

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri infusa daun Buas-buas (*Premna cordifolia* Linn.) terhadap bakteri *Propionibacterium acne* dengan metode difusi sumuran.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian Data

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2022 Sampai Desember 2023 Bertempat di Laboratorium Steril, Laboratorium Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Borneo Lestari Banjarbaru.

3.3. Populasi, Sampel dan Teknik Pengambilan Data

3.3.1 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah daun Buas-buas (*Premna cordifolia* Linn.) yang didapat dari Tahura Sultan Adam Mandi Angin di Kota Banjarbaru, Provinsi Kalimantan Selatan.

Sampel pada penelitian ini yang digunakan berupa bagian daun Buas-buas (*Premna cordifolia* Linn.) yang segar yang berwarna hijau masih ada dipohon.

3.3.2. Teknik Pengumpulan Data

Data yang didapat dari penelitian ini berupa perhitungan zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acne* dengan

menggunakan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%. Masing-masing data dicatat dalam tabel dan hitungan besaran zona hambat dari masing-masing perlakuan untuk uji aktivitas antibakteri pada setiap pengulangan perlakuan.

Dalam penelitian dilakukan pengulangan data sebanyak 4 kali dalam perlakuan diperoleh dari hasil perhitungan menggunakan rumus Federer.

$$\text{Rumus : } (t-1) (r-1) \geq 15$$

$$(t-1) (r-1) \geq 15$$

$$(7-1) (r-1) \geq 15$$

$$6 (r-1) \geq 15$$

$$6r - 6 \geq 15$$

$$6r \geq 15 + 6$$

$$6r \geq 21$$

$$r \geq \frac{21}{6}$$

$$r \geq 4$$

Keterangan :

t = banyak nya perlakuan

r = jumlah replikasi atau pengulangan

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi infusa daun Buas-buas (*Premna cordifolia* Linn.) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%.

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter daya hambat dari daun Buas-buas (*Premna cordifolia* Linn.) terhadap bakteri *Propionibacterium acne*.

3.5. Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah aluminium foil (*Klin Pak*[®]), *autoklaf*, bunsen, cawan petri steril (*Onemed*[®]), cawan porselin, corong pisah (*Pyrex*[®]), cotton swab steril (*Onemed*[®]), erlenmeyer (*Pyrex*[®]), gelas beaker (*Pyrex*[®]), gelas ukur (*Pyrex*[®]), jangka sorong, kapas, kertas saring, labu ukur (*Pyrex*[®]), mikropipet (*Dragon Lab*[®]), ose, oven (*Memmert*[®]), pinset, pipet tetes, *hot plate* (*Thermo*[®]), incubator (*Memmert*[®]), pipet ukur (*Pyrex*[®]), *Laminar Air Flo*, lemari pendingin tabung reaksi (*Pyrex*[®]), dan timbangan analitik (*Fujitsu*[®]).

3.5.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *aquadest* (*Onelab*[®]), asam klorida pekat (HCl) (*Merck*[®]), asam sulfat

pekat (H_2SO_4) (*Smart-Lab*[®]), BaCl_2 (*Pudak Scientific*[®]), bakteri *Propionibacterium acnes*, larutan besi (III) Klorida (FeCl_3) (*Merck*[®]), doksisisiklin 30 μg /disk (*Oxoid*[®]), infusa daun Buas-buas (*Premna cordifolia L.*), gelatin (*Sigma-aldrich*[®]), kloroform (*Smart lab*[®]), media *Muller Hinton Agar* (*Oxoid*[®]), media *Tryptic Soy Agar* (*Himedia*[®]), natrium chloride (NaCl 0,9%) (*Merck*[®]), pereaksi *dragendorff* (*Merck*[®]), pereaksi *mayer* (*Merck*[®]), pereaksi *wagner* (*Merck*[®]).

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pengambilan Tumbuhan Buas-Buas

Tumbuhan Buas-buas didapatkan dari daerah Tahura Sultan Adam Mandi Angin di Kota Banjarbaru Provinsi Kalimantan Selatan. Bagian yang digunakan yaitu bagian daun segar dari tumbuhan Buas-buas. Daun yang diambil adalah daun keempat dan kelima dari ujung, karena urutan daun keempat dan kelima lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri (Ningrum., 2018).

3.6.2. Determinasi

Tanaman Buas-buas (*Premna cordifolia* Linn.) dilakukan Determinasi di Laboratorium dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Kota Banjarbaru Provinsi Kalimantan Selatan. Determinasi tanaman Buas-buas dengan memberikan sampel dari mulai daun, batang, bunga, dan buah.

3.6.3. Pembuatan Simplisia Daun Buas-buas (*Premna cordifolia* Linn.)

Tanaman Buas-buas (*Premna cordifolia* Linn.) yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri infusa adalah daun yang segar yaitu daun yang sehat, masih muda dan tidak terlalu tua. Daun yang telah diambil, dipilih kemudian dipisahkan dari batang dan kotoran lainnya. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan air mengalir sampai tidak ada kotoran yang menempel. Kemudian daun dikeringkan dengan cara dijemur dibawah matahari dengan ditutupi dengan kain hitam, dijemur hingga daun setengah kering atau daun layu dengan warna masih segar. Setelah daun kering dilakukan sortasi kering kemudian dipotong-potong kecil agar simplisia mudah untuk dibuat infusa dan mempermudah kandungan sari keluar dari daun Buas-buas tersebut. Kemudian simplisia disimpan di wadah tertutup rapat dan dihitung rendemen simplisianya (Kurniati, 2013).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot simplisia}}{\text{Bobot daun segar}} \times 100 \%$$

3.6.4. Pembuatan Infusa Daun Buas-Buas (*Premna cordifolia* Linn.)

Infusa daun Buas-buas yang telah jadi simplisia di timbang sebanyak 30 gram, kemudian panaskan *aqudest* sebanyak 60 mL diatas *hot plate* dengan suhu 90°C yang diukur dengan menggunakan *thermometer* dengan waktu 15 menit, sambil diaduk hingga sari daun Buas-buas keluar. Setelah dingin kemudian

disaring dengan menggunakan kertas saring, untuk mencukupi kekurangan air tambahkan *aquades* yang mendidih hingga mencapai 60 ml (Rheza, 2015). Setelah mendapatkan konsentrasi infus 50% kemudian dilakukan pengenceran dengan menggunakan labu ukur 5 mL, dengan masing-masing konsentrasi 10%, 20%, 30% dan 40% yang diencerkan dengan *aquadest*.

3.6.5. Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Larutan uji diambil sebanyak 1-2 mL kemudian ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 ml *aquadest*, dipanaskan di atas tangas air selama 2 menit lalu didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk uji alkaloid. Diambil 3 tabung reaksi masing-masing dimasukkan tabung reaksi ditambakahan 2 tetes pereaksi *mayer*, *wagner*, dan *dragendorff*. Alkaloid positif jika terjadi endapan. Bila sedikitnya 2 dari 3 pereaksi di atas positif maka sampel dinyatakan mengandung alkaloid, yaitu terbentuknya endapan putih atau kuning (Supriningrum dkk, 2017).

b. Uji Flavonoid

Larutan uji diambil sebanyak 1-2 mL kemudian dimasukan ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan sedikit serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida pekat. Apabila positif flavonoid ditandai dengan perubahan terbentuknya warna

merah, kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol (Oktavia dkk., 2020).

c. Uji Terpenoid-Steroid

Larutan uji diambil sebanyak 1-2 mL tambahkan kloroform kemudian ditambahkan dengan 1 mL pereaksi Liebermann-Burchard (asam asetat anhidrat dan larutan H₂SO₄ pekat). Warna berubah menjadi merah yang menunjukkan adanya senyawa terpenoid dan warna berubah menjadi biru yang menunjukkan adanya senyawa steroid (Tohomi dkk., 2014).

d. Uji Saponin

Larutan uji sebanyak 1-2 mL dimasukkan dalam tabung reaksi. Tambahkan dengan aquadest sebanyak 10 mL, kemudian dikocok kuat selama 30 detik. Tetesi dengan HCl 2N. hasil positif apabila terjadi buih yang stabil (Oktavia dkk., 2020).

e. Uji Tanin

Larutan uji sebanyak 1-2 mL kemudian ditambah larutan gelatin 1% sebanyak 1 ml, jika timbul endapan menunjukkan adanya tanin (Damaharyuningtyas & Dermawan, 2021).

f. Uji Fenol

Larutan uji sebanyak 1-2 mL kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak 10 mL lalu dihomogenkan. Setelah itu larutan uji ditambahkan 2-3 tetes FeCl₃ 10%. Positif fenol ditandai terbetuknya perubahan warna biru tua, biru kehitaman, atau hitam kehijauan (Simaremare, 2014).

3.6.6. Uji Aktivitas Antibakteri Dari Infusa Daun Buas-buas Terhadap *Propionibacterium acne*

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi merupakan kewajiban paling utama yang dilakukan dalam pengujian aktivitas antibakteri tujuannya untuk menghilangkan mikroorganisme pada alat dan bahan dalam penelitian. Sterilisasi dilakukan menggunakan metode panas basah dan panas kering. Alat dan bahan harus dilakukan sterilisasi terlebih dahulu sebelum melakukan pengujian aktivitas antibakteri. Sterilisasi alat dengan menggunakan metode panas kering menggunakan oven dengan suhu 170°C dipertahankan selama 1 jam (untuk alat yang berbahan kaca). Sterilisasi bahan dengan menggunakan metode sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Laminar Air Flow (LAF) dibersihkan menggunakan alkohol 70% dan pengujian ini dilakukan dengan cara aseptis pada Laminar Air Flow (LAF) (Rukmi., dkk 2015). Pinset dan jarum ose disterilkan dengan cara pemijaran dengan melewati pada nyala api selama 15-20 menit (Indriani., dkk 2019).

b. Pembuatan Media *Tryptic Soy Agar* (TSA)

Pembuatan media TSA memerlukan 0,4 gram media agar yang dilarutkan dengan 10 mL aquades dalam tabung Erlenmeyer kemudian dipanaskan sampai mendidih diatas *hotplate* sambil sesekali diaduk. Selanjutnya erlenmeyer ditutup

dengan kasa steril dan kapas untuk disterilisasi dengan *autoklaf* dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C dipertahankan selama 15 menit, selanjutnya dituangkan kedalam tabung reaksi dan ditutup menggunakan kapas kemudian diletakan dengan posisi miring (Arfiandi & Tumbol, 2020).

c. Peremajaan Bakteri *Propionibacterium acnes* Menggunakan Media *Tryptic Soy Agar*

Peremajaan bakteri uji dengan cara kultur murni *Propionibacterium acnes* diinokulasikan sebanyak satu ose pada media *Tryptic Soy Agar* miring dalam tabung reaksi dengan cara digoreskan secara zig-zag, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Suhaimi dkk., 2019).

d. Pembuatan Larutan Standar Mc Farland 0,5

Pembuatan larutan standar Mc Farland 0,5 dengan cara mencampurkan larutan H₂SO₄ 1% dengan cara mengambil 1 ml larutan H₂SO₄ dilarutkan dalam 10 ml aquadest dan untuk membuat larutan BaCl₂ 1% di lakukan dengan cara menimbang 0,1 gram BaCl₂ dan di larutkan dalam 10 ml aquades. Pembuatan standar larutan MC Farland 0,5 di lakukan dengan cara mengambil 9,95 ml H₂SO₄ 1% dicampur dengan larutan BaCl₂ 1% 0,05 ml (Nurrosyidah dkk., 2021).

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Hasil peremajaan diambil menggunakan jarum sebanyak 2 ose, kemudian di encerkan dengan 2 ml NaCl 0,9% steril pada

tabung reaksi, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian dibandingkan kekeruhannya dengan larutan standar 0,5 Mc Farland (sama dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/MI) (Kurnia., dkk 2020).

f. Pembuatan Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)

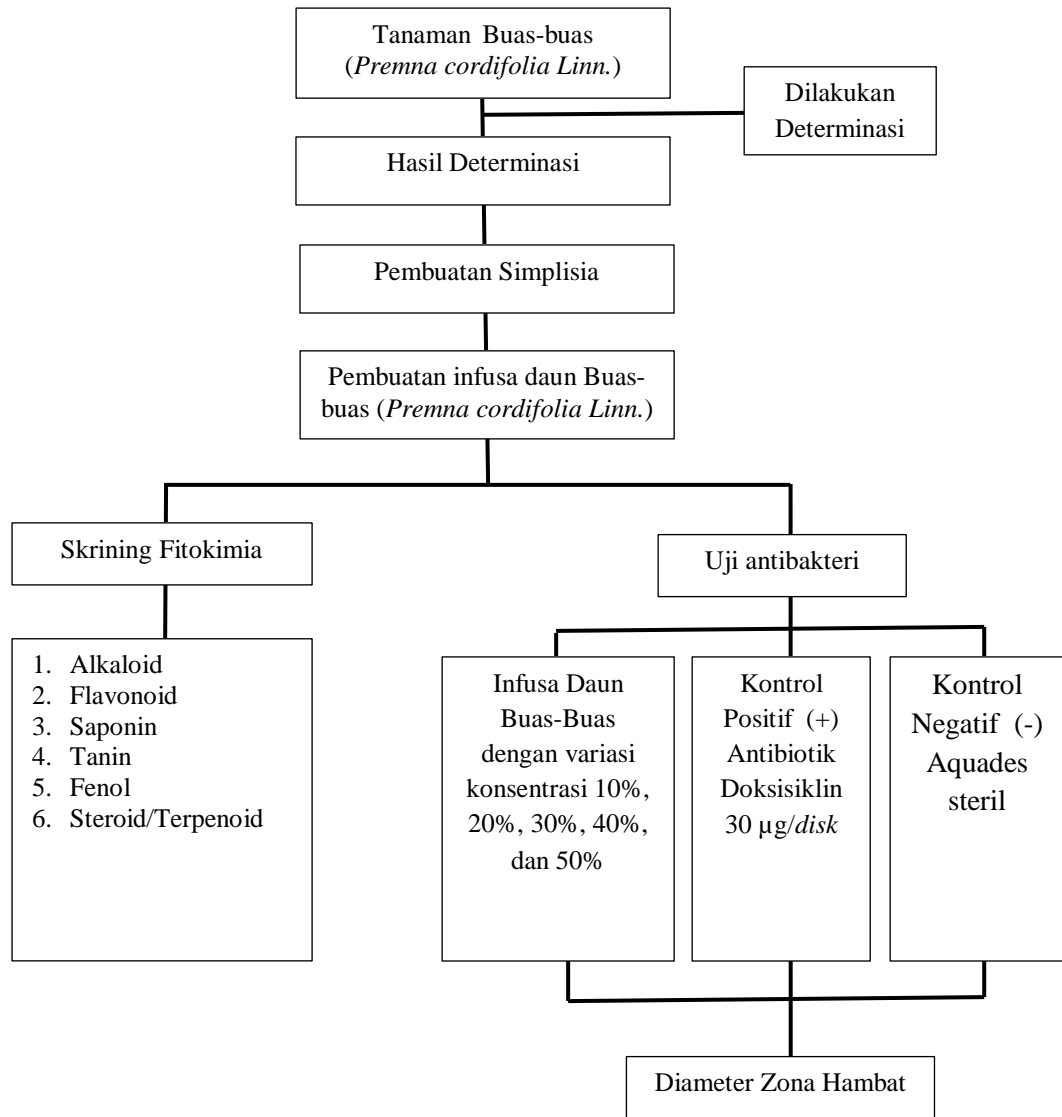
Media Mueller-Hinton Agar (MHA) ditimbang 38 gram larutan menggunakan 1 liter aquades lalu dipanaskan hingga mendidih. Disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dengan waktu selama 15 menit. Setelah steril tunggu hingga suhu MHA menjadi 40 °C lalu tuangkan pada cawan petri yang disterilkan. Media yang telah disterilkan dituang ke dalam cawan petri \pm 15 ml lalu dibiarkan memadat sebagai lapisan dasar. (Rahayu, 2019).

g. Pengujian Antibakteri Dengan Metode Sumuran

Pengujian antibakteri dengan menggunakan metode difusi agar dengan teknik sumuran, terlebih dahulu dibuat seri konsentrasai sampel yaitu konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%. Pada media MHA yang telah dibuat dan memadat setelah itu dipermukaan media diinokulasikan dengan suspensi bakteri *Propionibacterim acnes* dengan menggunakan *cotton swab*. Inokulasikan secara merata pada permukaan media kemudian diamkan beberapa menit hingga suspensi berdifusi dengan baik. Setelah itu dibuat lubang sumuran tiap cawan petri, dengan

masing-masing konsentrasi. Larutan sampel masing-masing diinjeksikan sebanyak 25 μ L ke lubang sumuran pada cawan petri kemudian dibiarkan selama 15-20 menit sampai ekstrak berdifusi merata. Selanjutnya cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Fitriyanti dkk., 2019). *Aquadest* sebagai kontrol negatif dan antibiotik doksisisiklin sebagai kontrol positif. Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur zona bening disekitar lubang sumuran menunjukkan aktivitas antibakteri dari ekstrak maupun antibiotik terhadap bakteri yang terbentuk menggunakan jangka sorong (Yusnida, 2021). Kemudian hasil pengukuran dilihat berdasarkan kategori hambatan pertumbuhan bakteri menurut klasifikasi (Lister, 2021).

3.7. Kerangka penelitian



Gambar 3. Kerangka Penelitian