

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi UMS dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNS pada bulan Mei-Agustus 2022. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi FKIP UMS.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan cara pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap bakteri *P. acnes* menggunakan metode difusi kertas cakram dan dilusi untuk mengetahui nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum). Ekstrak etanol daun kelor didapatkan dengan ekstraksi maserasi, dimana ekstrak kental yang didapatkan diuji kandungan senyawa kimianya. Bakteri *P. acnes* dibuat suspensi bakteri dan dibandingkan kekeruhannya dengan *Mc Farland* 0,5, Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam penelitian ini menggunakan konsentrasi 10%, 20% dan 30% serta *clindamisin disk* sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Setelah didapat diameter zona hambat, kemudian hasil dianalisis menggunakan software SPSS. Data yang terdistribusi normal dan homogen dilakukan uji *Anova*, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*.

C. Populasi, Sampel, dan Teknik Sampling

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah tanaman kelor (*Moringa oleifera*) yang digunakan pada bagian daunnya, yang didapat dari desa Ngawenombo, Kabupaten Blora, Jawa Tengah, Indonesia

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) yang berwarna hijau dan segar.

3. Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah purposive sampling yaitu pengambilan bagian sampel dari populasi dilakukan dengan penentuan kriteria-kriteria tertentu.

D. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol 70% daun kelor (*Moringa oleifera*).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai KHM dan KBM ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap bakteri *P. acnes*.

3. Variabel Kontrol

Variabel Kontrol dalam penelitian ini adalah :

- Media yang digunakan adalah MHA (Mueller Hinton Agar) .
- Inokulasi bakteri menggunakan Blood Agar.
- Pembuatan suspensi bakteri menggunakan media BHI.
- Waktu inkubasi 48 jam dengan suhu 37°C.
- Metode yang digunakan adalah metode difusi kertas cakram dan dilusi.
- Bakteri yang digunakan adalah bakteri *P. acnes*.

E. Definisi Operasional Variabel

- Daun kelor yang digunakan diperoleh dari tanaman kelor di PT. MOI yang berasal dari desa Ngawenombo, Blora, Jawa Tengah.

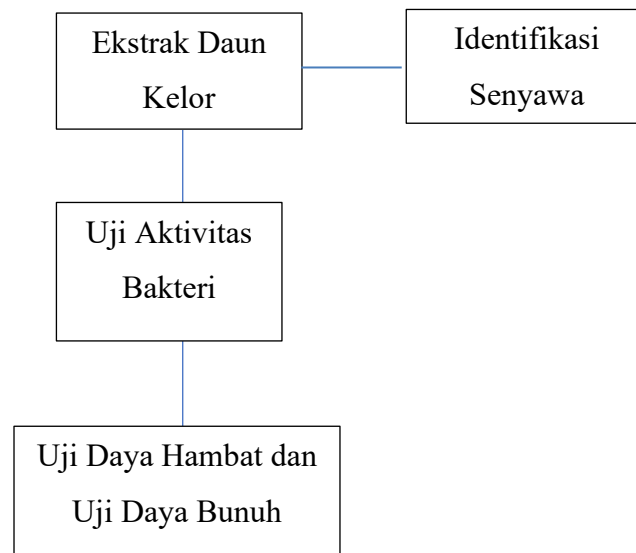
2. Konsentrasi ekstrak etanol 70% daun kelor (*Moringa oleifera*) didapat dengan cara melakukan uji pendahuluan berdasarkan jurnal penelitian sebelumnya.
3. Ekstrak etanol daun kelor dihasilkan dari peyarian dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, yang kemudian dipekatkan pada suhu 40°C
4. Pertumbuhan bakteri *P. acnes* adalah koloni bakteri yang terlihat setelah diinkubasi. Pertumbuhan bakteri diukur dengan melihat kekeruhan pada media BHI yang pada saat sebelum diinokulasi sudah disesuaikan dengan standar 0,5 *Mc Farland* dan kemudian diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C.
5. Pada metode difusi kerts cakram untuk mengukur diameter zona hambat bakteri yang ditunjukkan dengan zona bening disekitar kertas cakram pada media yang sudah ditanami bakteri dan terjadi akibat aktivitas terhadap bakteri *P. acnes*. Diameter diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan millimeter.
6. Pada metode dilusi cair dilakukan untuuk mengamati konsentrasi terkecil yang masih jernih yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri, sedangkan dilusi padat dilakukan dengan menggoreskan suspensi bakteri pada media MHA secara zigzag untuk mempermudah melihat hasil dari beberapa konsentrasi yang berbeda.

F. Hipotesis dan Kerangka Konsep

1. Ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *Propionibacterium acnes*.
2. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) pada konsentrasi 10%, 20% dan 30% memiliki diameter zona hambat optimum ekstrak daun kelor terhadap bakteri *Propionibacterium acne*.
3. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) pada konsentrasi 10%, 20% dan 30% memiliki nilai konsentrasi hambat minimum dan bunuh

minimum ekstrak daun kelor terhadap bakteri *Propionibacterium acne*.

Kerangka Konsep



Bagan 1. Kerangka Konsep

G. Instrumen Penelitian

1. Alat-alat yang digunakan

Beaker glass (Pyrex), gelas ukur (*Pyrex*), blender, timbangan analitik (*Ohaus*), erlenmeyer (*Pyrex*), corong (*Pyrex*), ayakan, tabung reaksi (*Pyrex*), pipet ukur, pipet tetes, labu takar (*Pyrex*), rak tabung, kotak aseptis, cawan petri (*Pyrex*), mikro pipet, autoklaf (*All American*), hot plate, Inkubator, ose, spuit, botol gelap, jangka sorong, vacuum rotary evaporator, kertas saring, chamber, labu desstilasi, *anaerob jar, gas pack, moisture balance*.

2. Bahan yang digunakan

Daun kelor (*Moringa oleifera*), etanol 70%, Kertas Saring Whatman no. 42, HCl, FeCl₃, Mg, isolat bakteri *P. acnes*, disk Klindamisin, media NA, aquadest steril, kertas cakram, kertas coklat, NaCl Fisiologis, Kasa Steril, Silika GF 254, H₂SO₄, CH₃COOH, reagen

mayer, n Butanol, asam asetat, kloroform, aseton, etil asetat, methanol, n heksana, pereaksi dragendrof, tepol, Media BHI, Blood Agar, Media MHA, Darah Kelinci steril.

H. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi daun kelor dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Kunci determinasi adalah petunjuk yang digunakan untuk menentukan spesies tumbuhan menggunakan ciri yang bersifat spesifik (morfologi) yang tidak dimiliki oleh tumbuhan lainnya, sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti.

2. Pengumpulan dan Pengeringan Bahan

Daun kelor sebanyak 10 kg yang diperoleh dari Desa Ngawenombo, Blora dipilih yang segar dan sehat. Daun kelor lalu dibersihkan dengan cara dicuci dibawah air mengalir kemudian ditiriskan, diangin-anginkan selama 1 hari, kemudian di oven dengan suhu 50°C selama 24 jam. Daun kelor yang sudah kering kemudian diblender sampai halus, kemudian diayak menggunakan pengayak no 60 (Kemenkes RI, 2017).

3. Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan untuk mengetahui kebenaran simplisia menggunakan panca indera dengan mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa (Depkes RI, 2000).

4. Penetapan Susut Pengering

Penetapan susut pengeringan pada serbuk daun kelor dilakukan 3 kali menggunakan alat *moisture balance*. Dengan cara sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam piring alumunium foil pada alat moisture balance kemudian diperiksa kelembabannya dan ditunggu sampai alat menunjukkan hasil kadar dengan satuan persen dengan kadar yang ditentukan kurang dari 10% (Depkes RI, 1979).

5. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kelor

Ekstrak diperoleh melalui metode maserasi dengan perbandingan 1:10 dengan cara merendam 1000 gr serbuk dengan 10.000 ml pelarut 70% dalam botol kaca gelap dan ditutup rapat pada suhu kamar. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah dapat juga menggunakan “rotary evapor” hingga diperoleh ekstrak kental.

Hitung rendemen yang diperoleh yaitu presentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Rendem harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak (Kemenkes RI, 2017). Ekstrak pekat dimasukkan wadah yang steril. Setelah didapatkan ekstrak pekat, lalu diencerkan dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30%. Rumus Pengenceran :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan :

M_1 : Konsentraasi larutan stok

V_1 : Volume larutan stok

M_2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan

V_2 : Volume larutan yang diinginkan

6. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol pada ekstrak daun kelor dilakukan dengan cara ekstrak etanol daun kelor ditambah beberapa tetes H_2SO_4 pekat dan

CH₃COOH, kemudian dipanaskan. Tidak adanya bau khas ester menunjukkan hasil negatif (Kurniawati, 2015).

7. Uji Skrining Fitokimia

Uji skrining fitokimia ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) bertujuan untuk melihat kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya meliputi Uji flavonoid, steroid, saponin, tanin dan alkaloid.

a. Uji flavonoid

Masukan 1 mL ekstrak kedalam tabung raksi ditambah 1-2 mL metanol, dipanaskan pada suhu sekitar 50°C dan setelah dingin ditambah logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat lalu ditambahkan amil alkohol. Warna merah atau jingga pada filtrat menunjukkan ada flavonoid (Alegantina Sukmayati, dkk.,2013).

b. Fenol

Masukan 1 ml ekstrak kedalam tabung reaksi ditambahkan pereaksi FeCl₃ 1%. Reaksi positif jika terbentuk warna kehitaman atau biru tua (Alegantina Sukmayati, dkk.,2013).

a. Uji Saponin

Masukan 1 mL ekstrak ke dalam tabung reaksi dan ditambah 3 mL akuades kemudian dikocok selama 15 menit untuk diamati, jika terjadi busa setinggi 1 cm yang bertahan selama 15 menit maka menunjukkan adanya saponin (Alegantina Sukmayati, dkk.,2013).

b. Uji Tanin

Masukan 1 mL ekstrak kedalam tabung reaksi ditambah 2mL akuades dan 2-3 tetes FeCl₃ dan jika terjadi warna biru tua atau coklat tua menunjukkan adanya tannin (Alegantina Sukmayati, dkk.,2013).

c. Uji Alkaloid

Masukan 1 mL ekstrak kedalam tabung reaksi ditambah 1,5 mL HCl 2%, dipanaskan sambil dikocok di atas penangas air

kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dibagi 2. Filtrat pertama ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Meyer, sedangkan filtrat kedua ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Dragendrof. Adanya senyawa alkaloid ditunjukkan oleh endapan putih dengan pereaksi Meyer dan endapan jingga dengan pereaksi Dragendorf pada masing-masing filtrate (Alegantina Sukmayati, dkk.,2013).

d. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fase diam yang dipakai yaitu silika GF 254 ukuran 10 x 2 cm, kemudian diaktifkan dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C selama 15 menit. Ekstrak etanol daun kelor ditotolkan pada fase diam dengan bantuan pipa kapiler. Fase gerak yang digunakan disesuaikan dengan senyawa yang akan diidentifikasi:

- 1) Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan fase gerak n-butanol: asam asetat: air (4:1:5). Penampak noda yaitu menggunakan rereaksi semprot sitoborat. Baku pembanding yang digunakan yaitu kuersetin. Jika tampak bercak noda kuning ke hijauan pada penyemprotan pereaksi sitoborat dalam etanol. Bila tanpa pereaksi kimia dibawah lampu UV 365nm, flavonoid akan berfluoresens hijau muda dan merah muda tergantung dari strukturnya (Novi Yanty dkk., 2019).
- 2) Identifikasi senyawa alkaloid menggunakan fase gerak menggunakan Etil asetat: Metanol: Air (6:4:2). penampak noda menggunakan Pereaksi Dragendorff, sedangkan baku pembanding yaitu Piperin. Jika timbul warna coklat atau jingga setelah penyemprotan pereaksi dragendroff menunjukkan adanya alkaloid (Harbone, 1996). Bila tanpa pereaksi kimia, dibawah lampu UV 356 nm, alkaloid akan berfluoresens biru, biru-hijau, atau ungu (Novi Yanty dkk., 2019).

- 3) Identifikasi senyawa saponin menggunakan fase gerak kloroform: methanol: air (13:7:2). Penampak noda menggunakan liberman bouchardat, sedangkan baku pembanding menggunakan sapogenin. Jika timbul warna hijau setelah penyemprotan liberman bouchardat menunjukkan adanya senyawa saponin jenis steroid dalam ekstrak (Novi Yanty dkk.,2019).
- 4) Identifikasi senyawa tanin menggunakan fase gerak methanol: etil asetat (8:2). Penampak noda menggunakan pereaksi FeCl_3 . Baku Pembanding menggunakan Katekin. Jika tampak noda pada saat disinari dengan lampu UV 366 nm berwarna ungu (Novi Yanty dkk.,2019).
- 5) Identifikasi senyawa fenol menggunakan fasa gerak n-heksan: etil asetat: metanol dengan perbandingan (2:7:2). Setelah terelusi lempeng diangkat dan dikeringkan, diamati bercak pada lampu UV₂₅₄ nm dan UV₃₆₆ nm dengan penampak bercak besi (III) klorida (FeCl_3). Hasil positif fenol jika noda berwarna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat. Analisis KLT menggunakan asam galat sebagai pembanding (Fajrianty Inarah dkk., 2018).

Setelah itu masing - masing dimasukkan ke dalam chamber dan dibiarkan sampai jenuh. Lalu chamber dijenuhkan pada suhu 110°C dengan kertas saring setelah jenuh silika GF 254 yang sudah ditotol dimasukkan kedalam chamber, setelah noda sampai pada batas atas lempeng kemudian diambil dan diamati hasil bercak noda dibawah sinar UV ₂₅₄ nm dan ₃₆₆ nm. Lalu Nilai R_f dan HR_f dihitung dari bercak yang didapat. Harga R_f dihitung dengan menggunakan perbandingan sebagaimana persamaan sebagai berikut (Gandjar dan Rohman, 2007).

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh solut (cm)}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak (cm)}}$$

8. Persiapan Media dan Pembuatan Bakteri

a. Sterilisasi

Seluruh alat yang akan digunakan dicuci bersih terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat-alat kemudian di detoks dengan cara direbus pada air mendidih yang telah dicampur dengan tepol dan kemudian di keringkan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 15 menit. Tutup mulut tabung reaksi, gelas ukur, dan Erlenmeyer menggunakan kapas yang dibalut kassa kemudian dibungkus dengan kertas payung, kemudian bungkus Cawan petri dengan kertas payung. Sterilisasi dilakukan pada autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Jarum ose disterilkan dengan memijarkan pada api Bunsen (Hapsari, 2018).

b. Inokulasi Bakteri

Membuat media *Blood Agar* dengan cara menimbang 40 gram *Blood Agar Base (Oxoid)* masukan kedalam botol kaca. Selanjutnya ditambahkan aquades steril 1000 ml dengan ph $\pm$ 7 (netral) kemudian homogenkan. Botol kaca yang berisi media ditutup yang dilapisi dengan alumunium foil dan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah dikeluarkan dari autoklaf biarkan sampai suhunya mencapai 45°-50°C atau hangat. Kemudian tambahkan darah kelinci steril masing-masing sebanyak 7%. Mengambil media *Blood Agar* sebanyak 20 ml kemudian tuangkan pada cawan petri dan ambil bakteri dari ampul sebanyak 0,1 μ l kemudian masukkan kedalam cawan petri. Setelah itu inkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C secara anaerob (Putri Rahmawida dkk., 2020).

c. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan media BHI dibuat dengan cara menimbang sebanyak 3,7 gram dilarutkan dalam 100 ml aquades steril, kemudian dipanaskan hingga larut. Lalu disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C (Kusuma, 2016). Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 mL media *Brain Heart Infusion* (BHI) hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan *Mc Farland* (Chairunnisa Afra dkk., 2017).

d. Pembuatan *Mc Farland*

Larutan baku *Mc Farland* 0,5 terdiri dari dua komponen, yaitu larutan BaCl_2 1% dan larutan H_2SO_4 1%. Sebanyak 0,05 ml larutan BaCl_2 1% dicampur dengan 9,95 ml larutan H_2SO_4 1%. Kemudian ditutup rapat supaya tidak terjadi penguapan dan larutan harus dikocok setiap akan digunakan untuk membandingkan suspensi bakteri. Standar larutan *Mc Farland* 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel bakteri dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Dian Ardhaningrum dkk., 2019).

e. Persiapan Media *Mueller Hilton Agar* (MHA)

Persiapan media MHA dibuat dengan cara menimbang sebanyak 9,5 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dilarutkan dengan 250 ml aquades steril lalu dihomogenkan tutup dengan kapas dan lakukan sterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit dan tekanan 1,5 atm dengan suhu 121°C. Kemudian tambahkan darah kelinci steril masing-masing sebanyak 7% (Rezi dkk., 2014).

9. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas ekstrak daun kelor dilakukan 3 kali replikasi. Uji aktivitas ekstrak daun kelor dilakukan menggunakan metode difusi cakram dan dilusi dengan perlakuan menggunakan konsentrasi

10%, 20%, 30%, clindamisin sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif.

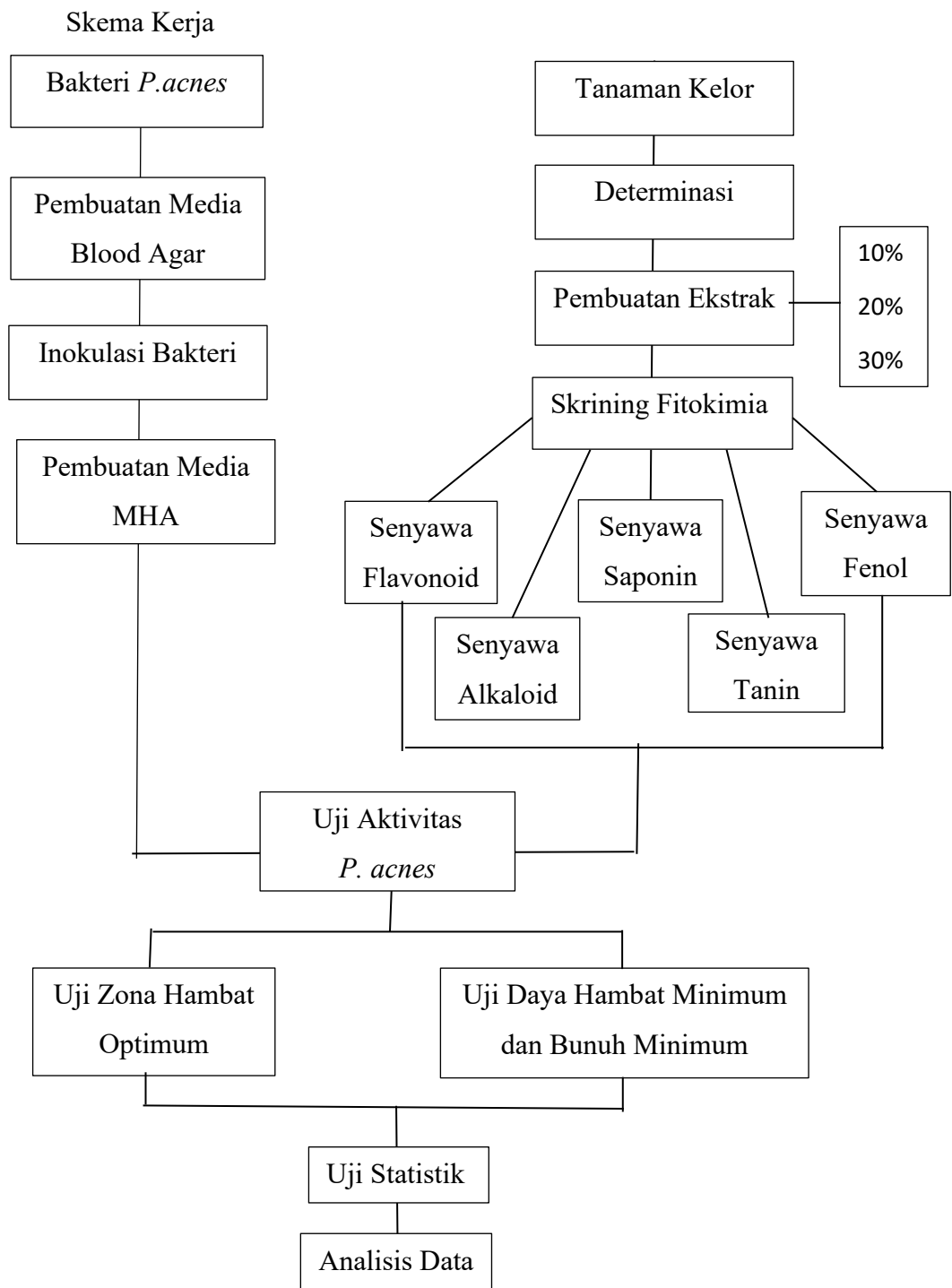
a. Metode Difusi Kertas Cakram

Siapkan 5 cawan petri dan masing-masing cawan petri diberi label dalam tiap perlakuan. Kemudian siapkan media *Mueller Hilton Agar* dengan cara tuangkan MHA 25 mL ke dalam 3 cawan petri dalam keadaan hangat, dibiarkan memadat. Masukkan suspensi bakteri menggunakan cotton swab steril dengan cara swab ke seluruh permukaan media secara merata. Kertas cakram dengan tebal 5 mm direndam dalam larutan uji dan larutan kontrol (positif maupun negatif) masing-masing sebanyak 20 µl dan didiamkan selama 5 menit, kemudian diangin-anginkan sampai tidak ada larutan yang menetes. Kertas cakram diletakkan diatas permukaan media agar, jarak kertas cakram antara satu dengan yang lainnya sebesar 3 cm dan dari tepi media sebesar 2 cm (Waluyo, 2004). Cawan petri yang berisi uji bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas antibakteri diamati dengan mengukur diameter daerah hambat yang ditunjukkan dengan daerah bening yang dibentuk di sekeliling kertas cakram menggunakan jangka sorong.

b. Metode Dilusi

Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 8 tabung steril. Masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa konsentrasi pengenceran yaitu 30%; 20%; 10%; 5%, 2,5%; 1,25%. Medium BHI dimasukan 1 ml ke dalam tabung uji secara aseptis dari tabung 3-8. Tabung pertama (kontrol negatif) hanya berisi ekstrak daun kelor 1ml. Tabung ke-2 hanya berisi suspensi bakteri (kontrol positif). Tabung 3 berisi ekstrak 1 ml dan medium BHI 1 ml lalu tabung ke tiga dikocok kemudian diambil 1 mL dimasukan kedalam tabung 4, dari tabung 4 diambil

1 mL dimasukan kedalam tabung 5 dan begitu seterusnya sampai tabung ke-8. Selanjutnya dalam setiap media tabung ditambahkan 0,5 ml suspensi bakteri pada 10^6 CFU/ml yang telah disesuaikan dengan standard 0,5 *Mc Farland*. Seluruh tabung diinkubasi secara anaerob pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) yaitu batas terendah tabung media yang jernih atau yang memberikan hasil negatif. Penentuan Nilai KBM dilakukan dengan cara mengambil 1 ose pada masing-masing konsentrasi larutan uji yang berisi dengan suspensi bakteri dan telah diinkubasi, kemudian dgoreskan suspensi bakteri secara zigzag dan diratakan pada media MHA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian dilihat ada atau tidaknya pertumbuhan koloni bakteri dan bandingkan dengan perlakuan kontrol (Sari, 2010).



Bagan 2. Skema Kerja

I. Analisis Data

Data yang diperoleh dari data penelitian di analisa secara kuantitatif menggunakan software SPSS dengan taraf kepercayaan 95%. Data yang terdistribusi normal dan homogen dilakukan Uji Anova. Dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* yang digunakan untuk mengetahui apakah suatu kelompok memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok lain dimana hasil analisis uji *Post Hoc LSD* pada penelitian menunjukan tanda bintang (*) yang artinya semua kelompok memiliki perbedaan secara signifikan terhadap kelompok lain.

Dalam uji Post Hoc menggunakan analisis *Tukey test* yaitu untuk melihat perbedaan signifikan antara masing-masing kelompok uji. Data yang tidak terdistribusi normal maupun homogen dilakukan Uji *Kruskal Wallis* yaitu salah satu uji statistic non parametik yang dapat digunakan untuk menguji apakah ada perbedaan yang signifikan antara kelompok variabel independen dengan variabel dependennya.