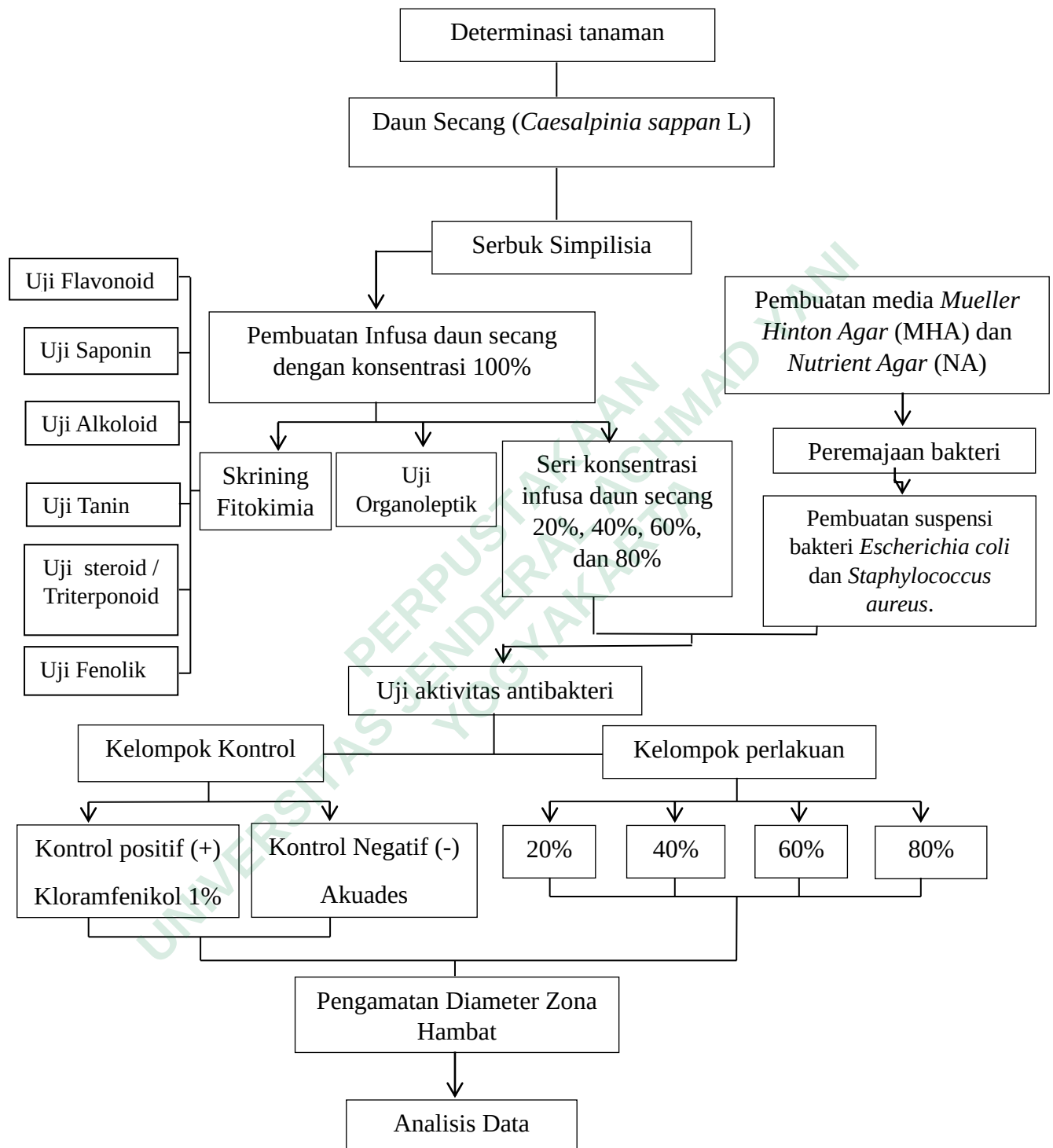
1. Alat-alat :

Autoklaf (B-One), ayakan mesh 40, batang L, beaker glass, *blue tip*, grinder, BSC (Daihan Labtech), cawan petri, *cork borer*, labu ukur, corong, *drop plate*, inkubator, erlenmeyer, lampu bunsen, mikropipet 20-200 µL, mikropipet 100-1000 µL, ose, oven, panci infusa, jangka sorong, penangas air, pipet tetes, rak tabung, spatula kayu, turbidimeter, *stopwatch*, tabung reaksi, timbangan, kertas saring, wadah penyimpanan simplisia dan *yellow tip*.

2. Bahan :

Akuades, alkohol, amoniak, bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, daun secang (*Caesalpinia sappan* L.), reagen Dragendorf, H₂SO₄ 1%, kloroform, larutan asetat anhidrat, larutan FeCl₃, reagen Mayer, media *Mueller Hinton Agar*, media *Nutrient Agar*, NaCl 0,9%, serbuk magnesium dan reagen Wagner.

G. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 1. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Teknologi dan Sains Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi ini bertujuan untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan benar daun secang dengan jenis *Caesalpinia sappan* L.

2. Pembuatan Simplisia

Daun secang dengan jenis *Caesalpinia sappan* L. dikumpulkan sebanyak 2 kg, dilakukan pencucian dan sortasi basah agar tidak ada kotoran-kotoran atau batang pada daun yang tidak perlu (Suharti dkk., 2018). Daun dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C. Daun secang yang sudah kering ditandai dengan tekstur yang kering dan rapuh, serta warna merah kecoklatan hingga merah tua yang intens (Utami dkk., 2022). Daun secang kemudian diserbuk menggunakan grinder untuk memperkecil ukuran daun dan diayak menggunakan mesh 40 untuk menyeragamkan ukuran partikel (Hanawara, 2020).

3. Pembuatan Infusa

Ditimbang simplisia daun secang sebanyak 100 gram. Simplisia daun secang dimasukkan ke panci yang telah diisi akuades sebanyak 100 mL, apabila suhu air mencapai 90°C maka waktu mulai dihitung selama 15 menit. Hasil rebusan ditunggu hingga dingin kemudian disaring menggunakan kertas saring, ampas simplisia daun secang dibuang. Proses ini dilakukan sebanyak tiga kali untuk mendapatkan tiga replikasi sediaan infusa 100% b/v sebagai konsentrasi induk yang kemudian diencerkan menjadi 4 konsentrasi perlakuan uji yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%. Setiap konsentrasi dibuat dengan 3 kali replikasi (Muflihunna dkk., 2016).

4. Uji Organoleptik

Pengujian Organoleptik dilakukan untuk infusa daun secang melalui pengamatan warna tekstur, rasa, dan bau.

5. Skirining Fitokimia

Uji skrining fitokimia pada infusa daun secang (*Caesalpinia sappan* L.) pada setiap konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% sebagai berikut:

a. Uji Flavonoid

Sampel infusa daun secang sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi. Sampel dididihkan dengan 10 mL akuades menggunakan penangas air, kemudian ditambah HCl pekat 1 mL dan ditambahkan 100 mg serbuk magnesium (Mg). Apabila terbentuk larutan berwarna merah atau kuning atau jingga maka dinyatakan hasil positif mengandung flavonoid (Noer dkk., 2018).

b. Uji Saponin

Sampel infusa daun secang sebanyak 1 mL ditambah dengan akuades 10 mL kedalam tabung reaksi kemudian dihomogenkan. Tambahkan larutan HCl 2 N sebanyak 1 tetes kedalam tabung reaksi berisi sampel infusa daun secang. Diamkan tabung reaksi selama 30 detik untuk melihat apakah terbentuk busa yang stabil dengan ketinggian 1 cm, terbentuknya busa yang stabil menunjukkan hasil positif mengandung saponin (Bintoro dkk., 2017).

c. Uji Alkaloid

Sampel infusa daun secang masing-masing sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tiga tabung reaksi berbeda. Tambahkan 1 mL HCl 2N pada tiap tabung reaksi. Tambahkan reagen Mayer 2 tetes pada tabung pertama. Terbentuknya endapan putih setelah ditambahkan reagen Mayer menandakan positif mengandung alkaloid. Pada tabung kedua tambahkan reagen Wagner 2 tetes, terbentuk endapan jingga hingga coklat pada larutan menandakan hasil positif mengandung alkaloid. Pada tabung ketiga tambahkan reagen Dragendroff 2 tetes, terbentuknya endapan jingga pada larutan menunjukan positif mengandung alkaloid (Endarini, 2016).

d. Uji Triterpenoid/Steroid

Pindahkan 1 mL sampel infusa daun secang ke dalam *drop plate* kemudian tambahkan 3 tetes larutan CH_3COOH dan 1 tetes larutan H_2SO_4 pekat kedalam infusa daun secang. Hasil positif dilihat saat terbentuknya warna merah membuktikan adanya triterpenoid dan terbentuknya terbentuknya warna hijau pada larutan menunjukkan adanya steroid (Ayu

& Hidajati, 2019).

e. Uji Tanin

Sebanyak 1 mL infusa daun secang dimasukkan kedalam tabung reaksi bersama dengan larutan FeCl_3 1% 2 tetes. Diamkan selama 30 menit dan amati warna yang terbentuk pada larutan, jika terbentuknya larutan berwarna hijau atau hitam kebiruan, maka hasil menunjukan positif mengandung tanin (Endarini., 2016).

f. Uji Fenolik

Sampel infusa daun secang sebanyak 1 mL ditambah FeCl_3 1% 2 tetes. Jika terbentuk warna merah, hijau, ungu, hitam atau biru yang kuat pada larutan maka menunjukan hasil positif mengandung fenolik (Ayu & Hidajati, 2019).

6. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Strilisasi Alat

Dilakukan pencucian alat yang akan digunakan seperti labu erlenmeyer, gelas ukur, cawan petri, tabung reaksi dan gelas beaker. Dikeringkan alat yang telah dicuci dan semprot alat dengan alkohol 70%. Sebelum dibungkus menggunakan kertas payung alat yang berlubang ditutup menggunakan kapas yang dibalut kasa. Kemudian disterilisasi menggunakan oven selama 60 menit pada suhu 171°C . Peralatan logam seperti ose disterilkan menggunakan api bunsen hingga ujung ose memijar. Alat non gelas seperti *yellow tip* dan *blue tip* dibungkus menggunakan aluminium foil kemudian disterilkan diautoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit (Hamzah dkk., 2021).

b. Pembuatan Media

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

Ditimbang media *Nutrient Agar* (NA) sebesar 1 gram dan larutkan dengan akuades sebanyak 50 mL didalam erlenmeyer, dipanaskan dengan *hot plate* dilakukan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* hingga media larut yang ditandai dengan warna media menjadi kuning bening. Erlemeyer ditutup menggunakan kapas dibalut kasa

kemudian disterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C menggunakan autoklaf dengan tekanan 1 atm. Kemudian media yang sudah steril dimasukkan kedalam tabung reaksi ± 5 mL, lalu diposisikan miring 30 derajat dan ditutup dengan kapas berbalut kasa, biarkan hingga memadat. Simpan media yang belum digunakan pada suhu dingin (Hamzah dkk., 2021).

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

Larutkan 9,5 g MHA dalam 250 mL akuades didalam labu Erlenmeyer. Media *Mueller Hinton Agar* dilarutkan dengan cara diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* dan dipanaskan diatas *hot plate*, sebelum dilakukan proses sterilisasi, erlenmeyer disumbat kapas berbalut kasa dan di sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm. Setelah steril pindahkan ke cawan petri dengan ketebalan 3-4 mm (Utomo dkk., 2018).

c. Penyiapan Bakteri Uji

1) Peremajaan Bakteri

Diambil biakan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan jarum ose steril. Masing-masing biakan bakteri ditanam kedalam media agar miring secara terpisah dengan metode penggoresan zig-zag. Biakan bakteri yang telah dipindahkan ke agar miring selanjutnya inkubasi diinkubator pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam (Undap dkk., 2019).

2) Suspensi Bakteri Uji

Diambil 1 ose *Escherichia coli* hasil dari peremajaan, masukkan kedalam tabung reaksi yang sudah berisi NaCl 0,9% sebanyak 10 mL. Homogenkan campuran sampai tercampur merata, kemudian suspensi bakteri yang dihasilkan dibaca tingkat kekeruhannya menggunakan turbidimeter hingga diperoleh nilai kekeruhan yang setara dengan standar *Mc Farland* 0,5 yang ditunjukkan melalui nilai yang muncul pada alat turbidimeter yang muncul. Hal serupa juga dilakukan untuk pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* (Misna

Khusnul, 2016).

d. Pembuatan Seri Konsentrasi Infusa

Pembuatan seri konsentrasi infusa daun secang dilakukan dengan mengambil larutan induk infusa 100% (b/v) replikasi pertama yang telah dibuat, Konsentrasi infusa daun secang yang akan diujikan yaitu 20%, 40%, 60% dan 80% dilakukan pengenceran menggunakan 10 mL akuades, di mana setiap konsentrasi dibuat dengan tiga kali replikasi (Aba dkk., 2021). Rincian perhitungan untuk membuat konsentrasi larutan uji dapat dilihat pada lampiran 6.

e. Pembuatan Kontrol Positif Kloramfenikol 1%

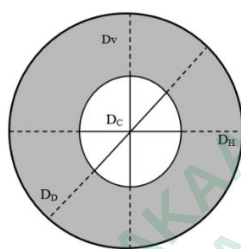
Pembuatan larutan kloramfenikol 1% dilakukan dengan menimbang sebanyak 100 mg serbuk kloramfenikol, kemudian dilarutkan ke dalam 10 mL akuades (William, 2016).

f. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode sumuran

Suspensi Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* masing-masing diinokulasi sebanyak 0,1 mL pada media MHA, ratakan suspensi bakteri pada permukaan media dengan batang L dan selanjutnya dibuat lubang menggunakan *cork borer* berukuran 6 mm. Dibuat 4 lubang sumuran pada cawan uji kelompok perlakuan dan 2 lubang sumuran pada cawan uji kontrol. Dimasukkan masing-masing sebanyak 50 μ L variasi konsentrasi infusa (20%, 40%, 60% dan 80%) ke dalam lubang sumuran pada cawan uji, antibiotik kloramfenikol 1% dan akuades digunakan sebagai kontrol positif dan negatif. Cawan uji dan cawan kontrol di inkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Diameter zona hambat ditandai dengan zona bening yang terbentuk disekitar sumuran yang diukur dengan jangka sorong secara vertikal, diagonal dan horizontal (Nifita, 2021).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Diameter zona hambat diukur dengan membalikkan cawan petri. Area bening disekitaran sumuran menunjukkan seberapa kuat sampel uji dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Diameter zona hambat diukur secara vertikal, diagonal dan horizontal. Hasil dari pengukuran tersebut dihitung nilai rata-ratanya. Pengukuran dinyatakan dengan satuan milimeter (mm) (Mozartha dkk., 2019). Gambar pengukuran dan perhitungan zona hambat dapat dilihat pada Gambar 6 dan Persamaan 1.



Gambar 2. Diagram Pengukuran Zona Hambat (Mozartha dkk., 2019)

Keterangan:

■ = Zona hambat

D_V = Diameter vertikal

D_H = Diameter horizontal

D_D = Diameter diagonal

D_C = Diameter sumuran

Diameter zona hambat diukur dengan rumus pada persamaan 1.

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

Menurut Safitri dkk., (2017) hasil zona hambat yang terbentuk dapat dikelompokkan berdasarkan kriteria kekuatan daya antibakteri yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Kriteria Kekuatan Daya Antibakteri

Diameter zona hambat (mm)	Kekuatan daya antibakteri
≤5	Lemah
6-10	Sedang
11-20	Kuat
>21	Sangat kuat

Data zona hambat antar kelompok selanjutnya dianalisis menggunakan program SPSS. Uji statistik *Shapiro-Wilk* digunakan untuk uji normalitas data yang jumlahnya <50 . Data dikatakan terdistribusi normal jika nilai signifikan $>0,05$. Variasi dari setiap kelompok selanjutnya diuji homogenitas. Data dikatakan homogen jika nilai signifikan $>0,05$. Uji homogenitas dilakukan menggunakan Uji *Levene Test*. Jika syarat homogenitas dan normalitas terpenuhi maka digunakan uji ANOVA (*One Way Analysis of Variance*). Jika hasil uji ANOVA menunjukkan nilai $<0,05$ diartikan adanya perbedaan yang terlihat pada kelompok perlakuan. Untuk melihat secara spesifik kelompok yang berbeda signifikan maka dilakukan *post-hoc* (Daud dkk., 2023).