

BAB 3

METODE PENELITIAN

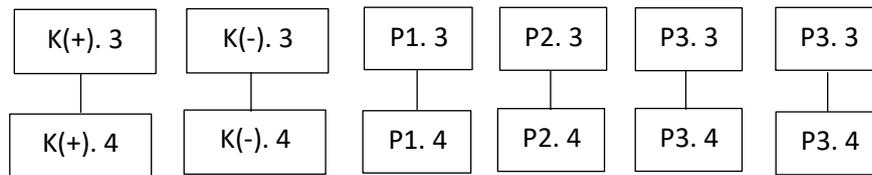
3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

3.1.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian yang menggunakan desain *Quasi Eksperimental* mengacu pada eksperimen di mana ada kelompok kontrol, tetapi kendali terhadap variabel-variabel luar tidak sepenuhnya bisa dilakukan. Dalam konteks ini, desain *Quasi Eksperimental* digunakan untuk mengeksplorasi atau menguji efek intervensi atau perlakuan terhadap kelompok subjek, tetapi tidak memungkinkan randomisasi sepenuhnya atau kontrol yang ketat terhadap faktor luar yang dapat mempengaruhi penelitian.

3.1.2 Rancangan penelitian

Desain penelitian ini menggunakan *Posttest-Only Control Design*. Desain ini mempunyai dua kelompok yang berbeda, kelompok pertama tidak diberikan perlakuan yang disebut kelompok kontrol sedangkan kelompok kedua diberikan perlakuan yang disebut kelompok eksperimen, artinya penelitian ini dilakukan untuk melihat bagaimana pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* setelah diberikan ekstrak etanol 70% daun kratom (*Mitragyna speciosa*).



Keterangan:

K(+) Kontrol positif = *Ciprofloxacin*

K(-) Kontrol negatif = Aquades steril

P1 (Perlakuan 1) = Konsentrasi ekstrak etanol daun kratom 25%

P2 (Perlakuan 2) = Konsentrasi ekstrak etanol daun kratom 50%

P3 (Perlakuan 3) = Konsentrasi ekstrak etanol daun kratom 75%

P4 (Perlakuan 4) = Konsentrasi ekstrak etanol daun kratom 100%

3.3 Variabel dan Definisi Operasional

3.3.1 Variabel

- a. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variasi konsentrasi ekstrak etanol daun kratom 70%.

- b. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

3.3.2 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Tabel Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur dan Alat Ukur	Skala Data
Variasi konsentrasi ekstrak etanol	Konsentrasi ekstrak merupakan variasi komposisi campuran ekstrak daun kratom	Membuat variasi konsentrasi dengan perbandingan	Rasio

daun kratom 70%	100% dengan pelarut etanol 70%. Rangkaian konsentrasi ini dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak pekat daun kratom menggunakan etanol 70% menjadi konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%.	tertentu ekstrak pekat daun kratom dengan pelarut etanol 70% menggunakan mikropipet(μ l).	
Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hasil pengukuran diameter area tanpa pertumbuhan di sekitar sumur pada media MHA.	Mengukur zona hambat dengan alat jangka sorong dan dilaporkan dalam millimeter (mm).	Rasio

3.4 Bahan Penelitian

Bahan-bahan tersebut adalah daun kratom (*Mitragyna speciosa*), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Muller Hinton Agar (MHA), Nutrien Agar (NA), etanol 70% (kovalen chemical), aquades steril, *disk* antibiotik *ciprofloxacin (oxoid)*, serbuk Mg, asam klorida (HCl) pekat, kloroform, ammonia, reagen *mayer*, reagen *wagner*, reagen *Dragendorff*, asam sulfat (H_2SO_4), Natrium Klorida Fisiologis (NaCl 0,9%). *Barium clorida* ($BaCl_2$), Besi (II) Klorida ($FeCl_3$), kapas, kertas saring dan *aluminium foil*.

3.5 Instrumen Penelitian

Alat-alat tersebut adalah blender, tabung vial, kertas cakram merk *oxoid*, neraca analitik (*osuka*), pipet ukur (*pyrex*), mikropipet, pump pipet, gelas beaker (*pyrex*), *evaporator* (IKA), *Erlenmeyer* (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*),

tabung reaksi (*pyrex*), rak tabung reaksi, ose, *magnetic stirrer*, *waterbath*, lampu spritus, cawan petri, jangka sorong, *hotplate*, *inkubator*, *oven* dan *autoclave*, sumuran, cotton swab steril dan pinset.

3.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Daun kratom diambil di Dalam Pagar Ulu, Kecamatan Martapura Timur, Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan. Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Borneo Lestari. Penelitian dilakukan pada bulan April-Mei 2024.

3.7. Prosedur Pengambilan Data

3.7.1. Izin Penelitian

Peneliti meminta izin kepada Prodi Diploma III Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan dan Sains Teknologi untuk melakukan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi di kampus Universitas Borneo Lestari.

3.7.2. Prosedur Kerja

A. Pengambilan dan Pengolahan Sampel

Tanaman yang diteliti adalah daun dari tanaman kratom (*Mitragyna speciosa*) yang didapatkan dari daerah Dalam Pagar Ulu, Kecamatan Martapura Timur, Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan. Sampel penelitian adalah daun dari tanaman kratom..

- a. Pemetikan Daun Kratom: Daun kratom dipetik dari pohonnya di lokasi penelitian.

- b. Penimbangan Daun: Daun kratom yang telah dipetik ditimbang untuk mendapatkan jumlah yang sesuai untuk proses ekstraksi.
- c. Pembersihan Daun: Daun kratom dibersihkan dari kotoran dengan mencucinya menggunakan air mengalir. Setelah dicuci, daun dikeringkan.
- d. Pengeringan: Daun kratom yang sudah bersih dikeringkan kembali lagi di bawah sinar matahari sampai benar kering.
- e. Penghalusan: Daun kratom yang sudah kering dihaluskan menjadi sapa serbuk menggunakan blender atau alat penghalus lainnya.
- f. Proses Ekstraksi:
 - 1. 600 gram serbuk daun kratom dimasukkan ke dalam wadah perendaman.
 - 2. Ditambahkan 6000 mL pelarut etanol 70% (etanol dalam air) hingga semua serbuk terendam dengan baik.
 - 3. Wadah perendaman ditutup dan disimpan selama 3 x 24 jam untuk ekstraksi pertama, dengan menjaga agar terlindung dari cahaya.
- g. Ekstraksi Berulang: Setelah proses ekstraksi pertama selesai, ampas daun kratom direndam kembali dengan pelarut baru sebanyak tiga kali, dengan setiap rendaman dilakukan selama 24 jam.
- h. Pemurnian Ekstrak:

1. Ekstrak yang dihasilkan dari proses ekstraksi dievaporasi menggunakan rotary evaporator pada suhu 70°C. Prosedur ini bertujuan untuk menghilangkan pelarut etanol.
2. Setelah itu, ekstrak yang terpisah dari pelarut dikentalkan lebih lanjut dengan menggunakan waterbath pada suhu 50°C.

Proses ini menghasilkan ekstrak etanol 70% dari daun kratom yang siap untuk digunakan dalam penelitian lebih lanjut terkait aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.

B. Sterilisasi Alat dan Bahan

Prosedur sterilisasi alat-alat dan bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian sebagai berikut:

1. Pembersihan Alat-alat: Alat-alat yang digunakan dibersihkan dengan air mengalir dan kemudian dicuci dengan air suling untuk memastikan kebersihan yang optimal.
2. Pengeringan Alat-alat: Setelah dibersihkan, alat-alat dikeringkan dengan cara yang sesuai untuk masing-masing jenisnya.
3. Pengemasan: Alat-alat yang sudah bersih dan kering dikemas dengan baik untuk menjaga kebersihan sebelum digunakan.
4. Sterilisasi dengan Oven:
 - a. Mulut tabung reaksi dan tabung Erlenmeyer ditutup dengan kapas.

- b. Alat-alat ini kemudian disterilkan dalam oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Sterilisasi ini berguna untuk alat-alat yang tidak tahan terhadap pemanasan kering.
5. Sterilisasi dengan Autoklaf:
 - a. Alat-alat yang bersisik dan tidak tahan terhadap pemanasan kering disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - b. Bahan seperti Muller Hinton Agar (MHA) dan Nutrien Agar (NA) juga disterilkan dengan autoklaf pada suhu yang sama dan selama waktu yang sama, yaitu 121°C selama 15 menit.
6. Sterilisasi Ose: Ose (alat pengambil sampel) disterilkan dengan cara dijemur di atas api bunsen untuk memastikan kebersihannya sebelum digunakan dalam penelitian.

C. Skrining Fitokimia

1. Identifikasi Alkaloid

Prosedur uji kualitatif untuk mengidentifikasi senyawa alkaloid dalam ekstrak etanol 70% daun kratom (*Mitragyna speciosa*) adalah sebagai berikut:

- a. Persiapan Sampel: Masukkan 0,1 gram ekstrak etanol 70% daun kratom ke dalam tabung reaksi.
- b. Penambahan Pelarut: Tambahkan 2 mL kloroform dan 2 mL amonia ke dalam tabung reaksi yang berisi ekstrak daun kratom.

- c. Pengocokan: Kocok larutan dengan lembut untuk memastikan larutan tercampur dengan baik.
- d. Penambahan HCl 2N: Tambahkan 3 tetes larutan HCl 2N ke dalam larutan yang sudah tercampur.
- e. Pembagian Larutan: Bagi larutan yang dihasilkan menjadi 3 bagian yang setara dalam tabung reaksi yang berbeda.
- f. Pengujian dengan Pereaksi:
 1. Pereaksi Dragendorf: Tambahkan pereaksi Dragendorf ke dalam salah satu tabung reaksi. Hasil positif terdapat endapan berwarna merah bata atau oranye kemerahan.
 2. Pereaksi Mayer: Tambahkan pereaksi Mayer ke dalam tabung reaksi yang lain. Hasil positif terdapat endapan putih kekuningan.
 3. Pereaksi Wagner: Tambahkan pereaksi Wagner ke dalam tabung reaksi yang terakhir. Hasil positif terdapat endapan berwarna coklat.

2. Identifikasi Flavonoid

Prosedur untuk uji identifikasi senyawa alkaloid dalam ekstrak etanol 70% daun kratom (*Mitragyna speciosa*) dengan menggunakan uji Dragendorff adalah sebagai berikut:

- a. Persiapan Sampel: Masukkan 0,1 gram ekstrak etanol 70% daun kratom ke dalam tabung reaksi.

- b. Penambahan Bubuk Magnesium: Tambahkan 0,5 mg bubuk magnesium ke dalam tabung reaksi yang sudah disediakan.
- c. Penambahan HCl Peekat: Teteskan 3 tetes larutan HCl pekat ke dalam larutan yang sudah tercampur.
- d. Pengocokan: Kocok larutan dengan lembut untuk mencampurkan bubuk magnesium dan larutan HCl dengan baik.
- e. Pemanasan: Panaskan larutan dengan hati-hati di atas penangas air atau menggunakan lampu spiritus hingga terbentuk uap. Proses pemanasan ini membantu reaksi berlangsung dengan lebih baik.
- f. Pembentukan Endapan: Setelah pemanasan, biarkan larutan dingin dan perhatikan apakah terbentuk endapan.
- g. Pengujian dengan Lapisan Amil Alkohol: Ambil sedikit larutan ekstrak yang dihasilkan dan tambahkan ke dalam lapisan amil alkohol.
- h. Hasil Positif: Adanya warna kuning pada lapisan amil alkohol setelah campuran dikocok.

3. Identifikasi Saponin

Prosedur untuk uji identifikasi senyawa alkaloid dalam ekstrak etanol 70% daun kratom dengan menggunakan metode uji busa adalah sebagai berikut:

- a. Persiapan Sampel: Masukkan 0,1 gram ekstrak etanol 70% daun kratom ke dalam tabung reaksi.
- b. Penambahan Air Hangat: Tambahkan 10 mL air hangat ke dalam tabung reaksi yang sudah berisikan ekstrak daun kratom.
- c. Pengocokan: Kocok larutan dengan lembut selama 30 menit. Proses pengocokan ini membantu dalam ekstraksi senyawa-senyawa aktif, termasuk alkaloid, ke dalam larutan air.
- d. Pengendapan Busa: Diamkan larutan selama 5 menit dan perhatikan apakah terbentuk busa.
- e. Penambahan HCl 2N: Jika busa masih ada setelah 5 menit, tambahkan larutan HCl 2N secara perlahan-lahan ke dalam larutan.
- f. Pengamatan: Amati larutan setelah penambahan HCl. Jika busa tetap stabil atau konstan, ini menunjukkan hasil positif untuk keberadaan alkaloid dalam ekstrak daun kratom.

4. Identifikasi Tanin

Prosedur untuk uji identifikasi senyawa tanin dalam ekstrak etanol 70% daun kratom (*Mitragyna speciosa*) dengan menggunakan reagen FeCl_3 adalah sebagai berikut:

- a. Persiapan Sampel: Masukkan 0,1 gram ekstrak etanol 70% daun kratom ke dalam tabung reaksi.

- b. Penambahan Air Hangat dan NaCl 0,9%: Tambahkan 10 mL air hangat ke dalam tabung reaksi yang diberikan ekstrak daun kratom. Setelah itu, tambahkan 5 tetes larutan NaCl 0,9%.
- c. Penambahan FeCl₃: Teteskan 3 tetes larutan FeCl₃ ke dalam larutan yang sudah tercampur.
- d. Pengamatan: Amati larutan dan perhatikan perubahan warna yang terjadi.
- e. Hasil Positif: Terbentuknya warna hijau kehitaman pada larutan sesudah penambahan FeCl₃.

D. Analisis Aktivitas Antibakteri

1. Pembuatan Media Media *Nutrien Agar* (NA)

Prosedur pembuatan Nutrient Agar (NA) yang tepat adalah sebagai berikut:

- a. Persiapan Bahan: Timbang 3,4 gram Nutrient Agar (NA) dan media yang sudah ditimbang dimasukkan ke labu Erlenmeyer.
- b. Pelarutan: Tambahkan 100 mL aquades (air murni atau air suling) ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi NA.
- c. Pemanasan dan Pengadukan: Panaskan larutan NA di atas hot plate sambil dihomogenisasi menggunakan pengaduk magnet. Pastikan larutan tercampur dengan baik dan tidak ada gumpalan yang tersisa.

- d. Pengalengan dan Sterilisasi: Setelah larutan mendidih, persiapan untuk sterilisasi dengan menggunakan autoklaf. Tempatkan labu Erlenmeyer ke dalam autoklaf.
- e. Autoklaf: Sterilkan larutan NA pada suhu 121°C dengan waktu 15 menit pada tekanan 2 atm. Proses ini memastikan bahwa semua mikroorganisme di dalam larutan mati dan media menjadi steril untuk pertumbuhan bakteri yang diinginkan.

2. Pemurnian Bakteri

Prosedur inokulasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ke dalam media Nutrient Agar (NA) adalah sebagai berikut:

- a. Persiapan Media NA: Pastikan media Nutrient Agar (NA) telah dipersiapkan dan telah disterilkan dengan autoklaf sesuai prosedur sebelumnya. Setelah sterilisasi, biarkan media NA membeku dalam cawan Petri secara aseptik di bawah aliran udara bersih atau dalam laminar flow cabinet.
- b. Persiapan Kultur Bakteri: Gunakan satu tabung kultur bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang telah diinkubasi sebelumnya. Pastikan kultur bakteri sudah cukup murni untuk digunakan.
- c. Inokulasi ke Media NA:
 1. Gunakan teknik aseptik, siapkan area kerja di bawah aliran udara bersih atau laminar flow cabinet.

2. Ambil ose atau loop steril (biasanya di flame sebelum digunakan) dan masukkan ke dalam tabung kultur bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
 3. Letakkan ujung ose atau loop yang sudah diambil dari kultur bakteri di bagian bawah agar miring dari media NA.
 4. Lakukan goresan zig-zag dengan ose atau loop pada permukaan media agar miring NA. Tujuannya adalah untuk mendistribusikan bakteri secara merata di permukaan agar miring.
- d. Inkubasi: Setelah inokulasi selesai, tutup cawan Petri dengan rapat dan balikkan agar media berada di atas. Tempatkan cawan Petri di dalam inkubator yang diatur pada suhu 37°C.
 - e. Inkubasi Selama 24 Jam: Biarkan media inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Waktu inkubasi ini memungkinkan bakteri untuk tumbuh dan membentuk koloni yang dapat diamati.
3. Pembuatan Larutan Standar Kekeruhan (*Mc.farland*)

Prosedur untuk persiapan standar kekeruhan suspensi bakteri uji menggunakan larutan H₂SO₄ pekat dan larutan BaCl₂ 1% adalah sebagai berikut:

- a. Ambil 9,95 mL larutan H₂SO₄ pekat (asam sulfat pekat) dan 0,5 mL larutan BaCl₂ 1% (barium klorida 1%) dalam sebuah tabung reaksi.

- b. Tuangkan larutan H_2SO_4 pekat ke dalam tabung reaksi terlebih dahulu.
 - c. Kemudian tambahkan larutan $BaCl_2$ 1% secara perlahan sambil terus dikocok menggunakan ose atau pengaduk lainnya.
 - d. Kocok larutan dengan lembut hingga terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini disebabkan oleh terbentuknya presipitat $BaSO_4$ (sulfat barium) yang tidak larut dalam larutan asam sulfat.
 - e. Larutan yang sudah terbentuk keruh ini dapat digunakan sebagai standar kekeruhan untuk suspensi bakteri uji. Standar kekeruhan ini akan digunakan sebagai patokan untuk mengukur kekeruhan suspensi bakteri yang sedang diuji.
4. Pembuatan Larutan Suspensi Bakteri Uji

Untuk pembuatan suspensi uji dengan kekeruhan yang sama dengan standar McFarland, berikut langkah-langkahnya:

- a. Gunakan ose steril untuk mengambil bakteri uji dari kultur yang sudah tumbuh.
- b. Masukkan bakteri yang telah diambil ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi 2 mL larutan $NaCl$ 0,9% (larutan garam fisiologis).

- c. Kocok tabung reaksi dengan lembut untuk mendispersikan bakteri ke dalam larutan NaCl. Pastikan agar bakteri terdispersi merata dalam larutan.
- d. Perhatikan kekeruhan suspensi yang terbentuk. Tujuan utamanya adalah mencapai kekeruhan yang sama dengan standar McFarland yang sudah ditetapkan.
- e. Jika kekeruhan belum mencapai standar yang diinginkan, tambahkan bakteri atau larutan NaCl secukupnya dan kocok kembali hingga mencapai kekeruhan yang sesuai.

5. Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

Langkah-langkah yang diperlukan untuk menyiapkan media MHA adalah sebagai berikut:

- a. Timbang 11,3 gram MHA.
- b. Siapkan labu Erlenmeyer yang cukup besar untuk menampung media.
- c. Gunakan air suling (aquades) steril untuk larutan media.
- d. Masukkan MHA ke Erlenmeyer.
- e. Tambahkan 300 mL aquades steril ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi MHA.
- f. Pastikan MHA larut sepenuhnya dalam aquades.
- g. Tutup Erlenmeyer dengan rapat.
- h. Sterilkan media MHA menggunakan autoklaf.
- i. Setel autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

- j. Sterilisasi dilakukan selama 15 menit untuk memastikan media benar-benar steril.
- k. Setelah proses sterilisasi selesai, biarkan media MHA dalam labu Erlenmeyer sampai media sedikit mendingin.
- l. Tuangkan media MHA ke dalam cawan petri dengan kebersihan yang maksimal.
- m. Setelah media mengeras, cawan petri siap digunakan untuk inokulasi bakteri..

6. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% Daun Kratom

Pertama-tama, disiapkan dengan mencampurkan 11,3 gram MHA dalam Erlenmeyer dan melarutkannya dengan 300 mL air suling steril. Kemudian sterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit untuk memastikan kebersihannya. Setelah media MHA disterilkan, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang sudah dibiakkan sebelumnya disiapkan dalam larutan NaCl 0,9% dengan tingkat kekeruhan yang sesuai dengan standar McFarland yang telah ditetapkan.

Setelah itu, media MHA yang sudah disterilkan dituangkan ke cawan petri steril dengan menggunakan teknik aseptik untuk mencegah kontaminasi. Media ini kemudian didiamkan hingga mengeras di dalam cawan petri. Setelah media mengeras, dilakukan pembuatan lubang dengan diameter 6 mm di media MHA yang telah diinokulasi dengan bakteri *Pseudomonas*

aeruginosa menggunakan alat sterile. Pada setiap cawan petri, dibuat empat lubang yang akan digunakan untuk pengujian antibakteri.

Ekstrak etanol 70% dari daun kratom ditambahkan ke masing-masing sumur dengan konsentrasi yang bervariasi, khususnya 100 µl per sumur. Proses yang sama direplikasi untuk kontrol positif dan negatif dalam cawan petri terpisah. Setelah penerapan semua perlakuan dan kontrol, cawan petri kemudian ditempatkan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam untuk memungkinkan bakteri tumbuh dan bereaksi terhadap perlakuan yang diberikan.

Sesudah inkubasi 24 jam, cawan petri diamati untuk mengetahui apakah terdapat zona hambat di sekitar sumur yang berisi ekstrak daun kratom. Diameter zona hambat diukur dengan jangka sorong, mulai dari tepi sumur (lubang) sampai dengan tepi zona bening yang mengelilinginya. Pengukuran ini dicatat dalam milimeter (mm) untuk menilai aktivitas antibakteri ekstrak daun kratom.

Prosedur pengujian dilakukan empat kali untuk setiap perlakuan dan kontrol untuk mempertahankan hasil yang konsisten dan dapat diandalkan. Pendekatan ini sangat penting untuk menilai efektivitas ekstrak etanol 70% daun kratom dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode standar dan berulang.

7. Interpretasi Hasil

Hasil pengukuran zona hambat dibandingkan dengan klasifikasi daya hambat pertumbuhan bakteri yang dikeluarkan oleh *Clinical Laboratory Standar Institute* (CLSI) tahun 2020.

Tabel 3.2 Klasifikasi Tingkat Resistensi Berdasarkan Standar CLSI

Bakteri	Antibiotik	Resisten	Intermedian	Sensitif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ciprofloxacin	≤18 mm	19-24 mm	≥ 25 mm

8. Proses Destruksi

- a. Autoklaf diisi dengan air yang telah disiapkan sampai tingkat yang telah ditentukan.
- b. Semua peralatan gelas atau bahan yang bersentuhan dengan mikroba dimasukkan ke dalam autoklaf.
- c. Kunci pengaman autoklaf dipasang, saluran keluar uap ditutup, kemudian autoklaf dihidupkan pada suhu 121oC, waktu destruksi dihitung 30 menit setelah tercapai suhu yang diinginkan.
- d. Alat dimatikan, uap air dikeluarkan sampai tekanan dalam alat sama dengan nol, kemudian peralatan gelas dikeluarkan dari autoklaf.
- e. Semuanya segera dicuci dengan air sabun untuk menghindari berkembangnya pertumbuhan mikroba lainnya.
- f. Peralatan gelas dikeringkan dengan cara ditiriskan.

3.8. Pengumpulan Data

3.9.1. Data Primer

Data yang dikumpulkan merupakan data primer yang meliputi pengukuran diameter zona hambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada berbagai konsentrasi dari ekstrak etanol 70% daun kratom. Pengumpulan data dilakukan melalui observasi dan penelitian laboratorium dengan metode sumur.

Pengumpulan data dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat di sekitar sumuran pada media MHA yang telah diinokulasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Pengukuran menggunakan jangka sorong untuk menjaga keakuratan dan konsistensi hasil. Setiap perlakuan dan kontrol direplikasi empat kali untuk memastikan keandalan data yang dikumpulkan.

3.9. Cara Pengolahan dan Analisa Data

3.9.1. Teknik Pengolahan Data

Data diameter zona hambat yang diperoleh dari pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun kratom terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* telah diolah menggunakan metode yang meliputi pengorganisasian tabel dan narasi.

3.9.2. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan pendekatan kuantitatif menggunakan komputer, yang melibatkan beberapa tahap sebagai berikut:

- a. Untuk mengecek apakah data berdistribusi normal, digunakan uji Kolmogorov-Smirnov.
- b. Apabila data menunjukkan distribusi normal maka analisis dilanjutkan dengan uji one way analysis of variance (ANOVA) untuk mengetahui perbedaan zona hambat ekstrak etanol daun kratom pada konsentrasi berbeda terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*.
- c. Apabila tidak berdistribusi normal, digunakan uji non-parametrik seperti uji Kruskal-Wallis.
- d. Untuk menentukan adanya perbedaan signifikan antar konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*, dilakukan uji LSD (Least Significant Difference

