

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *post-test only control group design*, dengan dua kelompok : kelompok eksperimen yang mendapat perlakuan dan kelompok kontrol yang tidak mendapat perlakuan. Desain ini bertujuan untuk mengamati pengaruh perlakuan. Penelitian eksperimental ini melibatkan dua variabel : variabel bebas dan variabel terikat, untuk mengetahui pengaruh antara variabel. Uji antibakteri ekstrak etanol 96% daun taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) terhadap *Propionibacterium acnes* dilakukan dengan metode difusi sumuran, menggunakan 8 variasi perlakuan : konsentrasi ekstrak 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 4% dan 6%, kontrol positif klindamisin 2 μ g/disk dan kontrol negatif Na-CMC 0,5%. Perhitungan pengulangan menggunakan rumus Federer (Nabila & Nanda, 2021) :

- a. Konsentrasi 1 (C1) = Konsentrasi 0,25%
- b. Konsentrasi 2 (C2) = Konsentrasi 0,5%
- c. Konsentrasi 3 (C3) = Konsentrasi 1%
- d. Konsentrasi 4 (C4) = Konsentrasi 2%
- e. Konsentrasi 5 (C5) = Konsentrasi 4%
- f. Konsentrasi 6 (C6) = Konsentrasi 6%
- g. Kontrol positif (K+) = Klindamisin 2 μ g/disk
- h. Kontrol negatif (K-) = Na-CMC 0,5%

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

Keterangan :

n = Jumlah minimal pengulangan

t = Jumlah kelompok

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

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 15 + 7$$

$$7n = 22$$

$$n = 22/7$$

$$n = 3,14 \approx 3 \text{ (ulangan yang digunakan adalah masing-masing 3}$$

kali pada 8 kelompok).

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian eksperimental ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sari Mulia Banjarmasin pada bulan Mei - Juni 2024.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah tumbuhan Taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) dan bakteri *Propionibacterium acnes*.

3.3.2. Sampel

Sampel penelitian ini adalah daun tumbuhan Taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) dan bakteri *Propionibacterium acnes*.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak etanol 96% daun Taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) yaitu 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 4% dan 6% .

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat ekstrak etanol 96% daun Taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

3.5. Alat dan Bahan

3.5.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain autoklaf (All american®), *aluminium foil*, batang pengaduk (*Pyrex*), blender (*Philip*), gelas beker (*Pyrex*®), bunsen, cawan petri (*Pyrex*), cawan porselin (*Pyrex*®), erlenmeyer (*Pyrex*®), corong kaca inkubator(*iwaki*®), jangka sorong (*Vernier Caliper*), kaca arloji, labu ukur(*Pyrex*®), *Laminar Air Flow* (LAF), ose, oven (*Thermo Scientific*®), penggaris, penjepit tabung, rak tabung reaksi, *hot plate* (*Thermo Scientific*®), spatula, pelubang sumuran,

magnetik stirrer (SH-3), *Buchner Funnel Vacuum Filtration* (IKA RP 10®), tabung reaksi (iwaki®), timbangan analitik (Ohaus®), pengayak, dan *waterbath* (Memmert®).

3.5.2. Bahan

Serbuk Magnesium (Mg), asam Klorida (HCl), *Wagner, Mayer*, asam sulfat pekat (H₂SO₄), amil alkohol, NaCl, besi (III) klorida (FeCl₃), *Dragendorf*, bakteri *Propionibacterium acnes*, ekstrak etanol 96% daun taya, etanol 96%, Media *Nutrient Agar* (NA), Media *Mueller Hinton Agar* (MHA), Na-CMC, BaCl₂, kapas, gelatin 1%, HCl 2N, kertas perkamen, aluminium foil, reagen *lieberman burchard*.

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pengambilan Sampel

Tumbuhan yang digunakan pada penelitian kali ini adalah daun taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) yang diperoleh dari Kabupaten Jombang, Jawa Timur. Daun taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) yang diambil sebanyak 2,5 Kg pada bulan Mei 2024. Daun taya yang diambil yaitu bagian daun segar berwarna hijau.

3.6.2. Determinasi Tanaman Daun Taya (*Nauclea orientalis* L.)

Proses determinasi tumbuhan dilakukan oleh Generasi Biologi Indonesia. Tumbuhan taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) yang terdiri dari batang, daun, dan buah.

3.6.3. Pembuatan Simplisia Daun Taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.)

Pembuatan simplisia diawali dengan pengumpulan bahan baku atau sampel, kemudian dilakukan sortasi basah yang bertujuan untuk menghilangkan tumbuhan selain daunnya. Didapat sebanyak 2,5 Kg daun taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) setelah dilakukan sortasi basah. Selanjutnya pencucian bahan dengan air mengalir hingga bersih dari kotoran lain yang melekat. Lalu dilakukan proses perajangan sehingga sampel menjadi bagian kecil. Kemudian dilakukan pengeringan daun taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) menggunakan oven pada suhu 60⁰C hingga bobot kering konstan. Setelah melalui proses pengeringan, dilakukan sortasi kering yang bertujuan untuk memastikan simplisia bebas dari benda asing. Perlakuan terakhir menghaluskan daun taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) yang telah kering menggunakan *blender* sehingga hasil akhir yang di dapat adalah serbuk halus daun taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) (Pao *et al.*, 2022; Suharsanti & Wibowo, 2016). Pengayakan simplisia yang sudah menjadi serbuk halus, dengan ayakan *mesh* no. 40 (Elisa *et al.*, 2020).

Selanjutnya penimbangan dan perhitungan rendemen simplisia daun taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.). Menurut Safrina & Priyambo (2018).

$$\% \text{ Rendemen Simplisia} = \frac{\text{Bobot total simplisia (gram)}}{\text{Bobot total daun segar (gram)}} \times 100\%$$

3.6.4. Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun Taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.)

Serbuk daun taya sebanyak 522 gram dimaserasi dengan 4,5 L etanol 96% (perbandingan 1:7,5). Remaserasi dilakukan dengan cara dan pelarut yang sama. Ekstrak diuapkan dengan *waterbath* dan dipekatkan pada suhu 40-45⁰C, kemudian ditimbang untuk perhitungan rendemen (Kristiningrum *et al.*, 2022). Penimbangan dan perhitungan rendemen ekstrak kental daun taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.) menurut (Sani *et al.*, 2014) rendaman ekstrak dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ Rendemen Simplisia} = \frac{\text{Bobot ekstrak (gram)}}{\text{Bobot simplisia yang dihitung (gram)}} \times 100\%$$

3.6.5. Sterilisasi Alat dan Bahan

- a. Sterilisasi dengan uap bertekanan (autoklaf) dilakukan pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Alat yang disterilisasi meliputi cawan petri, tabung reaksi, aquades steril, media *Nutrient Agar* (NA), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), dan NaCl fisiologis.
- b. Sterilisasi dengan pemijaran dilakukan dengan membakar alat-alat seperti jarum ose, spreader, dan pinset di atas lampu spiritus. Sterilisasi menggunakan oven dilakukan pada suhu 170⁰C selama 1 jam, atau 160⁰C selama 2 jam, untuk alat yang tahan panas (Andriani, 2016; Kemenkes, 2017).

3.6.6. Pembuatan Media NA dan MHA

Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA) dilakukan dengan melarutkan 0,42 gram serbuk NA dalam 15 mL aquades, kemudian

dipanaskan di atas *hot plate* hingga mendidih sambil diaduk hingga homogen. Selanjutnya, tuangkan 5 mL ke masing-masing 3 tabung reaksi steril dan tutup dengan *aluminium foil*. Media NA disterilkan menggunakan autoklaf suhu 121⁰C selama 15 menit dan dituangkan secara aseptis di dalam LAF (Juariah & Riska, 2021).

Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dilakukan dengan melarutkan 7,60 gram bubuk MHA dalam 200 mL aquades. Larutan dipanaskan dan diaduk dengan magnetik stirrer hingga larut, lalu disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Media kemudian dituangkan ke dalam 8 cawan petri steril di dalam LAF dan siap digunakan untuk pengujian daya antibakteri (Daely *et al.*, 2019).

3.6.7. Pewarnaan Bakteri *Propionibacterium acnes*

Sebelum melakukan peremajaan terhadap bakteri dilakukan pewarna gram bakteri untuk mengetahui bakteri biakan murni termasuk kedalam bakteri gram positif atau negatif. Dengan cara melakukan fiksasi terhadap kaca objek yang sudah ditetesi oleh aquades dan 1 ose bakteri biakan murni diatas api bunsen hingga kering, setelah itu tetesi *crystal violet* tunggu hingga 3-5 menit lalu dibilas dengan aquades, selanjutnya tetesi kaca objek dengan lugol selama 3 menit lalu bilas dengan aquades dan alkohol sampai luntur, kemudian tetesi dengan safranin tunggu hingga 3-5 menit lalu bilas dengan aquades setelah itu disapu dengan tisu hingga

permukaan kering.

Setelah itu kaca objek ditetesi dengan minyak *mercy* untuk mengamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x untuk mengamati bentuk dari bakteri dan pewarnaan gram pada bakteri. *Propionibacterium acnes* merupakan bakteri yang berbentuk basil atau batang dengan pewarna gram berwarna ungu atau bakteri gram positif (Wulandari *et al.*, 2019).

3.6.8. Peremajaan Bakteri *Propionibacterium acnes* Menggunakan Media Nutrient Agar (NA)

Peremajaan *Propionibacterium acnes* dilakukan dengan mengambil 1 ose bakteri dari biakan murni dan menggoreskannya di media *Nutrient Agar* agar miring. Media kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Juariah & Riska, 2021).

3.6.9. Pembuatan Larutan Standar Mc. Farland 0,5

Larutan standar Mc. Farland 0,5 digunakan untuk membandingkan jumlah koloni bakteri pada medium cair dalam pengujian daya antibakteri. Campurkan 9,95 mL H₂SO₄ 1% dengan 0,5 mL BaCl₂, lalu kocok hingga terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini digunakan sebagai standar suspensi bakteri dan disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya matahari langsung (Daylun, 2014; Widya, 2021).

3.6.10. Pembuatan Suspensi Bakteri *Propionibacterium acnes*

Ambil 1 mL NaCl 0,9% dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 1 ose biakan *Propionibacterium acnes*. Suspensikan

hingga kekeruhan sama dengan standar Mc. Farland 0,5 (Tendean *et al.*, 2017).

3.6.11. Pembuatan Kontrol Negatif (Na-CMC 0,5%)

Timbang 1 gram Na-CMC 0,5% dan larutkan dalam 200 mL aquades. Panaskan di atas *hot plate* selama \pm 1 jam hingga bening. Setelah bening, sterilkan larutan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Nurfitri *et al.*, 2021).

3.6.12. Perhitungan Variasi Konsentrasi Ekstrak Etanol 96% Daun Taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.)

Variasi konsentrasi ekstrak etanol 96% daun taya (*Nauclea orientalis* L.) yang digunakan adalah 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 4% dan 6% dengan pelarut Na-CMC 0,5%. Konsentrasi induk 10% dibuat dengan cara melarutkan 2,5 gram ekstrak dalam 25 mL Na-CMC 0,5%. Pengenceran dilakukan dengan mengambil 10 mL larutan induk untuk setiap konsentrasi. Konsentrasi 6% : 6 mL larutan induk dicampur dengan 4 mL Na-CMC 0,5%, konsentrasi 4% : 4 mL larutan induk dicampur dengan 6 mL Na-CMC 0,5%, konsentrasi 2% : 2 mL larutan induk dicampur dengan 8 mL Na-CMC 0,5%, konsentrasi 1% : 1 mL larutan induk dicampur dengan 9 mL Na-CMC 0,5%, konsentrasi 0,5% : 0,5 mL larutan induk dicampur dengan 9,5 mL Na-CMC 0,5%, dan konsentrasi 0,25% : 0,25 mL larutan induk dicampur dengan 9,75 mL Na-CMC 0,5%.

3.6.13. Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Ekstrak 0,1 gram serbuk simplisia dilarutkan dengan 5 mL HCl 2 N, dipanaskan selama 2 menit di atas penangas air, kemudian dibagi menjadi 3 tabung. Tabung 1 : 0,5 mL filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi *mayer*, membentuk endapan kuning. Tabung 2 : 0,5 mL filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi *wagner*, membentuk endapan coklat atau jingga kecoklatan. Tabung 3 : 0,5 mL filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi *dragendorf*, membentuk endapan coklat atau jingga kecoklatan. Hal ini menunjukkan sampel mengandung alkaloid (Nahya, 2021).

b. Uji Tanin

Ekstrak 0,1 gram ditambah 5 mL aquades dalam tabung reaksi, dipanaskan diatas penangas air, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan gelatin 1%, akan terbentuk endapan putih jika mengandung tanin (Baharyati *et al.*, 2022).

c. Uji Terpenoid dan Steroid

Ekstrak 0,1 gram dimasukkan kedalam 2 lubang plat tetes, masing-masing ditambah 1 mL kloroform dan 5 tetes reagen *Liebermann-Burchard* (asam asetat anhidrat- H_2SO_4). Warna biru-hijau menunjukkan adanya steroid, sedangkan warna merah-ungu menunjukkan adanya terpenoid (Nugrahani *et al.*, 2016).

d. Uji Flavonoid

Ekstrak 0,5 gram dilarutkan dalam 2 mL pelarut dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan serbuk magnesium (Mg) 2 mg dan 1 mL asam klorida (HCl) pekat dan 1 mL amil alkohol. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah, kuning, dan jingga pada lapisan amil alkohol (Anggraeny *et al.*, 2020).

e. Uji Fenol

Ekstrak etanol 96% daun taya sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam 2 ml pelarut dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu ditambahkan 2-3 tetes FeCl_3 5%. Perubahan warna menjadi hijau, merah, ungu, biru atau hitam intensif menunjukkan adanya fenol (Jati *et al.*, 2019).

f. Uji Saponin

Ekstrak sebanyak 0,1 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas. Setelah didinginkan dan dikocok kuat selama 10 menit hingga membentuk buih setinggi 1-10 cm, ditambah 1 tetes HCl 2N. Jika buih tidak hilang, kemungkinan ada saponin (Novindriana *et al.*, 2020).

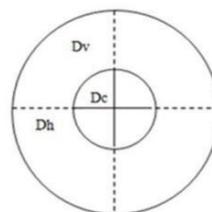
3.6.14. Pengujian Antibakteri Dengan Metode Sumuran

Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode difusi sumuran terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Media MHA sebanyak 15-20 mL dituangkan ke dalam cawan petri hingga

memadat dengan ketebalan sekitar 4 mm. Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* yang sesuai standar Mc. Farland diambil menggunakan *cotton swab* steril, kemudian ditekan-tekan pada dinding agar kapas tidak terlalu basah, lalu disebar merata di atas media MHA dan diamkan sebentar agar bakteri berdifusi ke dalam agar. Lubang sumuran dibuat menggunakan *cork borer* sebesar 6 mm pada media MHA, kemudian dimasukkan 20µl masing-masing variasi konsentrasi ekstrak etanol 96% daun taya, kontrol positif klindamisin 2µg/disk dan kontrol negatif Na-CMC 0,5% menggunakan mikropipet ke dalam setiap lubang sumuran. Cawan petri kemudian dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama 2 jam pada suhu 4°C agar ekstrak dapat berdifusi pada media sebelum terjadi pertumbuhan bakteri (Buang *et al.*, 2019).

Setelah semua diberikan perlakuan, cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Amati terbentuknya zona jernih di sekitar lubang sumuran dan ukur diameter zona jernih menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (Putrajaya *et al.*, 2019).

Menurut Harti (2015), rumus perhitungan zona hambat sebagai berikut :



Gambar 8. Diameter zona hambat bakteri

$$\text{Zona Hambat} = \frac{Dv - Dc + Dh - Dc}{2}$$

Keterangan :

Dv : Diameter vertikal

Dh : Diameter horizontal

Dc : Diameter sumuran

Hasil yang didapatkan kemudian diinterpretasikan ke dalam kategori klasifikasi zona hambat antibakteri. Diameter zona hambat ≤ 5 mm termasuk kategori lemah, 5-10 mm kategori sedang, 10-20 mm kategori kuat, dan ≥ 20 mm kategori sangat kuat. Interpretasi hasil zona hambat kontrol positif klindamisin $2\mu\text{g/disk}$ berdasarkan CLSI 2020 adalah sensitif apabila zona hambat yang terbentuk ≥ 13 mm dan resisten apabila zona hambat yang terbentuk sebesar ≤ 12 mm.

3.6.15. Cara Membersihkan Alat Sebagai Pertumbuhan Media

Langkah pertama untuk pembunuhan media agar menggunakan cairan *bayclin* (desinfektan) dengan menuangkan ke dalam cawan petri 4-5 mL di atas permukaan agar. Tunggu sampai 30 menit lalu bersihkan menggunakan sudip untuk membuang media agar, lakukan hal yang sama terhadap cawan petri lainnya yang digunakan sebagai alat untuk membunuh bakteri.

Langkah kedua rendam cawan petri yang sudah dibersihkan dari media agar ke dalam panci yang sudah diberikan cairan sabun. Cairan sabun dipanaskan diatas kompor hingga mendidih. Biarkan

selama 30 menit setelah cairan sabun mendidih untuk pembunuhan tahap kedua, setelah itu matikan kompor dan biarkan panci mendingin lalu cawan petri dan alat-alat yang berisi media lainnya bisa dicuci seperti biasa.

3.7. Analisis Data

Data yang diambil berupa ukuran zona hambat ekstrak etanol 96% daun taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.), dianalisis menggunakan SPSS versi 26.0 *for Windows*. Tujuan pengujian dengan SPSS adalah untuk menentukan apakah terdapat perbedaan signifikan antara kelompok uji dengan variasi konsentrasi ekstrak etanol 96% daun taya (*Nauclea orientalis* (L.) L.), serta kontrol positif dan kontrol negatif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

Data yang telah didapat dianalisis menggunakan SPSS dengan uji pendahuluan yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Jika data terdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan uji parametrik yaitu *One Way ANOVA* dan uji *Post Hoc*. Jika data tidak normal atau data tidak homogen, dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui aktivitas antibakteri, kemudian uji *Mann Whitney* untuk melihat perbedaan signifikan antara kelompok uji (Pao *et al.*, 2022)

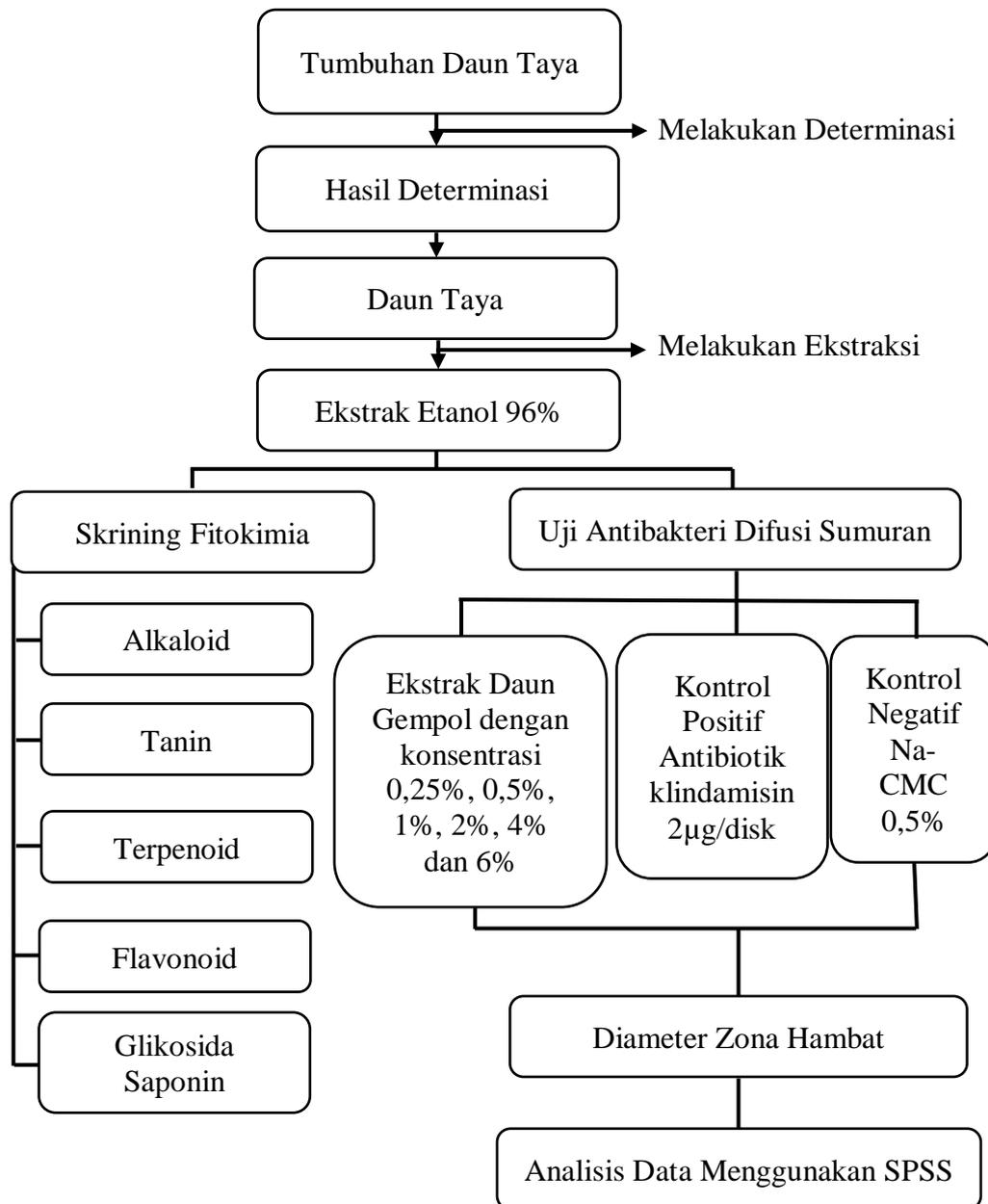
3.8. Etika Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan bakteri *Propionibacterium acnes*. Sebelum dilakukan, penelitian ini memerlukan

izin atau surat persetujuan dari komite skripsi untuk mendapatkan surat penelitian di Laboratorium Universitas Sari Mulia Banjarmasin.

Sejauh ini, penelitian mengenai penggunaan daun taya sebagai antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* dengan metode difusi sumuran belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, tidak ada plagiat dalam Skripsi ini.

3.9. Kerangka Teori



Gambar 9. Kerangka Teori