

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode maserasi. Metode maserasi dipilih karena metode ini merupakan metode yang sederhana. Pengekstrakan simplisia dilakukan dengan cara merendam dengan pelarut beberapa kali pada temperatur ruangan, sehingga metode ekstraksi ini dapat menarik zat-zat fitokimia yang tahan pemanasan maupun tidak tahan pemanasan (Darumurti, 2013). Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi adalah etanol 96% karena pelarut etanol mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semi polar, maupun non polar yang terkandung pada kayu secang (Arifin *et al.*, 2006). Selain itu, ekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% lebih menghasilkan rendemen tertinggi daripada dengan pelarut etanol 70%, 80%, dan 95% (Senja *et al.*, 2014).

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *True Experimental – Post Test only Control Group Design* dengan metode difusi cakram untuk mengetahui diameter zona hambat ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) terhadap *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian ini isolat bakteri *S. aureus* yang digunakan berjumlah 1 isolat dan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum bakteri digunakan dalam penelitian, dilakukan tes identifikasi bakteri untuk memastikan bahwa bakteri yang diuji adalah bakteri *S. aureus*. Tes identifikasi bakteri pada penelitian ini meliputi pewarnaan Gram, tes katalase, dan tes koagulase (Warsa, 1993).

Pada pewarnaan Gram, gambaran sel *S. aureus* berbentuk bulat terlihat sendiri, berpasangan, dan menggerombol serta tercat berwarna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri yang diuji merupakan bakteri Gram positif. Terdapat beberapa teori yang menjelaskan terbentuknya warna ungu pada bakteri Gram positif. Teori Salton menjelaskan bahwa bakteri Gram positif mengalami denaturasi protein pada dinding selnya oleh pencucian dengan alkohol. Protein akan berubah menjadi keras dan membeku, pori-pori mengecil, sehingga kompleks ungu kristal-iodium dipertahankan dan sel kuman akan tetap berwarna ungu. Sedangkan menurut teori permeabilitas dinding sel, menjelaskan bahwa bakteri Gram positif mempunyai susunan dinding sel yang kompak dengan lapisan peptidoglikan yang terdiri dari 30 lapisan. Sehingga menyebabkan permeabilitas kurang dan kompleks ungu kristal iodium tidak dapat keluar (Warsa, 1993).

Tes katalase digunakan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri yang diuji dan untuk membedakan dengan genus streptokokus. Bakteri katalase negatif seperti genus Steptokokus tidak dapat memecah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  sehingga tidak dapat menghasilkan gelembung-gelembung udara. Sedangkan bakteri katalase positif akan memecah  $H_2O_2$  yang bersifat racun terhadap sel mikroba di keadaan aerobik dan akan menghasilkan gelembung oksigen. Persamaan reaksi antara enzim katalase dan  $H_2O_2$  dapat diuraikan sebagai berikut  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$  (Hidayat dan Alhadi, 2012).

Pada tes koagulase pada penelitian ini menggunakan lateks test. Tes ini untuk membedakan antara *Staphylococcus aureus* koagulase positif dan negatif. *S. aureus* koagulase positif memiliki lapisan sel yang banyak mengandung protein A dan dapat berikatan dengan immunoglobulin G (IgG). Tes lateks

mengandung partikel leteks biru yang telah dilapisi dengan fibrinogen manusia dan IgG. Pada pencampuran antara reagen lateks dengan koloni *S. aureus* yang memiliki faktor penggumpal atau adanya protein A akan berikatan sehingga akan membentuk gumpalan putih dengan partikel lateks (Essers dan Radebold, 1980). Berdasarkan hasil dari tes identifikasi tersebut, maka dapat ditentukan dan dibuktikan bahwa bakteri yang diteliti merupakan *S. aureus* koagulase positif.

Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol kayu secang terhadap *S. aureus* dengan metode difusi cakram. Metode difusi cakram dipilih karena mudah, sederhana, dan telah digunakan secara luas. Namun, metode difusi cakram ini tidak dapat menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Untuk mengetahui KHM dan KBM dapat menggunakan metode dilusi tabung dan dilusi agar.

Setelah identifikasi bakteri, langkah pertama uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol kayu secang adalah dengan cara membuat suspensi *S. aureus* sebesar  $10^8$ CFU/ml dan di *streaking* diatas media agar Muller Hinton (MH). Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 0%. Kemudian memasukkan *blank disc* kedalam ekstrak dengan konsentrasi tersebut. Pada penelitian pendahuluan diketahui kapasitas *blank disc* sebesar 20 mikroliter. Setelah merendam *blank disc* selama 30 menit, tiriskan *blank disc* pada cawan petri steril, kemudian letakkan di atas media agar Muller Hinton yang telah di *streaking* oleh *S. aureus*. Masukkan plate dalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Ukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm). Zona hambat yang diukur adalah dari tepi zona bening termasuk dengan diameter kertas cakram. Diameter kertas cakram diketahui sebesar 6 mm.

Dari hasil pengukuran zona hambat dapat diketahui bahwa diameter zona hambat terkecil terbentuk pada konsentrasi 6,25% dengan diameter zona hambat sebesar 7,06 mm. Sedangkan pada konsentrasi 3,125% dan 0% tidak terbentuk zona hambat. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol kayu secang maka semakin luas diameter zona hambat pertumbuhan bakteri. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol kayu secang dalam menghambat *S.aureus*. Hasil penelitian di atas serupa dengan penelitian Srinivasan *et al.* (2012), dengan metode difusi cakram dengan konsentrasi ekstrak etanol kayu secang sebesar 5 mg/disk pada bakteri dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml dapat menghasilkan zona hambat sebesar  $24.0 \pm 2.1$  mm pada *Salmonella typhi*,  $21.0 \pm 1,5$  mm pada *Enterobacter aerogens*,  $20 \pm 2.2$  mm pada *Candida albicans*, dan  $15 \pm 1,4$  mm pada *Escherichia coli*. Berdasarkan data penelitian tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak kayu secang efektif menghambat *S. aureus* serta dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif, Gram negatif, dan jamur.

Efek antibakteri ekstrak etanol kayu secang terhadap *S. aureus* dapat terjadi karena aktivitas zat-zat aktif yang terkandung dalam secang yang mempunyai mekanisme antibakteri. Berdasarkan uji fitokimia didapatkan hasil ekstrak etanol kayu secang yang digunakan dalam penelitian ini mengandung senyawa saponin, tanin, flavonoid, dan tidak mengandung senyawa alkaloid. Hasil tersebut kurang sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Senthilkumar *et al.* (2011), bahwa ekstrak etanol kayu secang mengandung senyawa saponin, tanin, flavonoid, dan alkaloid.

Mekanisme kerja antibakteri secara spesifik pada zat-zat tersebut adalah, saponin bekerja dengan cara mengganggu permeabilitas dinding sel bakteri dengan cara menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan

kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Senyawa saponin akan berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan, lalu mengikat membran sitoplasma dan mengurangi kestabilan itu. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel (Ngajow *et al.*, 2013). Senyawa tanin menghambat bakteri dengan cara menonaktifkan enzim transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak terbentuk (Cowan, 1999). Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Tanin dalam konsentrasi rendah mampu menghambat pertumbuhan kuman, sedangkan pada konsentrasi tinggi, tanin bekerja sebagai antimikroba dengan cara mengkoagulasi kuman (Poeloengan dan Praptiwi, 2010). Flavonoid bekerja dengan cara mengganggu dari membran mikroba. Rusaknya membran mikroba akan menyebabkan metabolit penting dalam sel akan keluar, sehingga dapat menyebabkan kematian sel bakteri (Kumar dan Pandey, 2013).

Berdasarkan penelitian Jeong *et al.* (2008), selain sebagai antibakteri secang juga dapat digunakan sebagai antiinflamasi dengan cara menghambat produksi IL-6 sehingga dapat menghambat inflamasi akibat keputihan yang disebabkan oleh bakteri aerobik.

Dari hasil pengukuran diameter zona hambat *S. aureus*, kemudian dilakukan analisis data menggunakan uji One Way Anova dan uji Korelasi-regresi. Uji analisis One Way Anova dipilih karena pada penelitian ini terdiri dari >2 kelompok data yang tidak berpasangan (Dahlan, 2008). Hasil uji One Way Anova didapatkan hasil  $p=0.000$  ( $p < 0.05$ ), hal ini menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna atau signifikan pada perubahan konsentrasi ekstrak etanol kayu secang terhadap diameter zona hambat *S. aureus*. Berdasarkan uji

Tukey HSD, dari 7 kelompok konsentrasi dikelompokkan dalam 5 subset, pada subset 1 diisi oleh konsentrasi 0%, 3,125%, dan 6,25%. Hal tersebut menandakan pada konsentrasi 0%, 3,125%, dan 6,25% tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Sedangkan pada konsentrasi 12,5% terdapat perbedaan yang bermakna dari konsentrasi yang lain. Jadi, berdasarkan uji tersebut dapat ditentukan konsentrasi minimal ekstrak etanol kayu secang dalam menghambat bakteri *S. aureus* yakni pada konsentrasi 12,5%.

Selanjutnya data dianalisis dengan uji korelasi-regresi. Uji korelasi-regresi dipilih karena pada penelitian ini terdiri dari dua variabel yaitu variabel tergantung dan variabel bebas. Hasil uji korelasi-regresi menunjukkan bahwa terdapat hubungan bermakna antara pemberian ekstrak etanol kayu secang terhadap diameter zona hambat pertumbuhan *S. aureus*.

Pada penelitian ini, sebanyak 23,3 % hasil penelitian dipengaruhi oleh faktor lain yang tidak diteliti, misalnya lama penyimpanan ekstrak, konsentrasi bakteri, nilai pH medium, dan keakuratan penimbangan dalam pembuatan larutan ekstrak. Menurut Harnita dan Radji (2008), diameter zona hambat yang terbentuk dipengaruhi oleh kepadatan atau viskositas media, kecepatan difusi ekstrak, konsentrasi ekstrak pada cakram, dan sensitivitas bakteri.

Konsentrasi bakteri pada permukaan medium mempengaruhi diameter zona hambat, semakin tinggi konsentrasi mikroba maka zona hambat akan semakin kecil. Selain itu, semakin tebal medium pada cawan petri maka zona hambat yang terbentuk semakin kecil. Nilai pH dari medium juga mempengaruhi zona hambat, karena beberapa bakteri dapat tumbuh dengan baik pada kondisi asam, kondisi alkali/basa, netral. Nilai pH optimal untuk pertumbuhan *S. aureus* adalah 7.4 (Greenwood *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 2010).

Berdasarkan uraian diatas, dapat diketahui bahwa ekstrak etanol kayu secang dapat digunakan sebagai obat alternatif yang diakibatkan oleh infeksi bakteri *S.aureus*. Namun, masih sangat dini untuk dapat diterapkan secara klinis pada masyarakat. Hal ini dikarenakan pada penelitian ini tidak dapat menentukan KHM dan KBM dari ekstrak, sebagai dasar untuk menentukan batas dosis minimal ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pada penelitian lebih lanjut diharapkan adanya pengujian ekstrak etanol kayu secang pada hewan coba (*in vivo*) sebelum diaplikasikan secara klinis untuk mengetahui dosis terapeutik, dosis toksik, dan efek samping dari ekstrak.

Penelitian ini memiliki keterbatasan yaitu hanya menggunakan satu isolat dari bakteri *S.aureus*. Hal ini dikarenakan keterbatasan waktu dan biaya dalam penyelesaian penelitian, sehingga diharapkan pada penelitian selanjutnya menggunakan isolat bakteri yang berbeda dengan jumlah isolat yang lebih banyak agar dapat di generalisasikan.