

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi merupakan semua obyek sasaran dari penelitian. Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah gel yang mengandung ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan kombinasi carbopol 940 dan CMC-Na dengan konsentrasi tertentu.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah gel ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) konsentrasi 5 % dengan kombinasi carbopol 940 dan CMC-Na (1% : 1,5%), (1,15% : 1,25%), (1,25 % : 1,15%), (1,5% : 1%), (1,75% : 0,75%).

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah gel ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan variasi *gelling agent* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat diubah-ubah untuk mengetahui ataupun mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel dari penelitian ini adalah ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan konsentrasi 5% terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol

dalam penelitian ini adalah gel ekstrak kayu secang (tempat tanaman, tumbuh, umur tanaman), komposisi kombinasi metode serta proses pembentukan gel.

Variabel tergantung merupakan titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang dipengaruhi oleh ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.).

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) yang digunakan harus terbebas dari hama serta masih segar dan berwarna cerah. Tanaman ini diambil dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa tengah yang diambil pada bulan Januari 2019.

Kedua, serbuk kayu secang adalah dari kayu secang yang diambil kemudian dicuci pada air mengalir untuk membersihkan kotoran yang menempel kemudian dikeringkan dalam alat pengering (oven) pada suhu 45°C, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan no 40.

Ketiga, ekstrak etanol kayu secang adalah hasil ekstraksi dari serbuk kayu secang dengan menggunakan larutan penyari etanol 70% dengan menggunakan metode maserasi.

Keempat, stabilitas fisik gel ekstrak kayu secang akan diuji meliputi organoleptis, pH, homogenitas, viskositas, daya sebar dan daya lekat gel.

Kelima, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah bakteri yang digunakan dalam penelitian ini yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi.

Keenam, uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah pengujian pada kulit kelinci yang sebelumnya dihilangkan rambutnya dan diinduksi bakteri *Staphylococcus aureus* pada 6 titik lokasi dengan disuntikan secara subkutan pada punggung kelinci.

## **C. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan bejana maserasi, oven, ayakan nomor 40, Timbangan analitik, Gelas ukur, Erlenmeyer,

Tabung reaksi, Jarum Ose, Rak tabung, Pipet tetes, Pipet volume, Pinset, Beaker glass, Botol coklat, Mikroskop, tissue, alat tulis, masker, Corong kaca, Batang pengaduk, Corong pisah, Autoklaf, *rotary evaporator*, kertas saring, kain flannel, *moisture balance*, Inkubator, Pinset, kapas lidi steril, Chamber, *Waterbath*, Cawan petri steril, Kertas cakram ukuran 6 mm, Autovortex mixer, Botol vial, Neraca analitik, penggaris dan spidol.

## 2. Bahan

**2.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan* L).

**2.2 Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan antara lain Na sulfat eksikatus, larutan NaCl 0,9%, carbopol, Na-CMC, gliserin, trietanolamin, sodium alginat, propil paraben, metil paraben, aquades, cat kristal violet, lugol iodine, etanol, aseton dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% .

**2.3 Bakteri uji.** Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diambil dari Laboratorium Universitas Setiabudi.

**2.4 Medium.** Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Brain Heart Infusion* (BHI). Kalium Tellurit dan plasma sitrat.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Identifikasi tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman kayu secang dengan melakukan identifikasi. Identifikasi dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi meliputi daun, batang, bunga, akar dan buah pada tanaman kayu secang sesuai dengan kepustakaan dan dibuktikan di bagian Fakultas MIPA Laboratorium Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

### 2. Pembuatan serbuk kayu secang

Pembuatan serbuk kayu secang muda dilakukan dengan cara kayu secang dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan kotoran yang masih menempel. Kayu secang yang sudah dicuci bersih kemudian ditimbang, setelah itu di oven pada suhu 45°C. Kayu secang yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan

mesin penggiling kemudian diayak menggunakan pengayak nomor 40 sehingga diperoleh serbuk kayu secang yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen.

### **3. Penetapan susut pengeringan serbuk kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*)**

Penetapan kadar air serbuk kayu secang menggunakan alat *moisture balance*. Alat yang akan digunakan ditara terlebih dahulu dengan akurasi dan temperatur sesuai dengan jumlah simplisia yang diujikan. Sebanyak 2 gram serbuk kayu secang kemudian dimasukkan ke dalam alat tersebut kemudian dicatat hasilnya berupa angka dalam persen yang terdapat pada layar *Moisture balance*. Untuk meminimalisir kesalahan penetapan kadar air dilakukan sebanyak dua kali. Adapun syarat susut pengeringan serbuk kayu secang yaitu tidak kurang dari 5% (Depkes 2010).

### **4. Pembuatan ekstrak kayu secang**

Serbuk ekstrak kayu secang ditimbang 20 gram dan diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol sebanyak 400 ml (Kusmiati 2014), perbandingan 1:10 yaitu 1 kg serbuk : 10 liter pelarut. Pertama direndam dalam etanol 70% menggunakan botol tertutup dan berwarna gelap minimal dilakukan selama 5 hari, setelah 5 hari dicuci dengan sisa pelarut yaitu 2,5 liter. Hasil maserasi disaring dengan corong *Bunchner* sehingga didapatkan filtrat dan residu kemudian filtrat dipekatkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu tidak lebih dari 50°C, sehingga pelarut etanol terpisah dengan ekstrak tumbuhan dan didapatkan ekstrak kental. Hasil akhir berupa ekstrak kental kayu secang dengan konsentrasi 100%.

### **5. Penetapan presentase rendemen**

Persen rendemen diperoleh dengan ekstrak kayu secang ditimbang kemudian dibagi berat serbuk dan dikalikan 100%

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat (g)}}{\text{Berat serbuk kayu secang (g)}} \times 100$$

### **6. Identifikasi kandungan senyawa**

Identifikasi kandungan senyawa adalah untuk memastikan kebenaran adanya zat kimia yang terkandung didalam tanaman kayu secang dan dibuktikan secara nyata.

**6.1 Alkaloid.** Larutan uji hasil ekstraksi dibasakan dengan larutan amonia 10%, larutan basa di sari dengan kloroform, ekstrak kloroform diasamkan dengan HCl 1N, kemudian asam dipisahkan dan filtrat diuji dengan pereaksi dragendorf. Hasil positif apabila terbentuk kekeruhan atau endapan jingga kecoklatan. Jika ditambahkan dengan pereaksi mayer hasil positif akan terbentuk endapan putih kekuningan menyatakan adanya alkaloid (Harborne 1987).

**6.2 Flavonoid.** Ekstrak kental diencerkan dengan metanol ditambah HCl pekat dan logan Mg, kemudian didiginkan dan ditambahkan amil alkohol, dan dikocok. Hasil positif flavonoid akan menunjukkan terbentuknya warna merah dan bergerak keatas (Isnawati *et al.* 2008).

**6.3 Tanin.** Diambil 2 ml ekstrak kental lalu ditambahkan 2 ml aquadest, kemudian ditetesi 1-2 tetes larutan FeCl<sub>3</sub>. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau gelap atau hijau kebiruan (Endarini 2016).

**6.4 Saponin.** Sebanyak 2 mL larutan ekstrak ditambahkan air panas, kemudian ditambahkan beberapa tetes HCl pekat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa permanen selama ± 15 menit (Jaafar, *et al.*, 2007)

## 7. Uji bebas alkohol ekstrak kayu secang

Uji bebas ekstrak etanol dari kayu secang dengan cara ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan CH<sub>3</sub>COOH pekat dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat kemudian dipanaskan. Uji positif bebas etanol ini ditandai dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

## 8. Formula gel

Formulasi standar pembuat gel menurut Sri Hartati dkk, (2015) :

R/ Carbopol 940	1,25
Na-CMC	0,5
Ca-alginat	0,5
Trietanolamin	3
Gliserol	12,5
Asam borat	0,5
Kalium sorbat	0,2
Ekstrak zat aktif	5 ml
Aquades ad	100 ml

**Tabel 1. Rancangan formula gel ekstrak kayu secang**

Bahan	Kegunaan	Kontrol (-)	FI	FII	FIII	FIV	FV
Ekstrak secang (%)	Zat aktif	-	5	5	5	5	5
Carbopol 940	Basis gel	0,75	1	1,15	1,25	1,5	1,75
Na-CMC	Basis gel	1,75	1,5	1,25	1,15	1	0,75
TEA	Humektan	3	3	3	3	3	3
Sodium alginat	Pengemulsi	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Gliserin	Humektan	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Nipagin	Pengawet	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Nipasol	Pengawet	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Aquadest (ml) ad	Pelarut	100	100	100	100	100	100

## 9. Pembuatan sediaan gel

Na-CMC dan carbopol ditaburkan pada air panas didiamkan 2 menit dan diaduk dalam mortir kemudian ditambahkan trietanolamin untuk mengembangkan carbopol dan Na-CMC (Wisnu 2018). Larutkan sodium alginat dan nipagin diaduk ad homogen campurkan ke dalam campuran carbopol dan Na-CMC. Gliserin dan nipasol dilarutkan kemudian ditambahkan ke dalam campuran aduk ad homogen. Terakhir dimasukkan ekstrak kayu secang di aduk ad homogen.

## 10. Pengujian sifat fisik sediaan gel

**10.1. Uji organoleptik.** Uji ini meliputi pemeriksaan bentuk, warna, serta bau dari sediaan gel yang telah dibuat (Depkes RI 2000).

**10.2. Uji homogenitas.** Mengoleskan 3 bagian yaitu atas, tengah, dan bawah gel pada kaca transparan. Homogen bila tidak terdapat butiran-butiran kasar pada sediaan. Uji dilakukan pada minggu pertama dan kedua (Depkes 2000).

**10.3. Uji pH gel.** Uji pH dilakukan untuk melihat tingkat keasaman sediaan gel untuk menjamin sediaan gel tidak menyebabkan iritasi pada kulit. pH sediaan gel diukur dengan menggunakan pH meter. pH meter dicelupkan ke dalam sampel gel yang telah diencerkan. pH sediaan yang memenuhi kriteria pH kulit yaitu dalam interval 4,5 – 7 (Tranggono & Latifa 2007).

**10.4. Uji viskositas.** Uji viskositas krim dilakukan dengan menggunakan alat viskometer Cup and Bob. Viskometer VT-04 E RION., LTD dipasang dengan arah horisontal atau tegak lurus dengan klemnya. Kemudian rotor dipasang pada viskotester dengan menguncinya berlawanan arah jarum jam. Pengujian viskositas ini dilakukan berulang sebanyak tiga kali tiap formulanya. Pengujian pertama

dilakukan pada hari sediaan gel dibuat setelah jadi gel langsung diuji viskositasnya. Sediaan gel kemudian disimpan selama seminggu dan diuji lagi viskositasnya pada minggu kedua (Voigt 1994).

**10.5. Uji daya sebar.** Gel ditimbang seberat 500 mg ditimbang dan diletakkan di tengah kaca bulat berskala, sebelumnya ditimbang diletakkan kaca tersebut di atas gel dan dibiarkan selama 1 menit. Kemudian diukur berapa diameter penyebarannya. Daya sebar gel yang baik antara 5-7 cm (Garget *et al.*, 2002).

**10.6. Uji daya lekat.** Gel ekstrak kayu secang secukupnya diletakkan diatas obyek glass kemudian diletakkan obyek glass lain di atas sediaankemudian ditekan dengan beban 0,5 kg selama 5 menit dan pasanglah obyek glass pada alat uji. Lepaskaskan beban dengan berat 20 g dan dicatat waktunya hingga kedua obyek glass terlepas. Ulang sebanyak 3 kali (Haris 2005).

**10.7. Uji Stabilitas gel.** Pengujian dilakukan dengan metode *freeze thaw* yaitu dengan menyimpan sediaan pada suhu 4°C selama 48 jam (1 siklus) sampai lima siklus. Setiap satu siklus selesai dilihat ada tidaknya pemisahan fase atau perubahan, uji pH dan uji viskositas gel (Priani *et al.*, 2014).

## **11. Kontrol sediaan**

Kontrol negatif adalah sediaan gel yang tidak ditambahkan ekstrak. Sedangkan kontrol positif yang digunakan adalah "GENTAMISIN".

## **12. Pembuatan suspensi bakteri**

Pembuatan suspensi dilakukan dengan diambil koloni yang tumbuh pada media NA. Pembuatan dilakukan dengan mengambil koloni dengan cara kurang lebih 2-4 jarum Ose bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 disuspensi dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) 10 ml dihomogenkan dan disetarakan dengan standart Mc Farland, apabila kekeruhan tidak memenuhi standart maka dilakukan inkubasi selama 5-8 jam. Amati kekeruhan yang terjadi kemudian disesuaikan dengan standar Mc Farland 0,5 yang dianggap setara dengan  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml. Tujuan disesuaikannya dengan standart Mc Farland 0,5 adalah agar jumlah bakteri selama digunakan dalam penelitian sama.

### **13. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

**13.1 Identifikasi dengan cawan gores. Biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923** diinokulasi pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang telah ditetesi 3 tetes kalium tellurit 1% dan kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu adanya beberapa koloni berwarna hitam dan medium disekitar koloni berwarna kuning, hal ini dikarenakan bakteri *Staphylococcus aureus* dapat memfermentasi manitol.

**13.2 Pewarnaan.** Pewarnaan pada bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu dengan pembuatan preparat ,preparat ditetesi cat Gram A (cat kristal violet) sebanyak 2-3 tetes didiamkan selama 1 menit. Cuci dengan air mengalir kemudian ditetesi Gram B (lugol iodine sebagai mordan) didiamkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan Gram C (etanol aseton = 1:1 untuk melunturkan) didiamkan selama 45 detik, dicuci dengan air mengalir kemudian ditetesi Gram D (cat sarfanian) didiamkan selama 1 menit dicuci dan dikeringkan. *Staphylococcus aureus* akan menunjukkan hasil positif apabila ketika diamati di bawah mikroskop menunjukkan warna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti anggur.

**13.3 Biokimia.** Pada uji ini terbagi menjadi dua bagian yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase dengan cara suspensi bakteri ditanamkan pada media nutrient cair yang ditambah hidrogen peroksida 3%. Hasil positif akan menunjukkan adanya gelembung udara sebab *Staphylococcus aureus* mempunyai enzim katalase. Uji koagulase dengan menggunakan serum darah diberi asam sitrat kemudian diencerkan (1:5) dan ditambahkan 2-3 ose biakan bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-4 jam. Hasil yang positif akan menunjukkan saat tabung dibalik serum/gumpalan plasma tetap melekat pada dinding tabung.

### **14. Pengujian aktivitas antibakteri**

Pengujian ini menggunakan metode difusi. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinokulasikan pada cawan yang berisi

media *Muller Hinton Agar* (MHA) dibiarkan selama 5 menit untuk bakteri tersebut berdifusi ke dalam media. Cawan dibuat 5 sumuran dengan *boor prop* dan sampel dimasukkan ke dalam lubang sumuran sebanyak 50  $\mu\text{L}$ . Sediaan gel dilarutkan terlebih dahulu dengan DMSO 3%. Sumuran yang pertama diisi gel ekstrak kayu secang dengan formula gel 1, sumuran yang kedua diisi dengan formula gel 2, sumuran ketiga diisi dengan formula gel 3, sumuran keempat diisi dengan formula gel 4, sumuran kelima diisi dengan formula gel 5, sumuran gel keenam diisi dengan kontrol positif yaitu gentamisin gel, dan sumuran yang ketujuh diisi dengan kontrol negatif yang tidak mengandung ekstrak kayu secang. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Diameter zona hambat sekitar sumuran diukur dan dinyatakan dalam satuan mm. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (pratiwi 2008)

## 15. Pengujian Terhadap Hewan Kelinci

**15.1 Pemilihan kelinci.** Kelinci yang dipilih adalah kelinci *New Zealand* jantan yang sehat yaitu berjumlah 3 ekor yang berumur sekitar 3-5 bulan kelinci dengan perlakuan yang baik dari segi pakan, suhu, temperature, kondisi kandang dan air yang diberikan sebelum dilakukan perlakuan. Hal ini bertujuan memperkecil penyimpangan hasil penelitian.

**15.2 Pencukuran.** Pencukuran rambut kelinci bertujuan agar gel dapat kontak langsung dengan kulit sehingga mengurangi penyimpangan hasil dan aksi lebih cepat. Sehari sebelum pembuatan luka sayat, hewan uji dicukur bulunya di daerah punggung sampai licin. Pada saat dibuat luka, terlebih dahulu punggungnya dan sekitarnya dibersihkan dengan alkohol 70%. Selanjutnya dibuat luka sayatan dengan ukuran panjang 1,5 cm pada bagian punggung kelinci menggunakan *surgical blade sterile* (pisau bedah) sampai bagian subkutan. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* diberikan sebanyak 0,2 mL pada masing-masing lokasi.

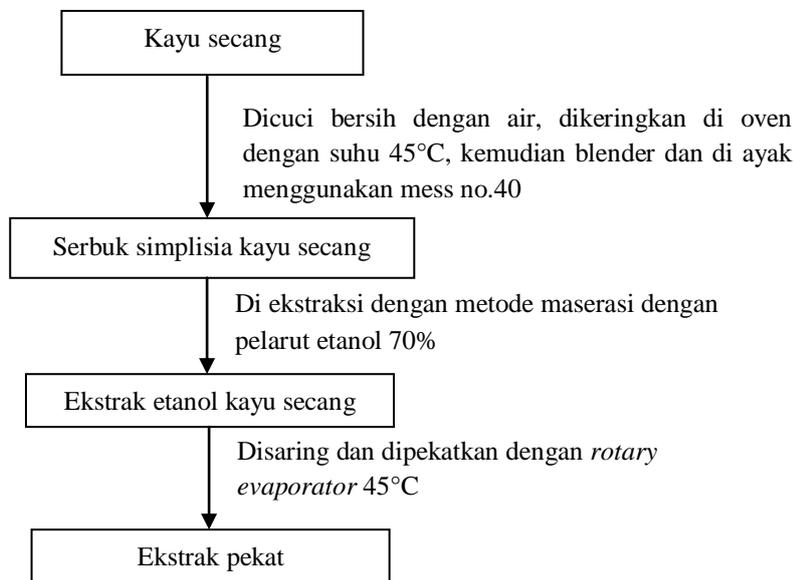
**15.3 Pengolesan sediaan gel.** Dilakukan pengolesan gel dari ekstrak kayu secang yang memiliki formula yang terbaik dari segi mutu, fisik dan stabilitasnya, serta formula yang memiliki efek penghambat paling bagus terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Gel tersebut dioleskan pada punggung kelinci yang telah diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* diberikan perlakuan dengan mengoleskan

0,3 g sediaan gel ekstrak kayu secang dan ditutup dengan kasa steril untuk mencegah adanya kontaminasi dari luar. Pengolesan dilakukan 3 kali sehari dan selama pengolesan 2 hari sekali diamati perkembangan luka terinfeksi pada kulit punggung kelinci. Kepekaan bakteri terhadap gel dapat diamati dengan mengukur panjang penutupan luka yang terjadi menggunakan penggaris. Setelah 7 hari lalu di lihat apakah sudah mulai mengering atau belum dari jaringan yang rusak karena infeksi bakteri dan bandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif.

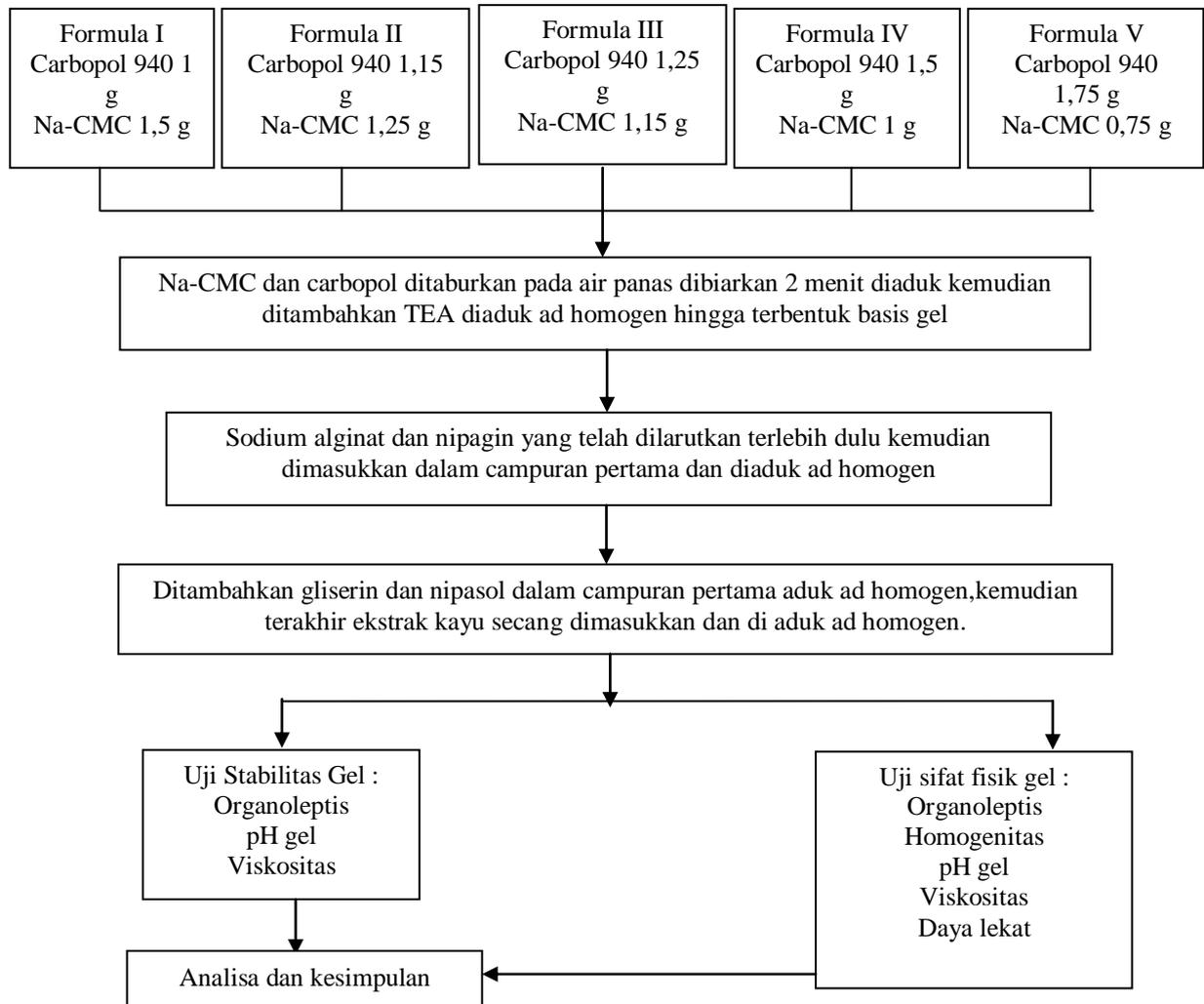
### E. Analisis Hasil

Hasil uji aktivitas antibakteri sediaan gel ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode difusi yang dinyatakan dengan nilai zona hambat yang terbentuk dan stabilitas fisik dari sediaan gel. Hasil data yang diperoleh dianalisis menggunakan One Sample *Kolmogorov Smirnov* statistik metode anova satu jalan.

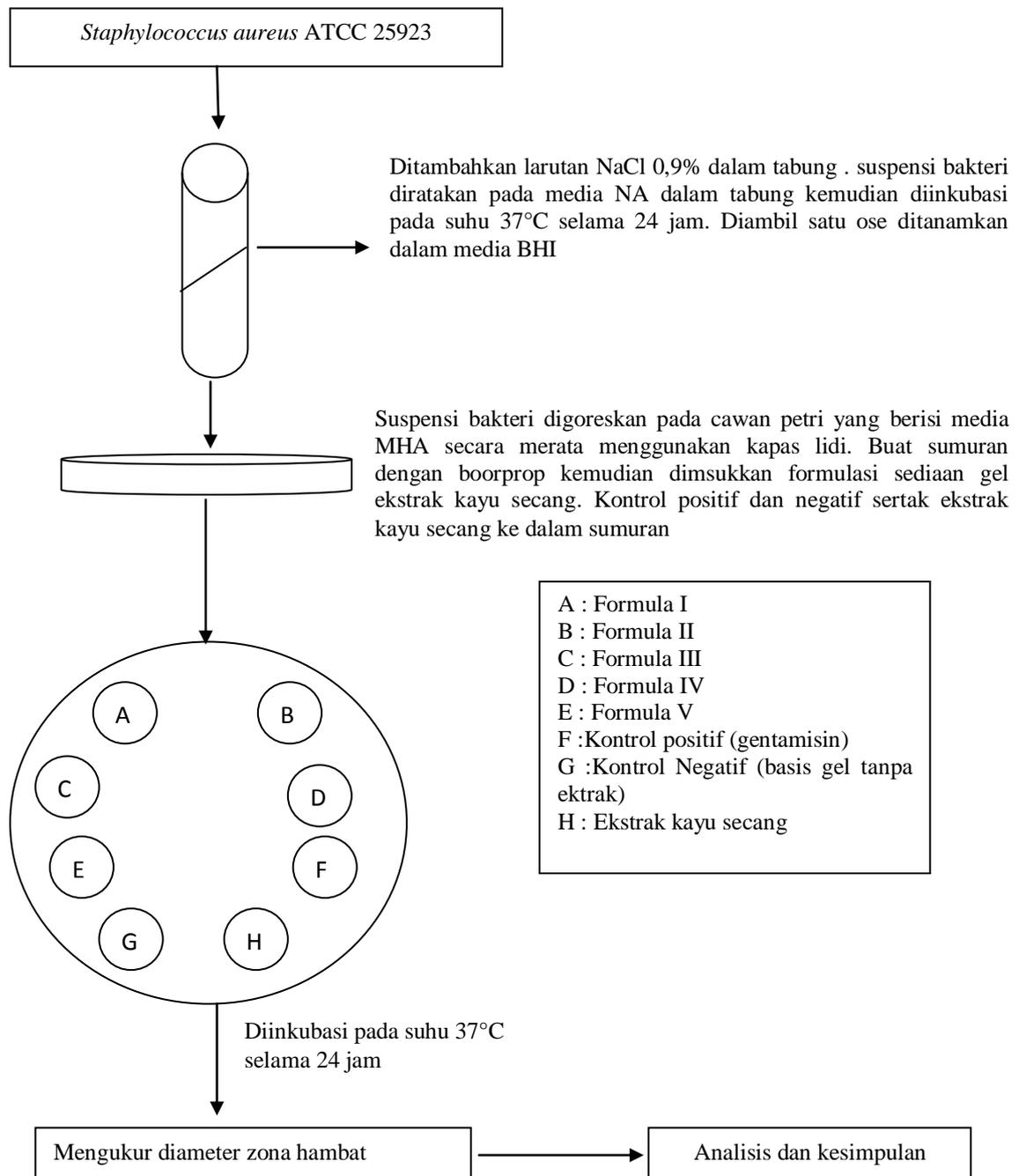
### F. Skema Penelitian



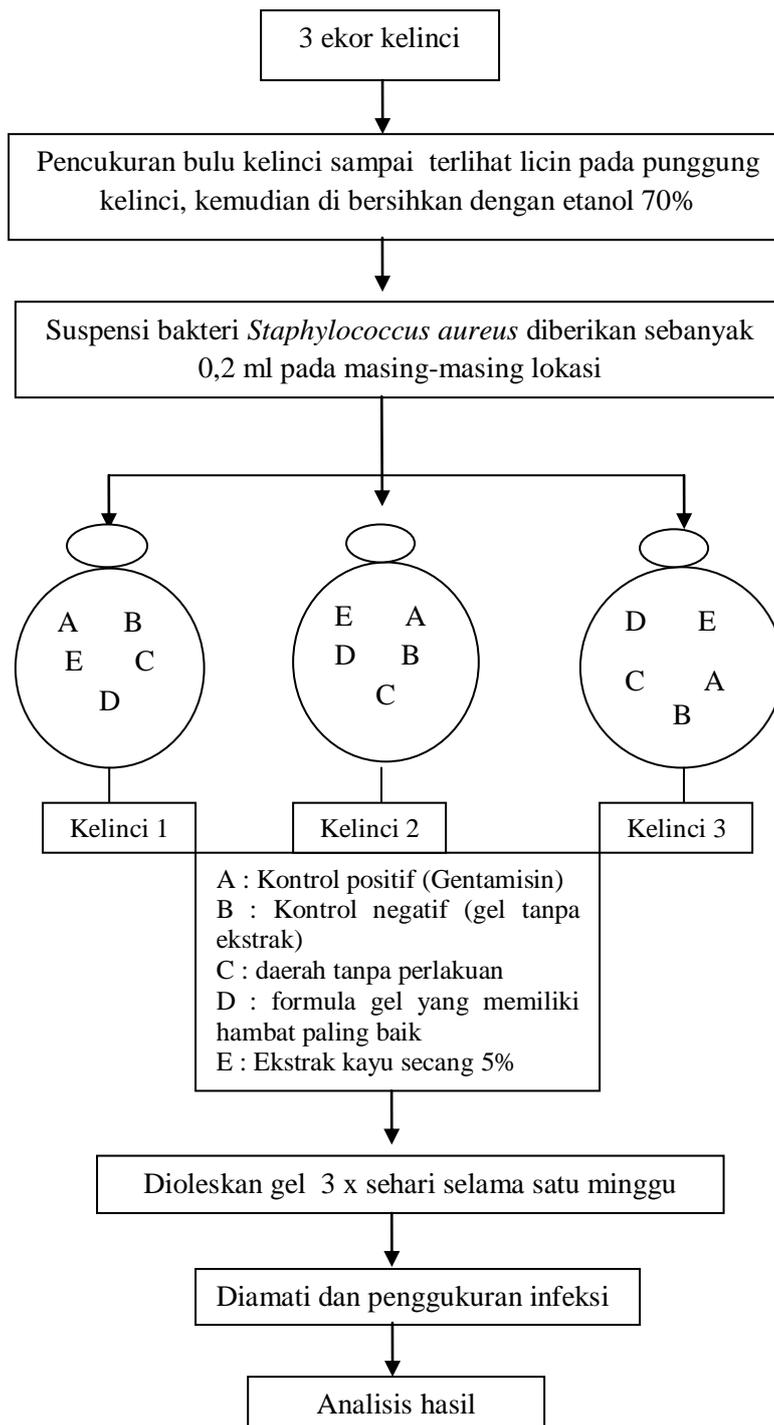
Gambar 11. Skema pembuatan ekstrak kayu secang (*Caesalpinia Sappan* L.)



**Gambar 12.** Skema pembuatan gel ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*)



**Gambar 13. Skema pengujian aktivitas antibakteri gel ekstrak kayu secang terhadap *staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi.**



**Gambar 14. Lokasi bagian kulit kelinci diberi perlakuan**