

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen untuk menentukan efektivitas ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan jahe merah (*Zingiber officinale* Var Rubrum) serta kombinasinya terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dengan metode Difusi Cakram.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang
- b. Ekstraksi dan skrining metabolit dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Uji efektivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan mulai dari bulan Mei 2023 s/d Juli 2023

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman

secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan tanaman jahe merah (*Zingiber officinale* Var Rubrum) yang berasal dari Desa Mluweh, Kecamatan Ungaran Timur, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Var Rubrum) yang berasal dari Desa Mluweh, Kecamatan Ungaran Timur, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini yaitu:

1. Metode Ekstraksi Maserasi

Cara melakukan maserasi yaitu dengan mencampurkan serbuk simplisia yang direndam dengan pelarut etanol 70% di dalam wadah yang tertutup rapat pada temperaturruangan selama 7 hari.

2. Ekstrak Kayu Secang

Ekstrak kayu secang adalah ekstrak yang didapatkan dari proses maserasi dengan pelarut etanol 70% kemudian dilanjutkan pada proses evaporasi menggunakan evaporator.

3. Ekstrak Jahe Merah

Ekstrak jahe merah adalah ekstrak yang didapatkan dari proses maserasi dengan pelarut etanol 70% kemudian dilanjutkan pada proses evaporasi menggunakan evaporator.

4. Efektivitas Antibakteri

Pada penelitian ini, uji efektivitas antibakteri yang dilakukan adalah uji dengan sampel ekstrak Secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan Jahe Merah (*Zingiber officinale* Var Rubrum) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* menggunakan metode difusi cakram yaitu dengan hasil akhir terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan jahe merah (*Zingiber officinale* Var Rubrum) dengan variasi konsentrasi dan kombinasi, ekstrak etanol kayu secang dan jahe merah konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, 10% dan kombinasi ekstrak etanol kayu secang dan jahe merah perbandingan 2:1, 1:2, 1:1.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan jahe merah (*Zingiber officinale* Var Rubrum) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dari penelitian ini yaitu simplisia kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan jahe merah (*Zingiber officinale* Var Rubrum), cara pembuatan ekstrak, media pertumbuhan bakteri, suhu inkubasi, lama inkubasi, metode pengujian antibakteri.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat maserasi (toples kaca), alat-alat gelas (Herma), oven, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pinset, lampu spiritus, gelas ukur, kain flanel, corong kaca (Herma), labu ukur (Iwaki), timbangan analitik (excellent), cawan petri, kertas hvs, *Muffle furnace* (Thermolyne), *moisture balance* (Ohaus), autoklaf, *rotary evaporator*, pisau, blender (Philips), pipet tetes, pipet ukur 1 mL (Iwaki), ayakan 40 mesh, LAF (*Laminar Air Flow*), batang pengaduk, jangka sorong (Mitutoyo), jarum ose, inkubator, Mc Farland Densitometer (MF-Unit), cawan penguap, waterbath, mikroskop dan *object glass*.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kayu secang dan rimpang jahe merah, aquadest, aquadest steril, etanol 70%, medium *Nutrient Agar* (NA), pereaksi Dragendorf, pereaksi Mayer, serbuk Mg (magnesium), HCl pekat (asam klorida), plastik wrap, aluminium foil, pereaksi FeCl₃ (besi klorida), NaCl 0,9%, H₂SO₄ (asam sulfat), K₂Cr₂O₇ (kalium dikromat), *cotton swab* steril, cat gram A (kristal violet), cat gram B (lugol iodin), cat gram C (alkohol aseton) dan cat gram D (larutan safranin), kertas cakram, disk *amoxicillin* 25 µg dan bakteri *Streptococcus mutans*.

2. Prosedur Penelitian

a. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman digunakan untuk memastikan bahwa tanaman yang akan diteliti adalah benar secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan jahe merah (*Zingiber officinale* Var Rubrum). Determinasi dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

b. Pemanenan Tanaman Secang dan Jahe Merah

Pemanenan secang dan jahe merah ini dipanen di daerah Desa Mluweh, Kecamatan Ungaran Timur, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Kriteria pemilihan kayu secang dan rimpang jahe merah yaitu bebas dari penyakit, serta segar. Setelah pemanenan kemudian dilakukan pembuatan simplisia.

c. Pembuatan Simplisia

Pembuatan simplisia secang (*Caesalpinia sappan* L) dan rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Var Rrubrum) dimulai dari sortasi basah yaitu kayu secang dan jahe merah yang masih segar dicuci dengan air yang mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, kemudian dilakukan perajangan pada kayu secang dan jahe merah, lalu dikeringkan menggunakan dengan sinar matahari secara tidak langsung dengan ditutupi kain hitam. Kayu secang dan rimpang jahe merah yang telah kering dihaluskan menggunakan

blender hingga menjadi serbuk halus kemudian diayak dengan ayakan No.40 mesh dan disimpan dalam wadah bersih tertutup rapat.

3. Standarisasi Simplisia Parameter non Spesifik

a. Uji Kadar Air Simplisia

Penentuan kadar air dikerjakan dengan cara cawan porselin kosong dimasukkan ke dalam oven bersuhu 105°C selama 1 jam. Kemudian, Cawan porselin didinginkan. Sebanyak 2 gram sampel dimasukkan ke dalam cawan porselin dan dimasukkan ke dalam oven bersuhu 105°C selama 3 jam. Kemudian, didinginkan, dan ditimbang kembali. Rumus perhitungan kadar air, sebagai berikut (Himawan *et al.*, 2018):

$$Kadar\ air\ (\%) = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

a = bobot sampel sebelum pemanasan (g)

b = bobot sampel setelah pemanasan (g)

b. Uji Kadar Abu Simplisia

Penetapan kadar abu dilakukan dengan cara sebanyak 2 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama dimasukkan dalam krus porselin, kemudian diratakan, lalu dipanaskan pada suhu 600°C selama 3 jam dengan alat *muffle furnace*, kemudian didinginkan dan ditimbang dan hitung nilai kadar abu dengan rumus berikut (Anggraeni, 2020):

$$Kadar\ abu\ (\%) = \frac{Berat\ abu}{Berat\ Sampel} \times 100\%$$

4. Pembuatan Ekstrak Sampel

Sampel serbuk simplisia kayu secang dan rimpang jahe merah diekstraksi menggunakan metode maserasi, dimulai dengan menimbang 200 gram sampel serbuk simplisia secang dan jahe merah dimasukkan ke dalam masing-masing wadah beserta pelarut etanol 70% sebanyak 1000 mL sampai serbuk terendam atau dengan perbandingan 1:5, tutup rapat (toples kaca) dan terhindar dari paparan sinar matahari. Maserasi dilakukan selama 7 hari pada ruangan yang terlindungi dari cahaya matahari dan sesekali dilakukan pengadukan. Proses ekstraksi dilakukan 5 hari menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 1000 mL dan remaserasi dilakukan selama 2 hari dengan menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 400 mL dengan perbandingan 1:2 (Ningsih *et al.*, 2018). Hasil maserasi disaring menggunakan kain flannel sehingga diperoleh filtrat berupa ekstrak etanol kayu secang dan jahe merah. Kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 50°C setelah itu uapkan di atas water bath hingga diperoleh ekstrak kental secang dan jahe merah.

5. Perhitungan Nilai Rendemen

Rendemen adalah perbandingan jumlah (kuantitas) ekstrak yang dihasilkan dari ekstraksi. Nilai rendemen adalah untuk mengetahui keefektifan suatu penelitian, semakin tinggi nilai rendemen yang didapat maka perlakuan yang ditetapkan pada suatu penelitian akan semakin efektif (Asti, 2015). Perhitungan nilai rendemen dilakukan pada masing-masing ekstrak etanol secang dan jahe merah. Perhitungan nilai rendemen

menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (gram)}}{\text{Berat sampel awal (gram)}} \times 100\%$$

6. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara masing-masing ekstrak etanol 70% kayu secang dan jahe merah. Masukkan masing-masing ekstrak kental ke dalam tabung reaksi yang berbeda kemudian ditambahkan dengan 5 tetes pereaksi asam sulfat (H_2SO_4) dan 2 mL pereaksi kalium dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Kemudian gojog dan amati perubahan warnanya.

7. Standarisasi Ekstrak Parameter Spesifik

a. Pengamatan Organoleptik

Pengamatan organoleptik dilakukan pada ekstrak etanol secang dan jahe merah dengan cara serbuk simplisia diambil sedikit, kemudian dilakukan uji organoleptis meliputi bentuk, bau, rasa dan warna (Evifania *et al.*, 2020).

b. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat pada ekstrak kayu secang dan jahe merah dilakukan secara kualitatif meliputi uji flavonoid, saponin, tanin dan alkaloid.

1) Uji Kualitatif

a) Uji Flavonoid

Ekstrak kayu secang dan jahe merah ditimbang sebanyak 0,5 mL kemudian tambahkan 2 mg bubuk

magnesium, lalu ditambahkan 3 tetes HCl pekat. Terbentuknya perubahan warna merah, kuning atau jingga menandakan reaksi positif terhadap flavonoid.

b) Uji Saponin

Ekstrak kayu secang dan jahe merah ditimbang sebanyak 0,5 mL kemudian tambahkan aquadest 10 mL lalu panaskan di penangas air. Larutan tersebut dikocok kuat. Hasil menunjukkan terbentuknya busa yang stabil dan tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida menunjukkan adanya saponin

c) Uji Tanin

Ekstrak kayu secang dan jahe merah ditimbang sebanyak 0,5 mL kemudian tambahkan beberapa tetes pereaksi FeCl_3 1%. Jika terjadi warna coklat kehijauan menunjukkan adanya tanin

d) Uji Alkaloid

Masing-masing ekstrak kayu secang dan jahe merah ditimbang sebanyak 0,5 mL. Larutan dibagi menjadi dua tabung. Tabung I ditambahkan 3 tetes pereaksi dragendorf, tabung II ditambahkan 3 tetes pereaksi mayer. Jika terdapat endapan jingga atau endapan putih kekuningan menunjukkan adanya kandungan alkaloid.

Mekanisme kerja senyawa saponin yaitu dengan cara mengganggu permeabilitas sel yang menyebabkan senyawa intraseluler seperti sitoplasma akan keluar dan mengakibatkan kematian sel. mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar (Pangestuti et al., 2017).

Mekanisme kerja senyawa tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk, sehingga dalam proses pembentukan dinding sel bakteri menjadi terhambat dan dapat menyebabkan sel bakteri mati (Noventi & Carolia, 2016).

Mekanisme kerja senyawa alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, maka dari itu dinding sel bakteri tidak dapat terbentuk utuh dan akan menyebabkan terjadinya kematian sel (Dwicahyani, T et al, 2018).

8. Identifikasi Bakteri

Pewarnaan gram pada bakteri dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan untuk efektivitas antibakteri merupakan bakteri *Streptococcus mutans*. Langkah pertama yang dilakukan adalah

membersihkan *object glass* menggunakan alkohol 70% kemudian dikeringkan, lalu ambil biakan bakteri menggunakan jarum ose steril dan goreskan secara merata di atas *object glass*, kemudian lakukan fiksasi dengan cara melewatkan *object glass* yang sudah di goresi bakteri di atas api bunsen hingga mengering. Pada *object glass* yang telah mengering kemudian diberi zat warna kristal violet lalu didiamkan selama 1 menit, kemudian bersihkan menggunakan aquadest dan keringkan dengan tissu. Tahap kedua, beri 1-2 tetes larutan lugol didiamkan selama 1 menit, kemudian bersihkan menggunakan aquadest lalu diamkan hingga kering. Tahap ketiga, beri *object glass* yang sudah kering menggunakan alkohol 70% didiamkan selama 15 detik kemudian bersihkan menggunakan aquadest. Tahap terakhir, beri 1 tetes larutan safranin lalu didiamkan selama 1 menit kemudian bersihkan menggunakan aquadest dan diamkan hingga kering. Amati hasil pewarnaan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100x (Arini, 2017).

9. Sterilisasi Alat

Langkah pertama dilakukan pencucian terlebih dahulu alat yang digunakan hingga bersih kemudian dikeringkan. Sterilisasi alat dilakukan dengan 2 cara yaitu sterilisasi panas kering untuk alat-alat berupa kaca dan sterilisasi panas basah untuk alat non kaca. Alat-alat kaca dibungkus terlebih dahulu menggunakan kertas kemudian disterilkan dengan panas kering menggunakan oven pada suhu 170°C selama 2 jam, sedangkan pada sterilisasi panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15

menit untuk alat non kaca. Alat-alat lain seperti jarum ose disterilisasi dengan cara dipanaskan di atas api lampu spiritus sebelum digunakan (Sari *et al.* 2013).

10. Pembuatan Media

a. Pembuatan Media NA

Nutrien Agar (NA) sebanyak 5 gram lalu masukan kedalam erlenmeyer kemudian tambahkan aquadest sebanyak 250 mL diaduk hingga homogen dilanjutkan dengan pemanasan dan pengadukan hingga tidak tersisa kristal. Lakukan sterilisasi larutan NA menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan hasil larutan NA dan tuang kedalam cawan petri sebanyak 15 mL pada ruangan LAF dan biarkan larutan NA hingga menjadi padat di dalam ruangan LAF steril (Qomar *et al.*, 2018).

11. Inokulasi Bakteri pada Media Agar Miring

Ambil sebanyak 1 ose bakteri *Streptococcus mutans* dari biakan murni kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada medium Nutrient Agar (NA) miring secara zig-zag dari bawah sampai atas, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Kurama *et al.*, 2020).

12. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara diambil sebanyak 3 ose bakteri *Streptococcus mutans* dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCl fisiologi 0,9%, lalu tabung reaksi digojog sampai homogen menggunakan alat vortex, setelah itu dicek

menggunakan larutan Mc Farland. Jika biakan bakteri *Streptococcus mutans* belum memenuhi, maka ditambahkan bakteri dengan jarum ose hingga mencapai kekeruhan yang maksimal (Nurina *et al.*, 2014).

13. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Ekstrak Kayu Secang dan Jahe Merah

Pembuatan konsentrasi larutan uji ekstrak secang dan jahe merah dilakukan menggunakan lima konsentrasi uji yaitu 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%. Langkah pertama pembuatan larutan stok terlebih dahulu dengan jumlah 1000 ppm, kemudian dilanjutkan dengan pengenceran larutan konsentrasi. Cara pembuatan larutan konsentrasi yaitu dengan menimbang ekstrak dengan rumus (Maulana *et al.*, 2021).

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

Keterangan:

V1 = Konsentrasi awal

C1 = Volume yang diperlukan

V2 = Konsentrasi yang akan dibuat

C2 = Volume yang akan dibuat

14. Pembuatan Larutan Uji Kontrol Negatif dan Kontrol Positif

Pembuatan larutan uji kontrol negatif menggunakan aquadest steril.

Sedangkan pada larutan uji kontrol positif menggunakan disk *Amoxicillin* 25 µg (Lusi, 2016).

15. Perlakuan Pengujian

Uji efektivitas antibakteri dari ekstrak kayu secang dan jahe merah dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram. Persiapan alat dan bahan dimulai dari penyiapan media NA yang sudah padat dan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*. Media agar pada cawan petri yang telah

memadat kemudian digoreskan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* secara merata di permukaan NA menggunakan metode *spread plate* dengan kapas lidi steril.

Tahap selanjutnya adalah merendam paper disk pada masing-masing ekstrak tunggal secang dan jahe merah pada variasi konsentrasi 0,002%, 0,004%, 0,006%, 0,008% dan 01%, ekstrak secang dan jahe merah yang digunakan pada pengujian kombinasi yaitu pada konsentrasi dengan zona hambat optimal, pada kombinasi yaitu dengan perbandingan kombinasi 2:1, 1:2 dan 1:1, kontrol positif dan kontrol negatif selama 15 menit (Agung Rizky. T *et al*, 2018). Kemudian paper disk tersebut diletakkan di atas media agar yang telah digoresi bakteri *Streptococcus mutans*, untuk pengujian tunggal ekstrak kayu secang setiap cawan petri berisi 5 konsentrasi uji dan 5 konsentrasi uji ekstrak jahe merah dengan pengulangan sebanyak 3 kali setiap pengujian, adapun untuk pengujian kombinasi ekstrak kayu secang dan jahe merah setiap cawan petri berisi 5 variasi uji dimana yaitu kombinasi 2:1, 1:2, 1:1, kontrol positif dan kontrol negatif dengan pengulangan sebanyak 3 kali setiap pengujian, kemudian tutup cawan petri, setelah itu sterilkan sisi cawan petri diatas api bunsen dengan memutar-mutar agar cawan petri lebih steril. Tutup cawan petri menggunakan plastik wrap dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam dengan posisi tutup cawan petri terbalik (Ugha *et al.*, 2019).

16. Pengamatan Hasil Efektivitas Zona Hambat Antibakteri

Pengamatan dilakukan setelah 1x24 jam masa inkubasi. Daerah

bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lainnya yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat (Lusi, 2016).

Langkah pengamatan antibakteri adalah sebagai berikut:

- a. Meletakkan cawan petri secara berurutan di atas meja sesuai dengan perlakuannya
- b. Meletakkan cawan petri secara terbalik dan tutup cawan petri tidak terbuka.
- c. Mengukur diameter zona hambat yang muncul pada masing masing perlakuan dengan menggunakan jangka sorong menggunakan satuan millimeter. Diameter zona hambat diukur dengan rumus sebagai berikut:

$$L = \frac{(D1-D2) + (D3-D2)}{2}$$

Keterangan:

L = Luas zona hambat

D1 = Diameter zona hambat vertikal

D2 = Diameter paper disk

D3 = Diameter zona hambat horizontal

G. Analisis Data

Hasil data yang diperoleh dari uji efektivitas ekstrak kayu secang dan jahe merah dianalisis menggunakan uji statistik deskriptif program SPSS yaitu proses melakukan analisis data dengan memberikan ringkasan yang mudah dipahami. Data yang diperoleh dari uji efektivitas antibakteri ekstrak kayu secang dan jahe merah pada masing-masing pelarut kemudian dianalisis menggunakan program SPSS dan didapatkan hasil sebagai berikut: Setelah

terbentuk zona bening di sekitar cakram, ditentukan diameter zona hambat bakteri. Pengukuran diameter zona hambat bakteri memberikan nilai zona hambat bakteri. Langkah pertama yakni melakukan uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis terdistribusi normal atau tidak (Anderha & Maskar, 2021).

Uji normalitas dalam penelitian ini menggunakan uji Shapiro-Wilk dikarenakan data yang digunakan kurang dari 50 yaitu 3 kali replikasi dengan taraf uji signifikansi 5% atau 0,05 (Fiqih Sabilillah *et al.*, 2016).

Bila signifikansi pada p-value hasilnya 5% atau sama dengan 0,05 maka H_0 diterima (Gaspersz & Salamor, 2021). Jika pada pengujian parametrik normalitas didapatkan hasil yang tidak normal maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu Kolmogorov-Smirnov dengan taraf signifikan uji 5% atau 0,05 dan apabila nilai p-value $<0,05$ maka H_0 ditolak (Quraisy, 2020).

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data yang digunakan dalam analisis telah homogen atau tidak. Hasil data yang telah terdistribusi normal dan homogen selanjutnya diuji One Way Anova. Jika nilai signifikan yang didapatkan $>0,05$ maka menerima H_0 dan menolak H_1 (Rojihah *et al.*, 2015).