

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi Dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah gel *hand sanitizer* yang mengandung ekstrak Kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) yang diambil dari daerah Desa Kalisoro Tawangmangu, Karangayar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah dari ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) pada konsentrasi ekstrak 3%, 6%, 9%, 12%, dan 15% yang dibuat dalam sediaan gel *hand sanitizer*.

B. Variable Penelitian

1. Identifikasi Variable Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah gel ekstrak Kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) dengan berbagai konsentrasi.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri gel ekstrak Kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2. Klasifikasi Variable Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung sedangkan pengertian variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan pengaruh selain variabel bebas.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah gel ekstrak Kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) dengan konsentrasi 3%, 6%, 9%, 12%, dan 15%.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah ekstrak Kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn), formulasi gel, bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sterilisasi, suhu, kondisi penelitian, kondisi laboratorium, media dan metode penelitian.

Variabel terikat adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam suatu penelitian. Variabel terikat dari penelitian ini adalah aktivitas antibakteri gel *hand sanitizer* ekstrak Kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 paling optimum.

3. Definisi Operasional Variable Utama

Pertama, (*Caesalpinia sappan* Linn) yang diambil secara acak dari desa Kalisoro Tawang Mangu, Karangayar, Jawa Tengah, dengan ciri – ciri populasi dan sampel kayu secang yaitu berwarna cerah dan tidak rusak

Kedua, ekstrak kayu secang adalah ekstrak hasil ekstraksi (*Caesalpinia sappan* Linn) dengan menggunakan metode maserasi.

Ketiga, konsentrasi masing–masing ekstrak (*Caesalpinia sappan* Linn) yang di formulasikan kedalam sediaan gel adalah 3%, 6%, 9%, 12%, dan 15%

Keempat, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi dengan menggunakan metode difusi.

Kelima, kontrol positif adalah gel *hand sanitizer* merk “ANTIS” antiseptik tangan yang mengandung zat aktif alkohol 60%.

Keenam, uji aktivitas antibakteri gel *hand sanitizer* ekstrak etanol (*Caesalpinia sappan* Linn) adalah dengan menggunakan metode difusi dan melihat diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dalam media uji.

C. Alat Dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan, neraca Gram kasar dan Gram halus, gelas ukur, erlenmeyer, corong kaca, ayakan, oven, rotary evaporator vacum, wadah gel, stemfer, dan mortir, cawan petri, pengaduk kaca, kertas saring, cawan, kertas cakram, jarum ose, beaker glass, tabung reaksi, Blender.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak Kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) yang tidak terlalu Gelap dan Cerah yang diambil dari daerah desa Kalisoro Tawang Mangu, Karangayar, Jawa Tengah.

Bahan kimia yang digunakan antara Na sulfat eksikatus, larutan NaCl 0,9%, Karbopol, HPMC, Gliserin, Polyetilen Glycol, Trietanolamin, Nipagin, Nipasol, alkohol 70%, cat kristal violet, lugol iodine, etanol aseton, dan H₂O₂ 3%. Media yang digunakan adalah, *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Brain Heart Infusion* (BHI), Kalium Tellurit, dan Plasma sitrat. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel Kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) yang berkaitan dengan ciri – ciri mikroskopis dan makroskopis, serta mencocokkan ciri – ciri morfologis yang ada pada tanaman Kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) terhadap kepustakaan yang dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta, Solo, Jawa Tengah.

2. Pengambilan Dan Pemilihan Bahan

Kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) yang diperoleh dari Desa Kalisoro Tawangmangu, Karangayar, Jawa Tengah. Bagian tanaman yang

digunakan untuk mendapatkan ekstrak adalah kayu yang segar dan tidak rusak. Kayu yang digunakan dalam keadaan bagus tanpa rusak untuk menghasilkan ekstrak yang lebih maksimal.

3. Pengeringan simplisia

Kayu secang yang masih muda disortir dan dicuci dengan menggunakan air mengalir agar kotoran yang menempel pada kayu secang menghilang. Kemudian kayu secang yang telah bersih dioven pada temperatur 50°C sampai kering.

4. Pembuatan serbuk

Simplisia yang sudah dikeringkan kemudian diserbuk dengan alat penyerbuk (Blender), diblender sampai halus kemudian diayak dengan mess no 40 dan disimpan dalam wadah yang kering kemudian ditutup rapat.

5. Penetapan Kadar Air Serbuk Kayu Secang

Penetapan kadar air serbuk kayu secang dilakukan menggunakan alat *Moisture balance*. Alat yang akan digunakan ditera terlebih dahulu dengan akurasi dan temperatur sesuai dengan jumlah simplisia yang diujikan. Serbuk kayu secang ditimbang sebanyak 2 Gram, lalu dimasukkan ke dalam alat tersebut kemudian dicatat hasilnya berupa angka dalam persen yang terdapat pada layar *Moisture balance*. penetapan kadar air dilakukan sebanyak dua kali bertujuan untuk meminimalisir kesalahan. Adapun syarat kadar air yaitu tidak kurang dari 10% (Badan POM RI. 2004).

6. Pembuatan Ekstrak Kayu Secang

Kayu secang yang telah menjadi serbuk dilanjutkan dengan proses maserasi dengan ditimbang sebanyak 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 berwarna gelap minimal selama 5 hari. perbandingannya 1 : 20. Setelah 5 hari di cuci dengan sisa pelarut yaitu 2,5. Hasil maserasi disaring dengan corong *Buchner* 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%. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dimasukkan kedalam botol steril.

7. Uji Bebas Alkohol Ekstrak Kayu Secang

Uji bebas alkohol ekstrak etanol kayu secang dilakukan dengan cara esterifikasi untuk mengetahui bahwa ekstrak yang akan digunakan untuk penelitian benar – benar bebas dari etanol, karena diketahui mempunyai aktifitas antiseptik yang dapat membunuh bakteri. Uji ini dilakukan dengan cara ekstrak ditetaskan pada tabung reaksi kemudian ditambahkan reagen H₂SO₄ pekat dan CH₃OOH lalu dipanaskan. Hasil uji bebas etanol dari ekstrak tersebut ditandai dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

8. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Kayu Secang

Identifikasi kandungan kimia ekstrak kayu secang dilakukan untuk mengetahui kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam serbuk kayu secang. Identifikasi yang dilakukan adalah identifikasi senyawa brazilin dengan cara pengujian fitokimia.

8.1 Pengamatan organoleptik. Pengamatan yang dilakukan meliputi warna, aroma, dan rasa. Hasil dari ekstrak yang telah dikentalkan diambil dengan volume yang sama dan diletakkan diatas wadah kaya yang bersih. warna dari ekstrak kayu secang yang akan berwarna merah karena senyawa brazilin, bau dari ekstrak khas sesuai dengan tanaman asal, dan rasa dari ekstrak kayu secang agak pahit dan kelat

8.2 Identifikasi senyawa brazilin. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan metode KLT untuk memastikan bahwa kandungan brazilin terdapat dalam serbuk dari simplisia kayu secang dengan fase gerak toluen P, etil asetat P, metanol P, asam format P (4:6:1:0,5), fase diam menggunakan silika gel GF₂₅₄, Larutan uji 1% dalam metanol P, Larutan pembanding brazilin 1% dalam metanol p, Volume penotolan larutan uji 10ul dan larutan pembanding 5ul. Deteksi dengan sinar tampak.

8.3 Identifikasi senyawa flavonoid. Ekstrak kayu secang sebanyak 5 ml dipanaskan selama 5 menit, tambahkan beberapa tetes HCL dan sedikit serbuk Mg, aduk sampai homogen. Hasil positif menunjukkan warna merah tua atau merah muda (Widigdyo *et al* 2017).

8.4 Identifikas senyawa tanin. sebanyak 2 ml ekstrak air dari suatu bagian tanaman ditambahkan ke dalam 2 ml air suling. Selanjutnya, larutan ekstrak tersebut ditetesi dengan satu atau dua tetes larutan FeCl 31%. Adanya kandungan tanin ditandai dengan timbulnya warna hijau gelap atau hijau kebiruan (Endarini 2016).

8.5 Identifikasi senyawa terpenoid. Ekstrak yang diperoleh diambil sedikit dan dikeringkan di atas papan spot test, ditambahkan tiga tetes anhidrida asetat dan kemudian satu tetes asam sulfat pekat. Adanya senyawa golongan terpenoid akan ditandai dengan timbulnya warna merah sedangkan adanya senyawa golongan steroid ditandai dengan munculnya warna biru (Endarini 2016).

9. Sterilisasi Alat

Media dan alat – alat gelas seperti beker glass dan gelas ukur yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan terlebih dahulu dengan alat auto clave pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. (Anonim. 2007)

10. Formula Gel

Tabel 2. Formula Standar Antibacterial Hand Gel (Wisnu, 2018)

Bahan	Formula 1- 6
Ekstrak daun sirih merah	5%, 10%, 15%, 20% dan 25%
Carbopol 940	0,8 %
TEA (<i>Trietanolamin</i>)	1,6 %
Gliserin	19 %
<i>Blue berry</i>	2 gtt
Natrium metabisulfit	0,5 %
Aquades ad.	ad 60 mL

Tabel 3. Rancangan Formula Gel Antisepti Tangan yang Telah Dimodifikasi

Bahan	satuan	Kontrol (-)	F1	F2	F3	F4	F5
Ekstrak kayu secang	%	-	3	6	9	12	15
Carbopol 940	g	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
HPMC	g	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Gliserin	ml	12	12	12	12	12	12
PEG	ml	9	9	9	9	9	9
TEA	ml	1	1	1	1	1	1
Metilparaben	g	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Propilparaben	g	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Aquadest	ad	100	100	100	100	100	100

11. Pembuatan Sediaan Gel

Cara pembuatan gel adalah karbopol dan HPMC dikembang menggunakan air panas, untuk mengembangkan karbopol dan HPMC di dalam mortir panas. ditambahkan trietanolamin (TEA). Di dalam wadah terpisah, metil paraben dilarutkan dalam aquadest yang telah dipanaskan hingga larut kemudian dimasukan kedalam karbopol dan HPMC yang sudah dikembangkan. Ekstrak kayu secang dilarutkan dengan PEG ditambahkan gliserin, kemudian dimasukan ke dalam campuran sebelumnya lalu tambahkan Propil paraben. Diaduk hingga terbentuk massa gel yang kental, jernih dan homogen, dimasukkan dalam wadah yang cocok dan tertutup rapat

12. Kontrol Sediaan

12.1 Kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah gel *hand sanitizer* merk “ANTIS” antiseptik tangan yang mengandung zat aktif alkohol 60%.

12.2 Kontrol negatif. Kontrol negatif yang digunakan adalah basis gel yang tidak mengandung ekstrak kayu secang.

13. Pengujian Fisik Sediaan Gel

13.1 Pengujian Organoleptik. Uji organoleptik meliputi pemeriksaan konsistensi, warna, dan bau dari gel.

13.2 Pengujian Homogenitas. Mengoleskan 3 bagian atas, tengah, dan bawah gel pada kaca transparan, homogen bila tidak terdapat butiran-butiran kasar pada sediaan.

13.3 Pengujian pH Gel. Stik pH meter dicelupkan kedalam gel yang telah diencerkan. Gel di encerkan menggunakan aquadest. Pengujian dilakukan pada minggu pertama dan ketiga. Di analisis hasil pH

13.4 Pengujian Viskositas Gel. Gel dimasukkan kedalam wadah sebagai tempat tester kemudian wadah alat dipasang pada postable viscotester. Viskositas diketahui dengan mengamati gerakan jarum petunjuk viskositas. Uji ini dilakukan 24 jam setelah pembuatan gel.

13.5 Pengujian Daya Lekat Gel. Gel diletakan di atas gelas obyek yang telah ditentukan luasnya kemudian Gelas obyek yang lain diletakan di atas gel tersebut sebagai penutup, kemudian ditekan dengan beban 1 kg diatas gelas objek penutup selama 15 menit, gelas obyek dipasangkan pada alat tes, dimana gelas obyek bagian atas di berikan beban 80Gram untuk menarik. Jika antara gelas obyek bawah dan atas terlepas maka waktu dicatat sebagai lama daya lekat dari gel. Masing – masing percobaan direplikasi 3 kali untuk setiap gel yang uji.

13.6 Pengujian Daya Sebar Gel. Pengujian daya sebar gel dilakukan dengan alat ekstensometer, $\pm 0,5$ Gram diletakan di tengah alat (kaca bulat), kaca bulat bagian atas ditimbang terlebih dahulu dan diletakan di atas massa gel, dibiarkan selama 1 menit, diukur diameter gel yang menyebar (diambil panjang rata- rata diameter dari beberapa sisi), ditambah 50 Gram, 100 Gram, 150 Gram, dan 200 Gram. Sebagai beban tambahan secara bertahap, setiap penambahan beban didiamkan selama 1 menit dan dicatat diameter gel yang menyebar seperti sebelumnya. Cara diatas diulangi untuk setiap formula gel yang diperiksa masing – masing 3 kali.

13.7 Pengujian Stabilitas Gel. Pengujian dilakukan dengan metode *freeze thaw* yaitu dengan menyimpan sediaan pada suhu 4°C selama 48 jam kemudian

dipindahkan ke suhu 40°C selama 48 jam (1 siklus). Setelah itu dilanjutkan sampai lima siklus. Setiap satu siklus selesai, dilihat ada tidaknya pemisahan fase atau perubahan, uji pH dan uji viskositas gel (Priani *et al.*, 2014).

14. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

14.1 Identifikasi Mikroorganisme Secara Isolat. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinokulasi pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang telah ditetesi 3 tetes kalium telurit 1% dalam cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna koloni hitam dan warna medium di sekitar koloni kuning. Kemampuan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat memfermentasi manitol membentuk suasana asam dan fenol red maka medium di sekitar koloni berwarna kuning (Jawet *et al.*, 2007).

14.2 Identifikasi Morfologi Secara Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordan), Gram C (etanol aseton = 1 : 1 sebagai peluntur), dan Gram D (cat sarfianian sebagai cat lawan atau penutup). Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan Gram A sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. Cuci dengan aquadest mengalir dan dikeringkan anginkan, preparat dilunturkan dengan Gram C didiamkan selama kurang lebih 30 detik, dicuci dengan aquadest mengalir kemudian ditetesi Gram D dan didiamkan selama kurang lebih 1 menit, cuci dengan aquadest mengalir kemudian keringkan preparat. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dinyatakan positif apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati dibawah mikroskop.

14.3 Identifikasi Biokimi Secara Fisiologi. Identifikasi secara fisiologi ada dua cara yaitu uji katalase dan koagulase.

14.3.1 Pengujian Koagulase. Uji koagulase dapat dilakukan dengan cara menginokulasikan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ke dalam BHI 10 ml kemudian diinkubasi selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C. Inokulum tersebut dipindahkan sejumlah 0,2 - 0,3 ml ke dalam tabung reaksi yang sudah

disterilkan kemudian ditambahkan 0,5 ml koagulase plasma kemudian di aduk dan diinkubasi pada suhu 37°C. Diamati tiap jam sampai empat jam pertama dan dilanjutkan sampai 24 jam. Hal ini dimaksudkan untuk melihat atau mengecek koagulan yang terbentuk. Koagulan yang terbentuk secara padat atau solid serta tidak jatuh apabila tabung dibalik dinyatakan positif bahwa bakteri tersebut memang *Staphyococcus aureus* ATCC 25923.

14.3.2 Pengujian Katalase. Suspensi bakteri uji ditanam pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) kemudian diinkubasi selama 24 jam dan suhu 37°C, lalu ditambahkan 2-3 tetes H₂O₂ 3%. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara *Staphyococcus aureus* ATCC 25923 mempunyai katalase. Penambahan H₂O₂ akan terurai menjadi 2H₂ dan O₂, hal ini ditandai dengan timbulnya gelembung udara.

15. Pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Pembuatan suspensi untuk difusi dengan mengambil biakan murni kurang lebih 2 ose bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Suspensi dibuat dalam tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar *Mc Farland* 0,5 setara dengan jumlah 1,5x10⁸ cfu/mL. Tujuan disesuaikannya suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan standar *Mc Farland* 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

16. Pengujian Aktivitas Antibakteri

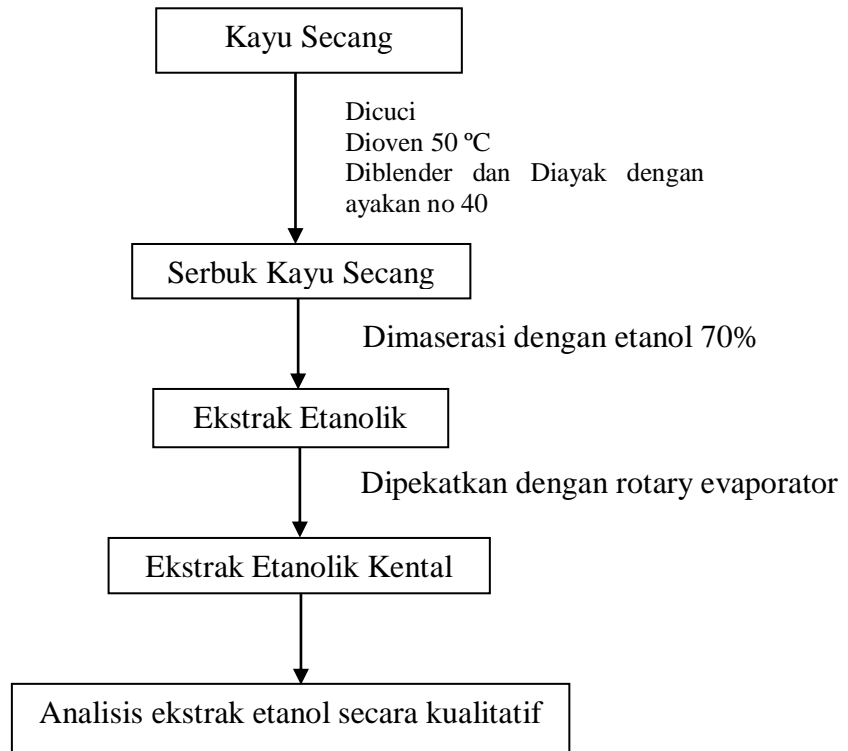
Metode yang digunakan untuk uji daya antibakteri adalah metode difusi. Metode difusi digunakan untuk mengetahui ada nya daya hambat terhadap bakteri dan untuk menentukan diameter daerah hambat dari gel ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) dengan konsentrasi 3%, 6%, 9%, 12%, dan 15%. dibuat 5 sumuran dengan menggunakan boorprop pada media yang berisi bakteri *Staphyococcus aureus* ATCC 25923. Sumuran 1 diisi gel ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) dengan konsentrasi 3%, sumuran 2 diisi gel ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) dengan konsentrasi 6%, sumuran 3 diisi

gel ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) dengan konsentrasi 9%, sumuran 4 diisi gel ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) dengan konsentrasi 12%, sumuran 5 diisi gel ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) dengan konsentrasi 15%, sumuran 6 diisi kontrol positif gel *hand sanitizer* merk “NOUVO”, sumuran 7 diisi kontrol negatif gel tanpa ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn), masing – masing sumuran di isi sebanyak 50 μ L dan di buat 3 kali pengujian. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dilakuan pengamatan terhadap penghambatan bakteri (Diameter zona hambat).

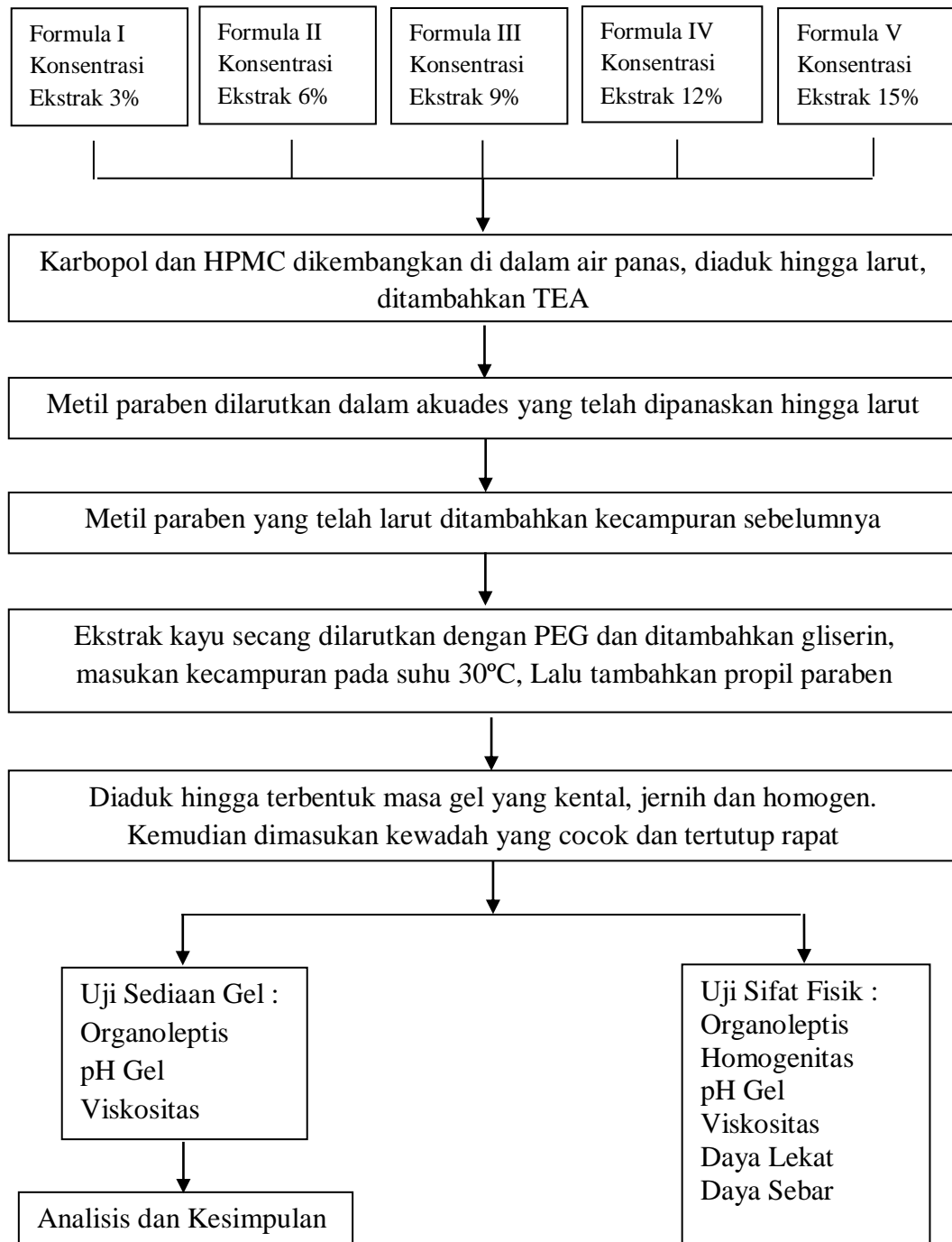
E. Analisis Hasil

Data penelitian yang didapat berupa viskositas, pemeriksaan pH, daya sebar, daya lekat, stabilitas, dan uji antibakteri. Data hasil penelitian tersebut dianalisa dengan menggunakan *One Sample Kolmogorov Smirnov* dan *Two Way Anova* dengan program SPSS for windows.

F. Skema Penelitian
1. Ekstraksi Kayu Secang



2. Formulasi Gel *Hand Sanitizer* Dengan Ekstrak Kayu Secang



3. Analisis Diameter Zona Hambat Formula Ekstrak Kayu Secang Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

