

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimen.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium farmakognosi DIII Farmasi dan laboratorium mikrobiologi DIII Teknik Laboratorium Medik Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam rentangan waktu februari-april 2026.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun kelor asal Nusa Tenggara Timur.

2. Sampel dan teknik sampling

a. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kelor asal kelurahan Kayu Putih, kecamatan Oebobo, Kota Kupang Nusa Tenggara Timur.

b. Teknik sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini adalah purposive sampling, dengan kriteria daun berwarna hijau.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kelor dengan konsentrasi 20, 25 dan 30%.

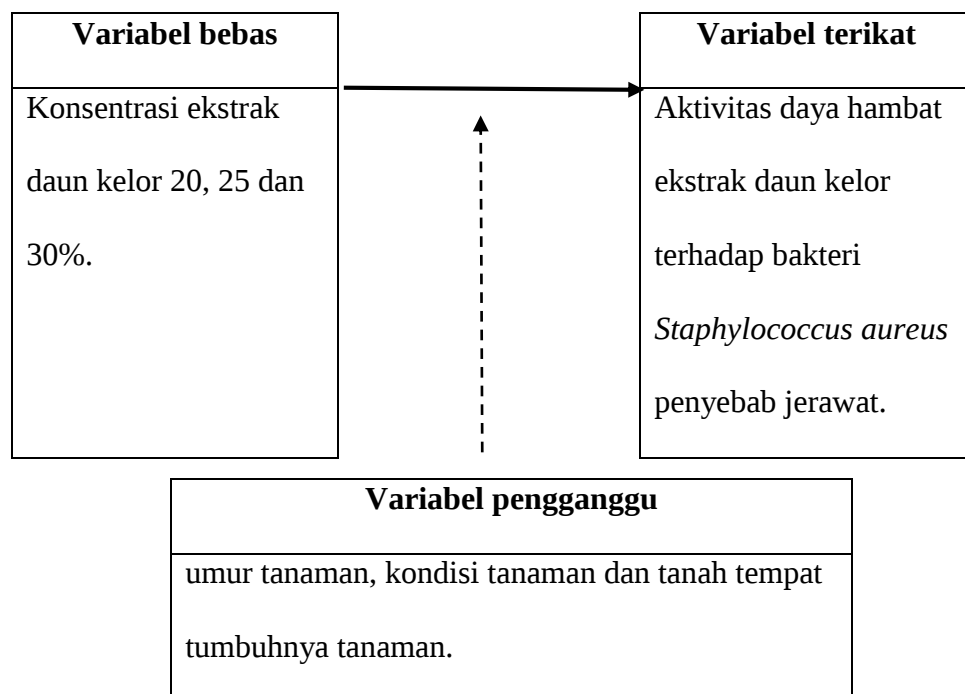
2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah aktivitas daya hambat ekstrak daun kelor terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* penyebab jerawat.

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu dalam penelitian ini adalah umur tanaman, kondisi tanaman dan tanah tempat tumbuhnya tanaman.

E. Kerangka Konsep



Keterangan: ————— : yang diteliti

----- : tidak diteliti

F. Definisi Operasional

Tabel 1 Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi operasional	Skala
1.	Daun kelor	Daun kelor diambil dari kelurahan Kayu Putih, kecamatan Oebobo, Kota Kupang Nusa Tenggara Timur.	Nominal
2.	Ekstrak etanol daun kelor	Ekstrak etanol daun kelor diperoleh dari hasil maserasi dengan pelarut etanol 95% lalu dipekatkan menggunakan rotary evaporator.	Nominal
3.	Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	Bakteri uji yang diinokulasikan pada media agar untuk menguji kemampuan ekstrak etanol daun kelor dalam menghambat pertumbuhan bakteri	Nominal
4.	Aktivitas Antibakteri	Kemampuan ekstrak etanol daun kelor dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang ditentukan dengan mengamati terbentuknya zona bening di sekitar sumuran pada media yang telah diinokulasikan <i>Staphylococcus aureus</i> setelah pemberian ekstrak pada konsentrasi 20, 25 dan 30%.	Nominal
5.	Metode uji	Difusi sumuran dengan membuat sumuran pada media agar yang telah diinokulasikan suspensi <i>Staphylococcus aureus</i> .	Nominal
6.	Diameter zona hambat	Ukuran daerah bening yang terbentuk di sekitar sumuran pada media agar setelah proses inkubasi, dimana hasil pengukuran dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).	Rasio

G. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven (*memmert*), ayakan mesh 60, timbangan analitik (*kern*), bejana, gelas ukur (*pyrex*), batang pengaduk, saringan kain, gelas kimia (*pyrex*), rotary evaporator (IKA), *waterbath* (*memmert*), cawan petri (*normax*), sudip, spatel, tabung reaksi (*pyrex*), rak tabung reaksi, pipet tetes, *hotplate*, kaca arloji, labu ukur (*pyrex*), jarum ose, pinset, inkubator (*memmert*), autoklaf (ALP), mikropipet (*ecopipette*), mistar berskala, spiritus dan *cork borer*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kelor, bakteri uji (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592), aquades steril (onemed), etanol 95% (onemed), clindamicin, nutrient agar (onemed), H_2SO_4 (onemed), BaCl_2 (onemed), NaCl 0,9%, kertas saring, kertas label dan aluminium foil (*total wrap*).

H. Prosedur Penelitian

1. Persiapan sampel

Daun kelor diambil sebanyak 2.000 g dari kelurahan Oebobo, kota Kupang dengan kriteria daun berwarna hijau segar dan tidak menguning. Tahap pengolahan diawali dengan sortasi basah untuk memisahkan bagian-bagian yang tidak diperlukan, lalu dicuci untuk menghilangkan pengotor. Selanjutnya dilakukan pengeringan menggunakan oven dengan suhu 40°C selama 5 jam. Tahap berikutnya dilanjutkan dengan sortasi kering untuk

memisahkan simplisia yang belum kering (Azri dkk., 2024). Simplisia yang sudah kering dihaluskan kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 60 hingga diperoleh serbuk simplisia yang halus.

2. Pembuatan ekstrak dengan maserasi

Ditimbang 1.250 g simplisia, direndam dalam 9.375 mL etanol 95%. Tutup wadah dengan alumunium foil dan hindari dari sinar matahari langsung, lalu diamkan selama 5 hari sambil sesekali diaduk (Muljono dkk., 2016). Campuran disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh filtrat, selanjutnya dilakukan remaserasi dengan 3.125 mL etanol 95% selama 2 hari. Filtrat maserasi dan remaserasi digabung dan diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental dan dihitung rendemen dengan rumus (Saerang dkk., 2023):

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

3. Uji Bebas Etanol

Diambil 0,5 g ekstrak, masukkan dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 2 mL asam asetat dan 2 mL H₂SO₄, lalu panaskan. Reaksi bebas etanol dapat ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester (Priamsari dan Rokhana, 2020).

4. Skrining fitokimia

a. Senyawa Saponin

Diambil 0,5 g ekstrak, masukkan dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 10 ml aquadest panas. Kocok campuran hingga berbusa, lalu tambahkan 1 tetes HCl 2N. Kandungan saponin dapat diidentifikasi dengan terbentuknya busa yang stabil (Khafid dkk., 2023).

b. Senyawa flavonoid

Diambil 1 ml ekstrak sampel, masukkan dalam tabung reaksi, lalu tambahkan serbuk Mg 0,1 g dan 5 tetes HCl pekat. Kandungan flavonoid dapat diidentifikasi dengan terjadinya perubahan warna menjadi jingga, merah atau kuning (Ulfah dkk., 2024).

c. Senyawa tanin

Diambil 1 mL ekstrak yang telah dipanaskan, masukkan ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan FeCl_3 sebanyak 3 tetes. Kandungan tanin dapat diidentifikasi dengan terjadinya perubahan warna biru atau hijau kehitaman (Yulia dkk., 2022).

d. Senyawa Alkaloid

Disiapkan dua tabung reaksi, lalu masukkan masing-masing 1 ml ekstrak sampel ke dalam tabung. Tambahkan 2 tetes pereaksi dragendorff dan pereaksi mayer, kemudian tambahkan 12 tetes H_2SO_4 . Kandungan alkaloid dapat diidentifikasi dengan terbentuknya endapan berwarna merah jingga pada pereaksi dragendorff serta endapan putih atau kuning pada pereaksi mayer (Potti dkk., 2022).

5. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

a. Uji makroskopik

Diambil bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan jarum ose, gores pada media MSA, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rachmad dkk., 2022). Diamati hasil pertumbuhan pada media MSA

dengan spesifikasi berwarna kuning keemasan, berbentuk bulat kecil, tepian rata dan elevasi convex (Aprilika dan Advinda, 2025).

b. Uji mikroskopik

Dibersihkan kaca objek, tetesi dengan alkohol pada kedua permukaan dan keringkan menggunakan kertas saring. Buat lingkaran di tengah-tengah kaca objek, letakkan inokulum bakteri di dalam lingkaran, lalu biarkan hingga mengering. Lakukan fiksasi panas dengan melayangkan kaca objek di atas api. Tetesi kristal violet, diamkan selama 1-2 menit. Buang kelebihan Kristal violet dengan memiringkan kaca objek, lalu bilas dengan akuades. Tambahkan larutan lugol, diamkan selama 30 detik, lalu bilas dengan akuades. Tambahkan safranin, biarkan selama 30 detik, buang kelebihan safranin, lalu bilas dengan akuades. Keringkan menggunakan kertas saring secara hati-hati, amati menggunakan mikroskop perbesaran 10×100 . Gram positif (*Staphylococcus aureus*) ditandai dengan hasil berwarna ungu pada pewarnaan gram (Rachmad dkk., 2022).

6. Pembuatan larutan kontrol positif dan negatif

Kontrol positif dibuat dari sediaan klindamisin 300 mg. Diambil 10 kapsul clindamycin, lalu timbang bobot isi kapsul satu per satu. Hitung rata-rata isi 10 kapsul dan timbang setara dengan 20 mg serbuk clindamycin. Sehingga dihitung penimbangan klindamisin:

$$\frac{20 \text{ mg}}{300 \text{ mg}} \times \text{bobot rata - rata}$$

Hasil penimbangan dilarutkan dengan 10 ml akuades steril, lalu diencerkan hingga mendapat konsentrasi 2µg/ml. Kontrol negatif menggunakan akuades steril (Gerung dkk., 2021).

7. Pembuatan larutan uji

Ditimbang 2,0; 2,5 dan 3,0 g ekstrak daun kelor. Larutkan dalam 10 mL akuades steril, sehingga diperoleh konsentrasi 20, 25 dan 30% b/v (Gerung dkk., 2021).

8. Pembuatan media dasar

Ditimbang 4 g nutrien agar, masukkan ke dalam erlenmeyer, lalu larutkan dengan 200 mL aquades. Larutan dipanaskan di atas penangas air hingga mendidih, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Dima dan Lolo, 2016).

9. Pembuatan suspensi bakteri uji

Diambil bakteri uji yang telah ditumbuhkan pada media agar miring menggunakan kawat ose, kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi 2 mL larutan NaCl 0,9% (Dima dan Lolo, 2016). Suspensi disesuaikan hingga memiliki tingkat kekeruhan yang sama dengan standar Mc farland dengan diletakkan tabung secara berdekatan di depan kertas berlatar belakang putih dan memiliki garis-garis hitam (Kurniawan, 2015).

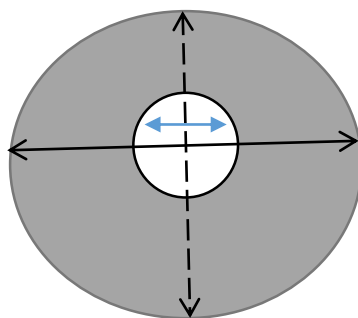
10. Pembuatan media pengujian difusi sumuran

Diambil 20 mL media NA, ditambahkan 100 µL suspensi bakteri dengan mikropipet, homogenkan dan tuang ke dalam cawan petri kemudian diamkan hingga memadat. Media dilubangi secara aseptik menggunakan

cork borer, lalu dipipet sebanyak 20 μL larutan sampel dan pembanding, masukkan ke dalam lubang sumuran pada masing-masing konsentrasi. Diamkan media selama 30 menit pada suhu ruang agar larutan uji dan pembanding dapat meresap ke dalam media. Selanjutnya inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator, zona hambatan yang terbentuk diamati dan diukur (M. R. Putri, 2023).

I. Analisis Data

Luas zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dan dengan rumus Andries dan Supit (2014).



Keterangan :

↔ : D1 (diameter zona hambat horizontal)

↔ : D2 (diameter zona hambat vertikal)

↔ : D3 (diameter sumuran)

■ : Zona hambat

$$\text{Luas zona hambat} = \frac{(D1 - D3) + (D2 - D3)}{2}$$

Diameter zona hambat dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan Davis and Stout (1971).

Tabel 2 Kriteria kekuatan antibakteri

No.	Luas zona hambat (mm)	Kekuatan
1.	> 20 mm	sangat kuat
2.	10 –20 mm	Kuat
3.	5 –10 mm	Sedang
4.	0 –5 mm	Lemah