

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian kualitatif eksperimental laboratorium dengan pendekatan *post test only control group design* yaitu suatu metode yang melakukan pengamatan atau pengukuran setelah perlakuan pada kelompok eksperimen dan hasilnya dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian ini menggunakan difusi cakram guna mengetahui adanya aktivitas antibakteri pada berbagai konsentrasi ekstrak tunggal dan kombinasi daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) terhadap pertumbuhan *Propionibacterium acnes* secara *in vitro*.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

##### **3.2.1 Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2025 – Juli 2025

##### **3.2.2 Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Terpadu dan Laboratorium Mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang.

#### **3.3 Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **3.3.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) yang diambil dari Desa Wonosari, Kecamatan Tukur, Kabupaten Pasuruan, Provinsi Jawa Timur dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) yang diambil dari Desa Sidoasri, Kecamatan Sumbermanjing Wetan, Kabupaten Malang, Provinsi Jawa Timur yang merupakan hasil budidaya pribadi. Populasi kultur murni bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC-6919 yang dibeli dari *e-commerce* Agavilab.official milik PT Agritama Sinergi Inovasi (AGAVI) yang beralamat di Jl. Sangkuriang No. C-2, Dago, Kecamatan Coblong, Kota Bandung, Jawa Barat.

### 3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kental dari daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.), serta kultur murni bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC-6919.

### 3.3.3 Kriteria sampel

#### a. Kriteria inklusi

Kriteria inklusi daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dipanen setelah tanaman berumur sekitar 2 – 3 bulan setelah penanaman, daun yang diambil dari pohon dengan daun yang berwarna hijau muda, dipetik dari tangkai pertama setelah pucuk sampai tangkai keempat, tidak berlubang, dan berumur muda hingga sedang.

Kriteria inklusi daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) dipanen setelah tanaman berumur sekitar 3 – 4 bulan setelah penanaman, daun yang dipanen berwarna hijau muda segar hingga hijau gelap yang berada di bagian bawah tanaman, diambil hanya bagian daun, dan tidak berlubang.

Kriteria inklusi *Propionibacterium acnes* adalah koloni murni dari *Propionibacterium acnes* yang tumbuh pada media *Nutrient Agar* (NA) dan *Mueller Hinton Agar* (MHA).

#### b. Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) yang layu, kering, berwarna abu-abu, kuning hingga coklat, kering keriput, dan berlubang yang tidak sesuai dengan kriteria yang ditentukan peneliti.

Kriteria eksklusi daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) yang rusak, terserang hama, layu, kering, berwarna kuning kecoklatan, dan berlubang yang tidak sesuai dengan kriteria yang ditentukan oleh peneliti.

### 3.4 Bahan dan Alat

#### 3.4.1 Alat

Alat - alat yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- a. *Autoclave*
- b. Oven
- c. Blender
- d. Cawan petri
- e. Corong kaca
- f. *Rotary evaporator*
- g. Erlenmeyer
- h. Labu ukur
- i. Gelas ukur
- j. *Colony counter*
- k. Pipet tetes
- l. Bunsen dan korek api
- m. Mikropipet 100-1000 $\mu$ m
- n. Rak tabung reaksi
- o. *Beaker glass*
- p. *Incubator*
- q. *Vortex*
- r. Jangka sorong
- s. *Laminar Air Flow (LAF)*
- t. Ose bulat
- u. Spuit 1 mL
- v. Tabung reaksi
- w. Timbangan analitik
- x. Plastik *wrap*
- y. Kertas payung
- z. Kasa steril
- aa. Toples kaca dan spatula kayu
- bb. Vial 10 mL
- cc. Kantong plastik 1 kg
- dd. Karet gelang
- ee. Tisu
- ff. Kapas
- gg. Spidol permanen
- hh. *Cork borer*
- ii. Kertas cakram 6mm
- jj. *Mesh 40*
- kk. *Drigalski*
- ll. *Blue tip*

### 3.4.2 Bahan

Bahan - bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- a. Daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less)
- b. Daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.)
- c. Etanol 70%
- d. Kultur murni bakteri *Propionibacterium acnes*
- e. *Nutrient Agar* (NA)
- f. *Nutrient Broth* (NB)
- g. *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- h. NaCl 0,9%
- i. Larutan standar *Mc Farland* 0,5
- j. Serbuk *Clindamycin*
- k. *Aquadest*

### 3.5 Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel penelitian dibagi menjadi 3 kategori antara lain :

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Penelitian ini menggunakan variabel bebas berupa konsentrasi ekstrak (70%, 75%, 80%, dan 85%) ekstrak etanol 70% dari daun beluntas dan daun sirih cina yang kemudian diujikan terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

#### 3.5.2 Variabel Terikat

Penelitian ini menggunakan variabel terikat berupa luas zona hambat yang terbentuk karena adanya aktivitas antibakteri oleh bakteri *Propionibacterium acnes* terhadap ekstrak tunggal dan kombinasi dari daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.).

#### 3.5.3 Variabel Terkontrol

Penelitian ini menggunakan variabel terkontrol berupa pelarut etanol 70% yang digunakan dalam maserasi, suhu *rotary evaporator* menggunakan 60°C, suhu dan waktu *autoclave* untuk sterilisasi adalah 121°C selama 15 menit, media pertumbuhan dan uji aktivitas antibakteri menggunakan *Mueller Hinton Agar*

(MHA), media peremajaan bakteri menggunakan *Nutrient Agar* (NA), media suspensi bakteri menggunakan *Nutrient Broth* (NB), waktu inkubasi bakteri 1 x 24 jam setelah inokulasi, suhu inkubasi pada inkubator 36-37°C, konsentrasi suspensi bakteri  $10^{-4}$ , galur (*strain*) bakteri *Propionibacterium acnes* yang digunakan adalah ATCC-6919, suhu dan waktu *autoclave* untuk destruksi adalah 121°C selama 20 menit.

### 3.6 Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Daun Beluntas (*Pluchea indica* L. Less) adalah bagian daun dari pohon beluntas, daunnya tunggal dan berselang-seling, bentuk daun bulat telur sungsang, ujungnya bulat lancip, tepi bergerigi, berkelenjar, berwarna hijau terang, bila direbus dan diremas mengeluarkan bau aroma khas.
2. Daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) adalah bagian daun dari tanaman sirih cina, daunnya berbentuk jantung, berwarna hijau mengkilap tebal, berkadar air tinggi (sukulen), bagian atas daun berlapis lilin.
3. Ekstrak adalah sediaan kental yang berasal dari simplisia nabati yang telah diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, yang kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan kecepatan 80 rpm dan dilakukan penguapan menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental.
4. Maserasi adalah metode pemisahan senyawa metabolit sekunder dari tanaman dengan cara merendam sampel tanaman menggunakan pelarut organik berupa etanol 70% pada suhu ruang dan wadah tertutup selama 3 x 24 jam.
5. Bakteri *Propionibacterium acnes* adalah bakteri golongan gram positif pleomorfik. Bakteri ini berbentuk batang atau basil serta bersifat anaerob fakultatif.
6. Zona hambat atau *zone inhibition* adalah area di sekitar sumber bahan antimikroba seperti antibiotik yang terlihat jernih dan bebas dari pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* karena pengaruh dari ekstrak tunggal dan kombinasi daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun

sirih cina (*Peperomia pellucida* L.). Zona hambat diukur dengan satuan milimeter (mm) menggunakan kontrol positif antibiotik *Clindamycin*.

### 3.7 Metode Analisis Data dan Pengujian Hipotesa

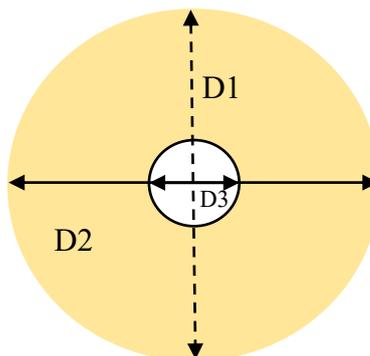
#### 3.7.1 Metode Analisis Data

Pengukuran zona hambat bakteri dilakukan setelah pengamatan yang dilakukan 1 x 24 jam masa inkubasi. Daerah pada sekitaran kertas cakram muncul kepekaan dan respon dari mikroba uji terhadap adanya antibiotik atau bahan antimikroba yang digunakan sebagai bahan uji. Daerah ini dinyatakan sebagai diameter zona hambat atau zona bening. Diameter zona hambat diukur dalam satuan milimeter (mm) menggunakan jangka sorong dengan cara mengukur jarak dari tepi sumur uji/tepi kertas cakram ke batas lingkaran zona hambat. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan Davis *and* Stout (1979). Menurut (Wila *et al.*, 2018) respon ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri dapat diklasifikasikan ke dalam beberapa tingkatan berdasarkan Davis *and* Stout, yaitu :

Tabel 3. 1 Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri

Zona hambat (mm)	Respon hambatan
$\geq 20$ mm	Sangat kuat
10 – 20 mm	Kuat
5 – 10 mm	Sedang
$< 5$ mm	Lemah

Pengukuran diameter zona dapat dihitung dengan rumus :



$$D = \frac{(D1 - D3) + (D2 - D3)}{2}$$

Keterangan :

D : Rata – rata diameter zona hambat

D1 : Diameter zona hambat terkecil

D2 : Diameter zona hambat terbesar

D3 : Diameter kertas cakram

### 3.7.2 Pengujian Hipotesa

#### 1. Pengambilan dan Determinasi Sampel

Pengambilan sampel daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) diperoleh dari Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) diperoleh dari Kabupaten Malang, Jawa Timur. Determinasi sampel daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) dilakukan di UPT Laboratorium Materia Medica Batu (MMB).

#### 2. Pembuatan Serbuk Simplisia

##### a. Pembuatan serbuk simplisia dari daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less)

Daun beluntas dipisahkan dari batang dan rantingnya, kemudian daun beluntas dicuci hingga bersih dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di dalam ruangan tanpa terkena sinar matahari langsung untuk meniriskan daun dari air hasil cucian, kemudian sampel dikeringkan ke dalam oven dengan suhu 50 – 60°C selama 3 x 24 jam. Simplisia daun beluntas yang telah kering kemudian diserbukkan dengan blender, kemudian diayak dengan ayakan *mesh* 40 untuk memperoleh besaran partikel simplisia yang sama sehingga memaksimalkan saat proses maserasi. Serbuk hasil pengayakan kemudian disimpan di wadah kedap udara dan diberikan *silica gel* mencegah adanya lembab dan jamur yang tumbuh.

b. Pembuatan serbuk simplisia dari daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.)

Daun sirih cina dipisahkan dari batang dan akarnya, kemudian daun sirih cina dicuci hingga bersih dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di dalam ruangan tanpa terkena sinar matahari langsung untuk meniriskan daun dari air hasil cucian, kemudian sampel dikeringkan ke dalam oven dengan suhu 50 – 60°C selama 3 x 24 jam. Simplisia daun sirih cina yang telah kering kemudian diserbukkan dengan blender, kemudian diayak dengan ayakan *mesh* 100 untuk memperoleh besaran partikel simplisia yang sama sehingga memaksimalkan saat proses maserasi. Serbuk hasil pengayakan kemudian disimpan di wadah kedap udara dan diberikan *silica gel* mencegah adanya lembab dan jamur yang tumbuh.

3. Ekstraksi Daun Beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan Daun Sirih Cina (*Peperomia pellucida* L.)

a. Ekstraksi Daun Beluntas (*Pluchea indica* L. Less)

Serbuk daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) ditimbang sebanyak 200 gram dimasukkan ke dalam wadah maserasi, selanjutnya ditambah dengan 2 L pelarut etanol 70% dengan rasio bahan dengan pelarut sebesar 1:10. Wadah maserasi ditutup dan disimpan selama 24 jam terhindar dari paparan sinar matahari sambil sesekali diaduk, pengadukan dilakukan sehari sekali. Setelah 3 x 24 jam larutan ekstraksi disaring untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Residu di maserasi kembali dengan pelarut etanol 70%, hal ini disebut dengan remaserasi atau pengulangan proses ekstraksi menggunakan metode maserasi, remaserasi dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan sehingga total pelarut etanol 70% yang digunakan adalah sebanyak 6 L. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan kecepatan 80 rpm kemudian dilanjutkan dengan proses penguapan pada *waterbath* untuk menguapkan sisa pelarut yang

tersisa hingga didapatkan ekstrak kental daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less).

b. Ekstraksi Daun Sirih Cina (*Peperomia pellucida* L.)

Serbuk daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) ditimbang sebanyak 200 gram dimasukkan ke dalam wadah maserasi, selanjutnya ditambah dengan 600 mL pelarut etanol 70% dengan rasio bahan dengan pelarut sebesar 1:3. Wadah maserasi ditutup dan disimpan selama 24 jam terhindar dari paparan sinar matahari sambil sesekali diaduk, pengadukan dilakukan sehari sekali. Setelah 3 x 24 jam larutan ekstraksi disaring untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Residu di maserasi kembali dengan pelarut etanol 70%, hal ini disebut dengan remaserasi atau pengulangan proses ekstraksi menggunakan metode maserasi, remaserasi dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan sehingga total pelarut etanol 70% yang digunakan adalah sebanyak 1800 mL. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan kecepatan 80 rpm kemudian dilanjutkan dengan proses penguapan pada *waterbath* untuk menguapkan sisa pelarut yang tersisa hingga didapatkan ekstrak kental daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.). Rendemen ekstrak yang didapatkan kemudian dihitung dengan menggunakan rumus :

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

Nilai rendemen dikatakan baik jika nilainya  $\geq 10\%$  (Subaryanti *et al.*, 2022)

4. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan Daun Sirih Cina (*Peperomia pellucida* L.)

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak etanol 70% daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.). Metabolit sekunder diuji secara kualitatif dilakukan pada sampel tanaman obat yang

sudah berbentuk serbuk, ekstrak ataupun simplisia kering. Pengujian kualitatif dilakukan dengan cara menambahkan pereaksi pada larutan ekstrak tanaman obat kemudian diamati perubahan warna serta endapan yang muncul. Skrining fitokimia meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid, dan saponin.

Ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) masing-masing ditimbang secara terpisah sebanyak 2 gram dan ditambahkan *aquadest* panas sebanyak 20 mL di dalam *beaker glass*, kemudian diaduk hingga homogen dan disaring, filtrat yang diperoleh dibagi menjadi 8 tabung reaksi. Pembagian 8 tabung reaksi antara lain, blanko sebagai pembanding, flavonoid, tanin, alkaloid *mayer*, alkaloid *dragendorff*, alkaloid bouchardat, terpenoid, dan saponin.

a. Identifikasi senyawa flavonoid

Larutan ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) yang masing – masing sudah dilarutkan dengan *aquadest* panas diberikan HCl pekat 3 - 4 tetes dan serbuk Magnesium sebanyak 1 spatula. Kemudian diamati jika positif maka larutan berwarna jingga kemerah – merahan.

b. Identifikasi senyawa tanin

Larutan ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) yang masing – masing sudah dilarutkan dengan *aquadest* panas diberikan  $\text{FeCl}_3$  sebanyak 3 - 4 tetes. Kemudian diamati jika positif maka larutan lebih gelap dari larutan blanko.

c. Identifikasi senyawa alkaloid meyer

Larutan ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) yang masing – masing sudah dilarutkan dengan *aquadest* panas diberikan pereaksi *Mayer* sebanyak 3 - 4 tetes kemudian didiamkan selama kurang lebih 6 jam. Diamati jika positif maka terdapat endapan.

d. Identifikasi senyawa alkaloid *dragendorff*

Larutan ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) yang masing – masing sudah dilarutkan dengan *aquadest* panas diberikan pereaksi *dragendorff* sebanyak 3 - 4 tetes kemudian didiamkan selama kurang lebih 6 jam. Diamati jika positif maka terdapat endapan.

e. Identifikasi senyawa alkaloid bouchardat.

Larutan ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) yang masing – masing sudah dilarutkan dengan *aquadest* panas diberikan pereaksi bouchardat sebanyak 3 - 4 tetes kemudian didiamkan selama kurang lebih 6 jam. Diamati jika positif maka terdapat endapan.

f. Identifikasi senyawa terpenoid

Larutan ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) yang masing – masing sudah dilarutkan dengan *aquadest* panas diberikan pereaksi bouchardat sebanyak 3 - 4 tetes. Kemudian diamati jika larutan positif mengandung triterpenoid maka akan berwarna jingga kemerah – merahan, tetapi jika larutan positif steroid maka akan berwarna hijau atau kebiru – biruan.

g. Identifikasi senyawa saponin

Larutan ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) yang masing – masing sudah dilarutkan dengan *aquadest* panas diberikan 10 – 20 mL *aquadest* panas kemudian dikocok kuat – kuat, dan diamati buih atau busa yang muncul. Larutan positif saponin jika busa atau buih yang muncul bertahan kurang lebih 5 menit.

5. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dilakukan dengan mencuci dan mengeringkan alat yang akan digunakan dalam penelitian seperti cawan petri, *cork borner*,

*drigalski*, dan pinset. Alat dibungkus dengan kertas payung atau *aluminium foil*. Dipastikan semua alat dalam kondisi yang baik dan tidak ada retak maupun rusak. Selanjutnya alat dimasukkan ke dalam *autoclave* dengan pengaturan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Sterilisasi bahan berupa media *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB) dan *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang sudah dilarutkan sebelumnya di dalam erlenmeyer, mulut erlenmeyer disumbat menggunakan gulungan kasa dan di *wrap* menggunakan plastik *wrap*. Dimasukkan media *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB) dan *Mueller Hinton Agar* (MHA) ke dalam *autoclave* dengan pengaturan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

## 6. Pembuatan Media dan Bahan

### a. Media *Nutrient Agar* (NA)

Sebanyak 0,28 gram *Nutrient Agar* (NA) dilarutkan dalam 10 mL *aquadest* atau dapat disesuaikan dengan kebutuhan (28 g/L Oxoid), lakukan pemanasan menggunakan *hot plate* dan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larutan menjadi bening, kemudian larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak  $\pm 5$  mL lalu sumbat tabung reaksi menggunakan kapas dan kasa steril. Sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Letakkan dengan posisi kemiringan  $\pm 45^\circ$  tunggu hingga memadat, media yang telah memadat diinkubasi pada suhu 35 - 36° C selama 1 x 24 jam untuk melihat apakah terjadi kontaminasi.

### b. Media *Nutrient Broth* (NB)

Sebanyak 0,14 gram *Nutrient Broth* (NB) dilarutkan dalam 10 mL *aquadest* atau dapat disesuaikan dengan kebutuhan (14 g/L Oxoid), lakukan pemanasan menggunakan *hot plate* dan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larutan menjadi bening, kemudian larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak  $\pm 5$  mL lalu sumbat tabung reaksi menggunakan kapas dan kasa steril. Sterilisasi

menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Letakkan dengan posisi kemiringan  $\pm 45^\circ$  tunggu hingga memadat, media yang telah memadat diinkubasi pada suhu 35 - 36° C selama 1 x 24 jam untuk melihat apakah terjadi kontaminasi.

c. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Sebanyak 10,26 gram dilarutkan dalam 270 mL *aquadest* atau dapat disesuaikan dengan kebutuhan (38 gram/L Oxoid). Proses dilakukan dengan pemanasan menggunakan *hot plate* dan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larutan menjadi bening, kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

d. Peremajaan Biakan Bakteri

Peremajaan bakteri *Propionibacterium acnes* yang dilakukan menggunakan biakan murni, masing – masing diambil satu ose dengan menggunakan ose steril kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada agar miring *nutrient agar* (NA) dengan cara silang atau zig – zag ataupun bisa juga dengan cara disuspensikan menggunakan *nutrient broth* (NB) dengan mengambil satu ose kemudian dicelupkan dalam tabung reaksi yang sudah berisi *nutrient broth* (NB) steril vortex hingga homogen, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Diambil satu ose bakteri *Propionibacterium acnes* yang sudah diremajakan. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 10 mL larutan NaCl fisiologis 0,9% steril. Kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex*, selanjutnya dibandingkan dengan larutan standar *Mc Farland* 0,5 jika kekeruhannya sama diperkirakan sudah sebanding dengan konsentrasi kuman  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL.

#### 7. Pembuatan Larutan Kontrol

Kontrol negatif menggunakan *aquadest* steril sedangkan kontrol positif berupa *Clindamycin*. Penggunaan *Clindamycin* sebagai kontrol positif pada pengujian terhadap *Propionibacterium acnes* sangat sedikit dilakukan oleh peneliti menggunakan konsentrasi 10% untuk memberikan gambaran baru terkait zona hambat yang dihasilkan pada konsentrasi tersebut. Konsentrasi 10% diperoleh dengan melarutkan 1g serbuk *Clindamycin* ke dalam labu ukur 10 mL kemudian di tambah *aquadest* hingga tanda batas dan di homogenkan.

#### 8. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan KHM dilakukan dengan menggunakan metode dilusi cair (*Broth Dilution*). Metode dilusi cair dilakukan dengan mempersiapkan *serial dilution* atau seri pengenceran. Langkah pertama membuat larutan stok dari masing – masing sampel ekstrak tunggal daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.) dengan konsentrasi yang tinggi yaitu dari konsentrasi 100%. Kemudian menyiapkan 7 tabung reaksi atau *microplate wells* yang berisi media pertumbuhan cair steril seperti *Nutrient Broth* (NB). Selanjutnya melakukan pengenceran berseri terhadap larutan stok dalam media pertumbuhan. Pengenceran dilakukan secara dua kali lipat (misalnya 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan seterusnya). Pastikan setiap pengenceran tercampur dengan baik dapat menggunakan vortex bila perlu. Sertakan tabung reaksi sebagai kontrol positif (media + bakteri tanpa sampel uji) dan kontrol negatif (media steril tanpa bakteri dan sampel uji).

Menyiapkan suspensi bakteri uji yaitu *Propionibacterium acnes* dengan kepadatan yang telah distandarisasi menggunakan larutan standar *McFarland* 0,5. Kemudian dapat ditambahkan dengan volume yang sama dari suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* ke dalam setiap tabung yang berisi seri pengenceran masing – masing ekstrak tanaman sampel uji dan

kontrol positif. Kontrol negatif tidak perlu diinokulasikan bakteri. Inkubasi tabung pada suhu 37°C dan dengan waktu 1 x 24 jam.

Setelah dilakukan inkubasi, tabung dapat diamati untuk melihat adanya pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya kekeruhan (*turbidity*) dalam media. Bandingkan dengan kontrol positif yang seharusnya menunjukkan pertumbuhan bakteri (media menjadi keruh). KHM adalah konsentrasi terendah dari sampel uji yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri (media tetap jernih seperti kontrol negatif).

Pembuatan seri pengenceran dilakukan sebagai langkah awal atau uji pendahuluan yang nantinya digunakan sebagai penentuan konsentrasi untuk perbandingan pada larutan kombinasi, dimana dari seri pengenceran bertahap tersebut akan dipilih satu konsentrasi yang memiliki konsentrasi hambat minimum (KHM). Larutan dengan konsentrasi hambat minimum (KHM) selanjutnya akan dibuat skala perbandingan untuk uji kombinasi ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.). Skala perbandingan yang akan digunakan sebagai berikut :

Tabel 3. 2 Skala Perbandingan Untuk Kombinasi

Daun Beluntas	:	Daun Sirih Cina
3	:	1
2	:	1
2	:	2
1	:	2
1	:	3

#### 9. Pengujian Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi cakram dilakukan dengan *spread plate* yakni dimulai dengan menuangkan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebanyak ±18mL ke dalam cawan petri, tunggu hingga memadat. Setelah MHA memadat, diambil 0,1 mL suspensi

bakteri *Propionibacterium acnes* kemudian dituangkan di atas media agar MHA dan diratakan ke seluruh permukaan menggunakan alat *drigalski*, tunggu hingga suspensi bakteri meresap ke dalam media selama  $\pm 5$  menit. Letakkan kertas cakram yang sebelumnya telah direndam dengan larutan ekstrak di permukaan media agar MHA yang telah diinokulasikan bakteri *Propionibacterium acnes*. Inkubasi cawan petri dalam inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1 x 24 jam. Hasil dari proses inkubasi selama 1 x 24 jam dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat dihitung dari tepi (*breakpoint*) ke tepi yang berseberangan melewati kertas cakram. Apabila tidak terdapat zona hambat disekitar kertas cakram, maka dinyatakan diameter zona hambatnya adalah 0 mm. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan Davis *and* Stout (Lihat pada Tabel 3.1).

#### 10. Analisis Data

Data yang didapatkan dari penelitian yang telah dilakukan dengan satu konsentrasi tunggal terpilih ekstrak tunggal daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.), serta kombinasi ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L. Less) dan daun sirih cina (*Peperomia pellucida* L.), untuk menganalisis data yang diperoleh dapat dilakukan dengan cara pengamatan secara visual dan pengukuran rata – rata zona hambat disekitar kertas cakram yang telah terisi larutan uji terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* menggunakan jangka sorong.

Data yang diperoleh dari hasil pengukuran diameter daerah hambat akan dianalisis secara statistik menggunakan program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS). Sebelum dilakukan analisis lebih lanjut, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk dan uji homogenitas menggunakan uji Levene untuk mengetahui apakah data memenuhi asumsi parametrik. Apabila data terdistribusi normal dan bersifat homogen, maka dilakukan analisis menggunakan uji parametrik *One Way*

*Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Namun, apabila salah satu atau kedua asumsi tidak terpenuhi, maka analisis dilakukan menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Jika hasil uji menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) maka akan dilakukan uji lanjutan Mann-Whitney untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan bermakna.

### 3.8 Kerangka Operasional

