

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain penelitian *post-test only control group design* yaitu metode yang melakukan pengukuran dan pengamatan setelah perlakuan pada kelompok eksperimental dimana hasilnya akan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian ini menggunakan metode difusi cakram untuk mengetahui aktivitas antibakteri pada beberapa konsentrasi ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) pada bakteri penyebab jerawat *Propionibacterium acnes* secara in vitro.

3.2 Waktu Pelaksanaan

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2026 – Juni 2026

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini 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 dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) yang di peroleh dari rumah di Jalan madura, Kelurahan Kasin, Kecamatan Klojen, Kota Malang, Jawa Timur. Populasi kultur murni bakteri *Propionibacterium acnes* yang di peroleh dari laboratorium mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang.

3.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak kental dari daun dewandaru serta bakteri uji *Propionibacterium acnes* ATCC-6919.

3.3.3 Kriteria Sampel

a. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) adalah daun yang diambil langsung dari pohonnya, daun dewasa berwarna hijau utuh, tidak berlubang, tidak terdapat jaringan parut, tidak terdapat sobekan pada bagian pinggir daun, tidak terdapat hama cabuk, permukaan daun halus dan mengkilap, serta daun yang berada di nomor 5 ke bawah dari ujung tangkai.

b. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) adalah daun yang kering, berlubang, layu, permukaan daun kasar dan kusam, dan terdapat hama cabuk pada daun yang tidak sesuai dengan kriteria yang ditentukan oleh peneliti.

3.4 Bahan dan Alat

3.4.1 Alat

- | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| a. Autoklaf | t. Oven |
| b. Blender | u. Cawan petri |
| c. Corong kaca | v. <i>Rotary Evaporator</i> |
| d. Erlenmeyer | x. <i>Colony counter</i> |
| e. Gelas ukur | y. Bunsen dan korek api |
| f. Pipet tetes | z. Rak tabung reaksi |
| g. Mikropipet 100-1000 μm | aa. Gelas beker |
| h. Tabung reaksi | bb. <i>Vortex</i> |
| i. Inkubator | cc. <i>Laminar Air Flow</i> (LAF) |
| j. Jangka sorong | dd. Spuit 1 ml |
| k. Ose bulat | ee. Plastik warp |
| l. Timbangan analitik | ff. Kasa steril |
| m. Kertas payung | gg. Vial 10 ml |
| n. Toples kaca dan spatula kayu | hh. Karet gelang |
| o. Kantong plastik 1 kg | ii. Kapas |
| p. Tisu | jj. Ayakan <i>Mesh</i> 44 |

- | | |
|--------------------|-----------------------|
| q. Spidol permanen | kk. <i>blue tip</i> |
| r. Kertas cakram | ll. <i>Water bath</i> |
| s. Lidi kapas | |

3.4.2 Bahan

- | | |
|---|------------------------------------|
| a. Daun dewandaru | i. Dragendrof |
| b. Kertas cakram | j. Magnesium |
| c. Etanol 70% | k. HCl |
| d. <i>Aquadest</i> | l. FeCl ₃ |
| e. Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> | m. NaCl 0,9% |
| f. <i>Nutrient Agar</i> (NA) | n. <i>Muller Hinton Agar</i> (MHA) |
| g. Larutan standar <i>Mc Farland</i> 0,5 | |
| h. Sebuk klindamisin | |

3.5 Identifikasi Variabel

3.5.1 Variabel Bebas

Penelitian ini menggunakan variabel bebas berupa perbedaan konsentrasi ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora L.*) yaitu pada konsentrai 25%, 30%, dan 35%.

3.5.2 Variabel Terikat

Penelitian ini menggunakan variabel terikat berupa diameter zona hambat yang di dapatkan dari hasil pengujian antibakteri pada bakteri *Propionibacterium acnes*.

3.5.3 Variabel Terkontrol

Penelitian ini menggunakan variabel terkontrol berupa tempat pengambilan simplisia yang sama, kriteria inklusi yang sesuai, menggunakan bakteri *Propionibacterium acnes*, media pertumbuhan bakteri, jenis pelarut etanol 70%, lama maserasi 3x24 jam, dan waktu inkubasi bakteri 1x24 jam dengan suhu inkubator 37 °C.

3.6 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Parameter
1	Daun dewandaru	Daun pada tanaman dewandaru (<i>Eugenia uniflora</i> L.) yang baru dipetik, berwarna hijau utuh, tidak berlubang, tidak terdapat jaringan parut, tidak terdapat sobekan pada pinggir daun, tidak terdapat hama cabuk, memiliki permukaan halus mengkilap. Daun yang digunakan adalah lima daun teratas dari ujung	Pengamatan visual, hasil uji determinasi tanaman	nominal	Warna daun hijau utuh, tidak berlubang, tidak terdapat jaringan parut, tidak terdapat sobekan pada pinggir daun, tidak terdapat hama cabuk, memiliki permukaan halus mengkilap, daun yang berada di nomor 5 ke bawah dari ujung tangkai.

		tangkai yang termasuk daun dewasa. Daun dewandaru yang sudah terbukti benar dengan dilakukan uji determinasi tanaman.			
2	Ekstrak daun dewandaru	Sediaan kental yang dihasilkan dari proses ekstraksi maserasi daun dewandaru menggunakan etanol 70%, lalu dipekatkan dengan <i>rotary evaporator</i> pada suhu 60 °C dan kecepatan 80 rpm, dan diuapkan dengan <i>water</i>	<i>Rotary evaporator, water bath, gelas ukur, timbangan digital</i>	Ordinal	Suhu <i>rotary evaporator</i> 60 °C, kecepatan <i>rotary evaporator</i> 80 rpm, konsistensi sediaan kental

		<i>bath</i> untuk mendapatkan konsistensi kental.			
3	Maserasi	Maserasi merupakan ekstraksi yang dilakukan dengan merendam serbuk daun dewandaru dalam wadah tertutup dengan suhu ruang dan menggunakan pelarut etanol 70% selama 3x24 jam, disertai pengadukan 1 kali setiap hari.	Termometer, pengaduk, <i>stopwatch</i>	Ordinal	Suhu 20-30 °C, Waktu perendaman 3x24 jam, frekuensi pengadukan 1 kali setiap hari
4	Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC-6919	Bakteri gram positif penyebab jerawat, berbentuk	Tanda pengenal bakteri (sertifikat bakteri)	nominal	Sertifikat resmi bakteri-

		batang tidak beraturan, filamen, atau kokoid, bakteri anaerob aerotoleran yang digunakan sebagai target pengujian antibakteri			
5	zona hambat	Daerah bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram yang mengandung ekstrak daun dewandaru yang menunjukkan aktivitas antibakteri.	Jangka sorong, penggaris	Ordinal	Diameter zona hambat

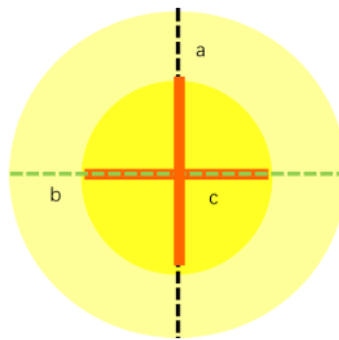
3.7 Metode Analisis Data dan Prosedur penelitian

3.7.1 Metode Analisis Data

Pengukuran zona hambat antibakteri dilakukan setelah 1x24 jam inkubasi dengan suhu 37 °C menggunakan jangka sorong. Pengukuran diameter zona hambat diukur dari ujung area bening sampai ujung area bening yang bersebrangan. Apabila

di sekitar kertas cakram tidak terdapat area bening maka diameter zona hambat bernilai 0 mm yaitu tidak adanya efek senyawa antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* (Munifah *et al.*, 2017). Hasil diameter zona hambat akan dianalisis secara statistik menggunakan program *statistical product and service solutions* (SPSS) dengan menggunakan uji parametrik *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) yang diikuti dengan uji *post hoc Tukey* yang digunakan jika nilai uji *one way anova* signifikan yang ditandai dengan nilai sig yang dihasilkan kurang dari 0,05.

Perhitungan zona hambat bakteri menurut Umi Ghoni (2020) adalah



$$D = \frac{(a - c) + (b - c)}{2}$$

D : Diameter zona hambat

a : Diameter vertikal

b : Diameter horizontal

c : Diameter kertas cakram

3.7.2 Prosedur Penelitian

1. Determinasi Sampel

Penelitian ini diawali dengan melakukan determinasi pada daun dewandaru (*Eugenia uniflora L.*). Pengujian ini merupakan proses dalam menentukan nama atau jenis tumbuhan yang digunakan secara spesifik. Determinasi dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medika Batu.

2. Pembuatan Serbuk Daun Dewandaru

Pembuatan serbuk sampel diawali dengan sortasi basah yaitu memisahkan daun dari batang dan buahnya serta memilah antara daun yang masuk dalam kriteria inklusi atau eksklusi kemudian dicuci bersih dan dilanjutkan dengan penimbangan bobot sampel basah, kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven dengan suhu 50 °C hingga kering. Proses penyerbukan dilakukan setelah proses pengeringan selesai. Penyerbukan dilakukan menggunakan blender kemudian dilanjutkan dengan pegayakan menggunakan *mesh* 44 yang bertujuan untuk memperoleh besaran partikel yang sama untuk memaksimalkan proses ekstraksi.

3. Ekstraksi Daun Dewandaru

Ekstraksi daun dewandaru (*Eugenia uniflora L.*) dilakukan dengan metode maserasi. Perbandingan serbuk sampel dan pelarut etanol 70% adalah 1:5 (b/v). Sampel yang sudah di rendam dengan etanol kemudian di diamkan selama 3x24 jam dengan suhu kamar dan tidak terpapar sinar matahari langsung. Larutan maserasi di aduk 1 kali setiap harinya sampai proses maserasi selesai, kemudian larutan disaring untuk memisahkan antara rendemen dengan filtrat. Kemudian dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali dengan etanol 70%. Hasil dari masing-masing filtrat di gabungan menjadi satu dan dilakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60 °C dengan kecepatan 80 rpm hingga mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak yang sudah didapatkan kemudian dipanaskan lagi di atas *water bath* dengan suhu 60 °C sampai ekstrak menjadi sangat kental. Rendemen ekstrak yang didapatkan dikatakan baik jika nilainya $\geq 10\%$ (Departemen Kesehatan, 2017). Rendemen ekstrak dapat di hitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$

4. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia diawali dengan menimbang 3 g ekstrak kental daun dewandaru yang dilarutkan menggunakan 30 ml *aquadest* hangat.

a. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan mengambil 2 ml larutan ekstrak daun dewandaru kemudian ditambahkan pereaksi dragendroff dan mayer. Hasil positif pereaksi dragendrof jika terdapat endapan berwarna merah, coklat, atau oranye sedangkan pereaksi mayer akan terdapat endapan berwarna kuning atau putih.

b. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan mengambil 2 ml larutan ekstrak daun dewandaru dan ditambahkan serbuk mg dan larutan HCl Pekat. Senyawa flavonoid ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan menjadi merah bata.

c. Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan mengambil 2 ml larutan ekstrak daun dewandaru kemudian ditambahkan larutan FeCl_3 . Senyawa tanin di tunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan menjadi biru karateristik, biru kehitaman, biru hijau, atau hijau.

d. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan mengambil 2 ml larutan ekstrak daun dewandaru dan ditambahkan 2 ml akuades dan kocok selama kurang lebih 1 menit, jika terbentuk busa stabil maka menunjukkan adanya senyawa saponin (Anwar *et al.*, 2022).

5. Sterilisasi Alat dan Media

Sterilisasi alat diawali dengan mencuci semua alat yang akan digunakan dan mengeringkannya, setelah kering alat dibungkus dengan kertas payung dan untuk alat yang memiliki lubang maka ditutup menggunakan sumbat. Sterilisasi media diawali dengan membuat bahan media dalam bentuk larutan sesuai perhitungan, kemudian wadah yang digunakan untuk tempat media ditutup dengan sumbat dan plastik wrap sebelum dilakukan sterilisasi. Sterilisasi alat dan media dilakukan menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C-125 °C selama 15 menit pada tekanan 1 atm.

6. Pembuatan Media

a. Media *Nutrient Agar* (NA)

Nutrient Agar (NA) Oxoid memiliki standart baku 28 g/L. *Nutrient Agar* (NA) yang sudah ditimbang dilarutkan kedalam *aquadest*, kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* dan pengadukkan dengan *magnetic stirrer* hingga larutan menjadi bening, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi ± 5 ml dan ditutup menggunakan sumbat dari kapas dan kasa steril lalu di lakukan sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, kemudian tabung reaksi diletakan dengan kemiringan 45° dan tunggu hingga memadat, jika sudah memadat maka diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1x24 jam untuk melihat apakah terjadi kontaminasi.

b. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Mueller Hinton Agar (MHA) oxoid memiliki standart baku 38 g/L. *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang sudah ditimbang dilarutkan ke dalam *aquadest*, kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* dan pengadukkan dengan *magnetic stirrer* hingga larutan menjadi bening dan ditutup menggunakan sumbat dari kapas dan kasa steril lalu dilakukan sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, selanjutnya menuangkan MHA ke dalam cawan petri dimana masing-masing cawan petri berisi ± 18 ml larutan MHA dan biarkan hingga memadat, jika sudah memadat maka diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1x24 jam untuk melihat apakah terjadi kontaminasi.

7. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri *Propionibacterium acnes* dilakukan dengan menggunakan biakan murni, dimana mengambil biakan murni satu ose dengan menggunakan ose steril dan diinokulasikan dengan cara digoreskan pada agar miring *nutrient agar* (NA) secara silang atau zig-zag dan diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37 °C.

8. Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri *Propionibacterium acnes* yang sudah diremajakan dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan NaCl fisiologis 0,9% steril dan dihomogenkan

menggunakan *vortex*, kemudian membandingkan tingkat kekeruhan larutan suspensi dengan larutan standar *Mc Farland* 0,5 dan jika kekeruhannya sudah sama maka diperkirakan konsentrasi bakteri nya $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

9. Pembuatan Larutan Kontrol

a. Larutan kontrol negatif

Larutan kontrol negatif menggunakan *aquadest* steril. Penggunaan *aquadest* steril sebagai kontrol negatif dikarenakan *aquadest* digunakan sebagai pelarut dalam membuat konsentrasi ekstrak dan sebagai pelarut dalam pembuatan media dalam uji antibakteri.

b. Larutan kontrol positif

Larutan kontrol positif menggunakan antibiotik klindamisin. Penggunaan antibiotik klindamisin sebagai kontrol positif dikarenakan klindamisin merupakan antibiotik spektrum luas yang mampu menghambat perumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*. Klindamisin yang digunakan memiliki konsentrasi 0,8% dengan melarutkan 0,08 g serbuk klindamisin kedalam 10 ml *aquadest*.

10. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) dilakukan dengan cara difusi cakram yang diawali dengan merendam kertas cakram di dalam larutan ekstrak kental daun dewandaru yang sudah diencerkan menggunakan *aquadest*. Kemudian membuat suspensi *Propionibacterium acnes* berdasarkan standar *Mc Farland* 0,5 dan diinokulasikan dengan menggunakan metode *swab* pada media padat MHA yang sudah siap digunakan. Selanjutnya meletakan kertas cakram yang sudah direndam pada larutan ekstrak dan larutan kontrol di atas cawan petri yang sudah diinokulasikan suspensi bakteri, kemudian inkubasi selama 1x24 jam dengan suhu 37 °C untuk melihat ada tidaknya zona hambat pada pertumbuhan *Propionibacterium acnes*.

11. Pengujian Antibakteri

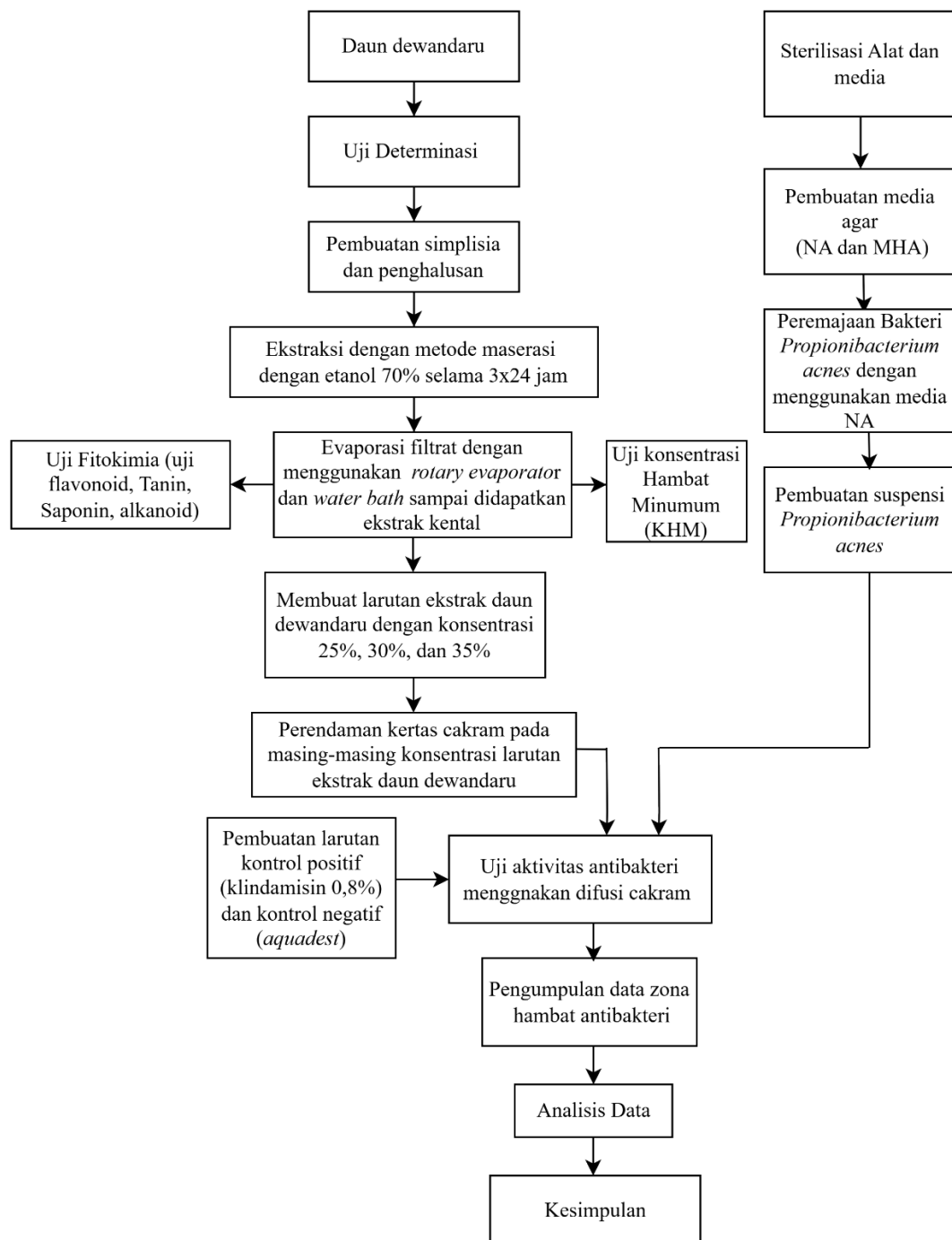
Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram dengan tahapan yang sama seperti pada pengujian KHM dengan menggunakan metode *swab*. Metode difusi cakram dilakukan dengan meletakan kertas cakram yang sudah berisi antibakteri kedalam media agar yang sudah

terinokulasi bakteri uji. Pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat dilakukan ketika proses inkubasi selesai yaitu 1 x 24 jam dengan suhu 37 °C dan diukur dengan menggunakan jangka sorong serta dikelompokkan berdasarkan kekuatan antibakteri. Pengelompokkan kekuatan antibakteri menurut Bryan (2024) dibedakan menjadi 4 kategori yaitu sangat kuat (≥ 21 mm), kuat (11-20 mm), sedang (6-10 mm), dan lemah (≤ 5 mm).

12. Analisis data

Data yang didapatkan dari penelitian yang akan dilaksanakan adalah luas zona hambat pengujian. Data dapat dianalisis dengan pengamatan visual dan pengukuran rata-rata zona hambat di sekitar kertas cakram yang sudah terisi larutan senyawa uji terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dengan menggunakan jangka sorong. Data akan dianalisis secara statistik menggunakan program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) dengan menggunakan uji parametrik *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) yang diikuti dengan uji *post hoc Tukey* yang digunakan jika nilai uji *One Way* ANOVA signifikan yang ditandai dengan nilai sig yang dihasilkan kurang dari 0,05. Uji ANOVA dan uji *post hoc Turkey* digunakan untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok pengujian yang divariasikan dari perbedaan konsentrasi ekstrak daun dewandaru. Apabila pengujian menggunakan SPSS tidak terpenuhi maka menggunakan pengujian non parametrik *Kruskal-Wallis* dengan membandingkan nilai tengah dari kelompok pengujian.

3.8 Kerangka Operasional



Gambar 3. 1 Kerangka Operasional