

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan dan Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu eksperimental dengan melakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun kratom terhadap bakteri *P.acnes* dengan 4 konsentrasi yaitu 3%, 15%, 30%, dan 45%. Ekstrak daun kratom dimasukkan dalam media MHA, replikasi digunakan sebanyak empat kali. Dengan menggunakan kontrol positif Doksisisiklin 30 μ g/disk dan kontrol negatif menggunakan Na-CCM 0,5%.

Uji dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Berdasarkan rumus Federrer (Nabila, *et all.*, 2021)

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

Dimana n adalah jumlah minimal pengulangan dan t adalah jumlah kelompok.

Perhitungan jumlah pengulangan:

$$(n-1)(8-1) \geq 15$$

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 15 + 7$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq \frac{22}{7}$$

$$n \geq 3 \text{ pengulangan}$$

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Melakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun kratom, melakukan uji daya hambat terhadap bakteri *P.acnes* di laboratorium Bahan Alam dan laboratorium Mikrobiologi dan Parasitologi Universitas Borneo Lestari pada bulan Mei sampai Juni 2024.

3.3 Populasi dan sampel

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah kratom, tanaman yang diperoleh dari Barabai, Hulu Sungai Tengah.

3.3.2 Sampel

Sampel tanaman kratom yang digunakan adalah bagian daun kratom yang segar lalu dilakukan ekstraksi.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol daun kratom dalam berbagai tingkat konsentrasi.

Konsentrasi yang akan diuji coba adalah 3% 15%, 30% dan 45%. Menggunakan kontrol positif Doksisisiklin 30 μ g/disk, dan kontrol negatif Na-CMC 0,5%.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah daya hambat terhadap pertumbuhan *P.acnes* yang penelitiannya berdasarkan zona hambat pada media agar.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan sebagai pendukung penelitian diatas menggunakan alat sebagai berikut:

Gelas beaker, tabung reaksi, rak, lampu bunsen, inkubator, autoklaf, cawan petri, jarum ose, tabung erlenmayer, pipet, Jangka sorong, penggaris, *yellow tip*, bejana maserasi, *Rotary evaporator*, timbangan analitik, cawan perselin, labu ukur, kaca objek, corong pisah, autoklaf, oven, dan *Waterbath*.

3.5.2 Bahan

Alat yang digunakan sebagai pendukung penelitian diatas menggunakan alat sebagai berikut:

Masker, *handsoun*, metanol, ekstrak daun kratom, *P. acnes*, Doksisisiklin 30µg/*disk*. Na CMC 0,5%, *MHA*, *aquadest*, Kristal violet, lugol, alkohol, safranin, dan minyak emersi.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Sampel daun kratom dilakukan Determinasi di Laboratorium dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

3.6.2 Pengambilan Dan Pengolahan Simplisia Daun Kratom

Tumbuhan kratom diperoleh dari daerah Barabai, Hulu Sungai Tengah yang diambil sebanyak 2 kg pada bulan Januari 2024. Tumbuhan kratom yang digunakan adalah bagian daun yang segar sebagai bahan untuk uji antibakteri.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman kratom yang diambil bagian daun yang segar, tanaman ini diperoleh dari Barabai, Hulu Sungai Tengah. Daun kratom diambil dan ditimbang sebanyak 2 kg (berat basah), lalu dilakukan sortasi basah kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan lalu setelah kering disortasi dan dipotong kecil-kecil (*blender*) sampai menjadi simplisia (Munawwarah, *et al.*, 2016).

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Kratom

Serbuk daun kratom ditimbang sebanyak 200 gram, kemudian dimaserasi dengan pelarut metanol dengan perbandingan 1:10 atau sebanyak 2 L selama 3 x 24 jam. Pemisahan residu dan

filtrat dilakukan setelah 3 x 24 jam dan ekstrak disaring dengan kertas saring. Filtrat diperoleh ditampung dan pekatkan dengan *rotary evaporator* dan dilanjutkan dengan penguapan dengan alat *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Munawwarah., 2016).

$$\% \text{Rendeman} = \frac{\text{Bobot total ekstrak}}{\text{Bobot total serbuk simplisia}} \times 100\%$$

3.6.4 Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan ekstrak sebanyak 0,5 gr kemudian ditambahkan kloroform sebanyak 2 mL, ammonia sebanyak 5 mL, kemudian selama 5 menit ditangas diatas penangas air sambil dikocok, didinginkan setelah itu disaring. Menambahkan 5 mL asam sulfat 2N setelah ditambahkan filtrat dikocok, kemudian mengambil lapisan atas dari filtrat dan membagi menjadi 3 bagian. Filtrat dipakai untuk uji alkaloid. Pada tabung I, ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer akan terbentuk endapan berwarna putih kekuningan (Umarudin., 2019). Pada tabung II, ditambahkan 2 tetes pereaksi *Wagner* akan terbentuk endapan berwarna coklat. Pada tabung III, ditambahkan 2 tetes perekasi *Dragendorff* akan terbentuk endapan berwarna jingga. Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau paling sedikit dua atau tiga percobaan diatas (Sofia, *et all.*, 2022).

b. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan menimbang ekstrak sebanyak 0,1 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 10 ml *aquadest* dipanaskan hingga mendidih, setelah itu disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Kemudian filtrat yang disaring ditambahkan magnesium (Mg) ditambahkan 1 ml asam klorid (HCl) dan ditambahkan 1 ml amil alkohol. Kemudian dikocok dengan kuat. Hasil uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Nugrahani, *et all.*, 2016).

a. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan menimbang ekstrak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 10 ml *aquadest* hangat. Campuran dikocok selama 10 detik. Lalu diamkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 1 tetes HCl 1%. Positif saponin ditandai dengan adanya busa yang stabil (Sofia, *et all.*, 2022).

b. Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan menimbang ekstrak sebanyak 0,5 g ditambahkan 20 ml air panas, lalu disaring dan

ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Hasil positif ditandai dengan warna coklat kehijauan (Putri & Lubis 2020).

c. **Uji Steroid/Triterpenoid**

Uji steroid dan terpenoid dilakukan dengan menimbang ekstrak sebanyak 0,5 g dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan kloroform 5 ml. selanjutnya ditambahkan pereaksi *Lieberman Burchad* (yang terdiri dari 1 ml asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat) hasil positif steroid ditunjukkan dengan warna hijau (Sari, , *et all.*, 2023). Dan positif triterpenoid ditunjukkan dengan warna merah keunguan (Habibi, *et all.*, 2018).

3.6.5 Pengujian Antibakteri *P.acnes*

a. **Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat yang disterilisasi dalam penelitian ini alat yang terbuat dari kaca dengan cara dicuci, dikeringkan, dibungkus dengan alumunium foil. Selanjutnya dimasukkan dalam oven selama 2 jam pada suhu 170°C . Untuk sterilisasi media yang dipertahankan selama 15 menit dalam autoklaf pada suhu 121°C . sedangkan jarum ose dan pinset dengan cara membakar ujung alat di atas api busen (Al azzah & Styawan., 2018).

b. Pembuatan Media *Nutrient Agar*

Media NA sebanyak 0,42 gr dilarutkan dalam 15 mL aquadest (28 gr / 1000 L) menggunakan erlenmyer, selanjutnya dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan *hotplate*. Sebanyak 5 mL dituangkan masing-masing pada dua tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil. Media disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dipertahankan selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama kurang lebih 30 menit sampai media memadat. Media agar miring digunakan untuk inokulum suspensi bakteri uji (Ngajow, *et all.*, 2013).

c. Peremajaan Bakteri Menggunakan Media *Nutrien Agar*

Bakteri uji diambil dengan menggunakan ose steril sebanyak satu ose dari kultur murninya. Kemudian diinokulasikan dalam media NA miring dengan cara goresan *zig-zag* lalu biarkan sampai memadat, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Mitika & Yanti., 2017).

d. Pewarnaan Gram

Metode pewarnaan gram digunakan untuk menentukan kebenaran bakteri yang digunakan. Dengan cara mengambil *aquadest* ditetaskan pada kaca objek kemudian ditambahkan 1

ose biakan sampel. Lalu difiksasi di atas api Bunsen. Tetesi pewarnaan dengan Kristal violet sebanyak 3 tetes dan biarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan aquadest dan selanjutnya tetesi dengan lugol sebanyak 3 tetes, biarkan selama 1 menit dan kembali dicuci dengan *aquadest*. Selanjutnya ditetesi dengan alkohol 96% sebanyak 3 tetes biarkan selama 20 detik kemudian cuci lagi dengan *aquadest* dan tambahkan safranin biarkan selama 30 detik kemudian cuci lagi menggunakan *aquadest*. Tahap selanjutnya dikeringkan dan ditambahkan minyak emersi dan amati dibawah mikroskop. Bila hasil pewarnaan diperoleh bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut adalah gram negatif. Sedangkan bila diperoleh warna bakteri tersebut ungu maka bakteri tersebut adalah bakteri gram positif (Muthmainnah., 2018).

e. Pembuatan Larutan Standar *Mc.Farland*

Larutan standar *Mc.Farland* digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair yang digunakan untuk pengujian daya antibakteri. Kekeruhan dari larutan *Mc.Farland* 0,5 sebanding dengan jumlah koloni sel sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Larutan *Mc.Farland* dibuat dengan memipet barium klorida (BaCl_2) 1% sebanyak 0,05 ml yang ditambahkan 9,95 ml larutan asam sulfat (H_2SO_4) 1%

kedalam tabung reaksi tutup dan homogenkan hingga tercampur rata. Kemudian kocok sampai berbentuk larutan yang keruh, dan simpan di tempat yang terhindar dari cahaya matahari langsung (Handayani, *et all.*, 2016).

f. Pembuatan Suspensi Bakteri

Hasil peremajaan biakan *P. acnes* diambil dengan jarum ose, dimasukan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCL 0,9%. Selanjutnya kekeruhan dibandingkan dengan larutan standar Mc.Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) jika kekeruhan suspensi telah sama dengan kekeruhan Mc.Farland berarti suspensi mengandung $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, apabila suspensi lebih keruh dari pada standart Mc.Farland perlu ditambahkan NaCL 0,9%. Sedikit demi sedikit hingga kekeruhan yang diinginkan sesuai dengan standart Mc.Farland, setelah sama maka suspensi dapat digunakan sebagai bakteri uji (Lajiri & Lister., 2019).

g. Pembuatan Suspensi Na-CMC 0,5%

Ditimbang Na-CMC sebanyak 0,5 gr kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquades, aduk hingga homogen, Na-CMC sebagai kontrol negatif (Mitika & Yanti., 2017).

h. Pembuatan Media *Mueller-Hinton agar* (MHA)

Sebanyak 3,8 gr serbuk dilarutkan dalam 1000ml aquadest (3,8 gr/ 1000ml), kemudian dipanaskan hingga larut

dalam erlenmayer, lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media (MHA) kemudian didinginkan sampai padat, selanjutnya dibagi ke cawan petri steril. Setelah dingin, media padat disimpan dalam kulkas (Fitriyanti, *et all.*, 2023).

i. Pengujian Antibakteri Dengan Metode Sumuran

Pengujian antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran. Larutan uji dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak metanol daun kratom menjadi 12 uji konsentrasi yaitu 3%, 15%, 30% dan 45%. Kontrol positif Doksisisiklin dan kontrol negatif Na-CMC 0,5%. (Rezqi., 2017).

Suspensi bakteri *P. acnes* disebar pada 6 cawan petri yang berisi media MHA dengan mengambil 100 uL lalu diratakan pada media menggunakan *catton swab*. sepuluh cawan petri berisi MHA yang telah diinkubasi bakteri dibagi menjadi 4 bagian pada sumuran menggunakan perforator. Kemudian dimasukan ekstrak dengan berbagai konsentrasi. Selain itu 2 cawan petri dibagi menjadi 2 bagian untuk kontrol positif dan kontrol negatif (Fitriyanti, *et all.*, 2023).

Ekstrak metanol daun kratom dengan berbagai konsentrasi dimasukan ke dalam sumuran pada media MHA sebanyak 20 uL menggunakan mikropipet yang steril. Cawan

petri yang berisi bakteri dengan berbagai konsentrasi ekstrak dimasukan kedalam kulkas dengan suhu 4°C selama 2 jam agar senyawa berdifusi pada media. Dilanjutkan proses inkubasi ke dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah zona hambat terbentuk ukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong (Fitriyanti, *et all.*, 2023)

Diameter zona hambat dapat dilihat dari zona bening disekitar lubang. Jika semakin luas zona bening maka semakin besar suatu bahan dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Rahmawati, *et all.*, 2016).

Perhitungan diameter zona hambat (Pada, *et all.*, 2022)

$$\text{Rumus} = \frac{(Dv-Dc)+(Dh-Dc)}{2}$$

Keterangan

Dv : Diameter vertical

Dh : Diameter horizontal

Dc : Diameter cakram

Tabel 1. Klasifikasi Hambatan Pertumbuhan Bakteri (Munawwarah, *et all.*, 2016).

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan
>20mm	Sangat Kuat
10-20mm	Kuat
5-10mm	Sedang
<5mm	Lemah

3.6.6 Analisis Data

Data hasil yang didapat berupa diameter zona hambat. Data tersebut dianalisis dengan menggunakan SPSS untuk melihat apakah ada perbedaan dari masing-masing kelompok uji yang mesngandung kontrol positif Doksisisiklin dan kontrol negatif Na-CMC 0,5 % dengan berbagai konsentrasi ekstrak metanol daun kratom (*M.Speciosa*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P.acnes*.

Uji analisis yang digunakan dalam penelitian uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun kratom yaitu uji normalitas dan uji homogenitas untuk mengetahui apakah sampel normal atau tidak, dan uji yang digunakan uji shapiro karena sampel yang digunakan kurang dari 50. Jika data diperoleh berdistribusi normal dan homogen, maka selanjutnya dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk mengukur uji aktivitas sampel yang terdistribusi normal. Jika data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, maka analisis dilakukan dengan menggunakan uji nonparametrik yaitu uji *Kruskall-Wallis* untuk membandingkan dua variabel yang diukur dari sampel yang tidak terdistribusi sama, dimana kelompok yang diperbandingkan lebih dari dua. Sedangkan untuk menentukan apakah ada perbedaan signifikan secara statistik antara dua atau lebih kelompok variable, maka analisis menggunakan uji *Mann-Whitney*.

