

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental di laboratorium dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) untuk mengevaluasi pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol daun *Begonia heracleifolia* terhadap aktivitas antibakteri *Propionibacterium acnes*. Ekstraksi dilakukan melalui maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol. Seluruh ekstrak diuji skrining fitokimia, sementara ekstrak etil asetat dikarakterisasi lebih lanjut dengan LC-MS untuk mengidentifikasi metabolit sekunder. Aktivitas antibakteri diuji menggunakan metode difusi sumuran pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%, masing-masing dengan tiga replikasi, dan efektivitas diukur berdasarkan diameter zona hambat yang terbentuk.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian dilaksanakan dalam rentang waktu bulan Februari hingga Mei tahun 2025.

3.3 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian berupa daun Begonia Tapak Hitam (*Begonia heracleifolia* Schltdl. & Cham.) yang diekstraksi menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol, diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO). Isolat bakteri *Propionibacterium acnes* diperoleh dari Agritama Sinergi Inovasi Lab (AGAVI), Jl. Sangkuriang No. C-2, Kelurahan Dago, Kecamatan Dago, Kota Bandung, Jawa Barat.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *rotary evaporator*, *oven*, *hot plate*, *water bath*, tabung reaksi, cawan porselen,

gelas ukur, corong, timbangan analitik, gelas beaker, kaca arloji, pipet tetes, mikropipet, tip mikropipet, spatula, sendok tanduk, jarum ose, *Laminar Air Flow* (LAF), *vortex mixer*, cawan petri, batang pengaduk, inkubator, autoklaf, bunsen, pelubang gabus nomor 2, spreader, jangka sorong, serta instrumen LC-MS QTOF Agilent 6530 dengan kolom Poroshell 120 EC-C18 (3,0 × 50 mm, 2,7 µm) yang dikendalikan oleh perangkat lunak *MassHunter* (Agilent Technologies) dengan mode ionisasi positif ESI dan sistem gradien.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daun *Begonia heracleifolia*, n-heksana, etil asetat, etanol 96%, aquadest steril, pereaksi Mayer, Dragendorff, Liebermann-Burchard, FeCl₃ 5%, HCl 2N, H₂SO₄, serbuk magnesium, gelatin 1%, NaOH 5%, kloroform, amil alkohol, bakteri *Propionibacterium acnes*, antibiotik klindamisin, DMSO 10%, *Nutrient Agar* (NA), NaCl 0,9%, BaCl₂ 1%, botol vial, botol coklat, kasa steril, kapas, benang kasur, aluminium foil, tabung Eppendorf, *acetonitrile* (CAN) LC-grade, air ultrapure, dan asam format 0,1%.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi Tanaman

Penentuan spesies tanaman *Begonia heracleifolia* dilakukan terlebih dahulu di Departemen Biologi, Universitas Padjadjaran, Bandung. Proses ini bertujuan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah spesies yang benar, sehingga menghindari kemungkinan kekeliruan akibat penggunaan spesies lain yang serupa. Langkah ini sangat penting untuk memastikan keakuratan dan validitas hasil penelitian.

3.5.2 Persiapan Sampel

Daun *Begonia heracleifolia* yang telah dikumpulkan dicuci sebanyak 2–3 kali menggunakan air bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel, kemudian ditiriskan dan dilakukan sortasi basah guna memisahkan daun yang rusak atau membusuk. Daun yang telah bersih

kemudian dirajang untuk mempercepat proses pengeringan, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan hingga kering dan rapuh. Setelah itu, dilakukan sortasi kering untuk memastikan tidak ada kotoran yang tertinggal. Simplisia yang telah kering kemudian digiling atau diblender hingga halus, diayak menggunakan saringan berukuran 40 mesh, lalu ditimbang dan disimpan dalam wadah tertutup rapat di tempat yang sejuk agar mutu tetap terjaga (Pratiwi *et al.*, 2023).

3.5.3 Ekstraksi

Simplisia yang telah dihaluskan dimasukkan kedalam maserator dan kemudian pelarut n-heksana dimasukkan, sampel direndam dalam waktu 24 jam dan didaduk sesekali, kemudian ekstrak disaring menggunakan kertas saring dan ulangi ekstraksi hingga hasil larutan ekstraksi tidak berwarna lagi. Hasil ekstraksi menggunakan pelarut n-heksana disatukan dan dipekatkan dengan *rotary evaporation* sampai mendapatkan ekstrak kental n-heksana, kemudian dihitung nilai dari rendeman ekstrak kental pelarut n-heksana (Abriyani, 2016).

Ampas sisa ekstraksi menggunakan pelarut n-heksana dikeringkan dengan mengupkan sisa pelarut yang tertinggal, setelah ampas kering dan pelarut sebelumnya sudah menguap ekstraksi dilanjutkan menggunakan pelarut etil asetat dengan alur perendaman sama dengan perendaman pelarut sebelumnya, hasil ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat disatukan dan dipekatkan kemudian dihitung rendemen ekstrak. Sisa ekstraksi menggunakan etil asetat diuapkan dan dilakukan proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perlakuan yang sama seperti ekstraksi dengan pelarut sebelumnya, hasil ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% disatukan dan dipekatkan kemudian dihitung rendemen ekstrak yang didapat (Abriyani, 2016). Setelah ekstrak kental didapatkan dihitung rendeman ekstrak yang didapat. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{berat simplisia yang diekstrak (g)}} \times 100\%$$

3.5.4 Uji Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah metode yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan senyawa metabolit sekunder dalam bahan alami. Teknik ini memberikan informasi awal mengenai jenis dan kemungkinan konsentrasi senyawa tertentu yang terdapat dalam sampel alami yang dianalisis (Pratiwi *et al.*, 2023). Prosedur pengujian skrining fitokimia menurut Pratiwi *et al.* (2023) adalah sebagai berikut:

1. Uji Alkaloid

Sebanyak 2 gram ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml larutan HCl 2N, dipanaskan, lalu didinginkan. Setelah itu, disiapkan dua tabung reaksi, masing-masing diisi 1 ml larutan yang telah didinginkan ke dalam masing-masing tabung ditambahkan pereaksi Mayer dan Dragendorff. Hasil uji positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau kuning pada penambahan pereaksi Mayer, sedangkan penambahan pereaksi Dragendorff menghasilkan endapan merah.

2. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml etanol 96%. Campuran tersebut dipanaskan selama sekitar 5 menit menggunakan penangas air, lalu ditambahkan 10 tetes HCl pekat dan 0,2 gram serbuk magnesium. Hasil uji dinyatakan positif mengandung flavonoid apabila muncul warna hitam kemerahan, jingga, atau kuning.

3. Uji Tanin

Sebanyak 1 gram sampel ditimbang dan dihancurkan menggunakan 15 ml aquadest hingga tercampur merata. Larutan kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah itu, larutan disaring dan hasil filtrat dibagi ke dalam dua tabung reaksi yang berbeda. Pada tabung pertama, ditambahkan 5 tetes pereaksi gelatin 1%. Kehadiran senyawa tanin ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna putih pada filtrat tersebut.

4. Uji Fenolik

Pada filtrat kedua dalam uji tanin, ditambahkan 2 hingga 3 tetes larutan klorida 1%. Kehadiran senyawa golongan fenol ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi hijau hingga biru kehitaman.

5. Uji Saponin

Sebanyak 1 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air panas. Setelah didinginkan, larutan dikocok kuat selama 10 detik. Hasil uji dinyatakan positif mengandung saponin apabila terbentuk buih setinggi 1–10 cm yang bertahan setidaknya selama 10 menit, dan tetap stabil setelah penambahan 1 tetes HCl 2N.

6. Uji Steroid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dicampurkan dengan etanol 96% dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi Lieberman-Burchard. Adanya perubahan warna dari ungu menjadi biru atau hijau menunjukkan keberadaan senyawa steroid.

7. Uji Terpenoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 ml kloroform dan 3 ml asam sulfat (H_2SO_4). Munculnya warna merah kecoklatan pada batas antar lapisan menandakan adanya senyawa terpenoid.

8. Kuinon

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam aquadest dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah disaring, ke dalam larutan ditambahkan 2–3 tetes NaOH 5%. Jika larutan berubah warna menjadi kuning hingga merah, maka sampel mengandung senyawa kuinon.

3.5.5 Uji Karakterisasi LC-MS

Karakterisasi senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etil asetat daun *Begonia heracleifolia* menggunakan teknik LC-MS (*Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*) dilakukan di Universitas Airlangga. Proses diawali dengan preparasi sampel, yaitu mengeringkan dan

menimbang 0,0010 g sampel menggunakan tabung Eppendorf. Sampel kemudian dilarutkan dalam metanol dengan konsentrasi 100 ppm dan dicampur hingga homogen menggunakan vortex. Selanjutnya, larutan dimasukkan ke dalam vial untuk dianalisis menggunakan instrumen Agilent 6530 QTOF LC/MS.

Analisis dilakukan menggunakan sistem LC yang dilengkapi dengan pompa biner dan terintegrasi dengan spektrometer massa tipe *Quadrupole Time of Flight* (QTOF), yang menggunakan sumber ionisasi *Electrospray Ionization* (ESI). Spektrometri massa dijalankan dalam mode ionisasi positif. Parameter ESI yang diterapkan meliputi aliran gas pengering sebesar 8 L/menit dengan suhu 300 °C, serta *collision energy* sebesar 0 eV. Pemisahan senyawa dilakukan menggunakan kolom Poroshell 120 EC-C18 berukuran 3,0 × 50 mm dengan ukuran partikel 2,7 µm dan laju alir 0,4 mL/menit. Fase geraknya berupa campuran asetonitril (ACN) dan air yang mengandung 0,1% asam format, dengan program gradien sebagai berikut: menit ke-0 (10:90), menit ke-2 (90:10), menit ke-8 (70:30), menit ke-12 (50:50), menit ke-15 (80:20), dan menit ke-17–20 (95:5). Total waktu analisis mencapai 20 menit. Hasil identifikasi menunjukkan semua jenis senyawa yang terkandung dalam ekstrak *B. heracleifolia*.

3.5.6 Pengujian Antibakteri

Prosedur pengujian antibakteri menurut Fitriani dan Nashihah (2021), dijelaskan sebagai berikut:

1. Sterilisasi alat

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian terlebih dahulu dicuci menggunakan air mengalir hingga bersih, lalu dikeringkan. Untuk mencegah terjadinya kontaminasi selama proses pengujian, peralatan yang sudah kering harus dibersihkan kembali sebelum digunakan. Peralatan gelas seperti tabung reaksi, botol, cawan petri, serta spuit dibungkus menggunakan aluminium foil dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Sementara itu, alat

seperti jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara dipijarkan di atas nyala api bunsen.

2. Persiapan Media NA

Sebanyak 28 gram serbuk *Nutrient Agar* (NA) dilarutkan dalam 1000 ml air suling (akuades), lalu dipanaskan sambil diaduk secara berkala hingga larut dan tercampur merata. Setelah itu, media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, media didinginkan hingga mencapai suhu 45–50°C. Media kemudian dituangkan ke dalam cawan petri dan tabung reaksi steril, masing-masing sekitar 25 ml untuk cawan petri dan 5 ml untuk tabung reaksi (digunakan sebagai media agar miring). Media agar miring ini selanjutnya digunakan untuk proses inokulasi bakteri.

3. Peremajaan Bakteri

Sebanyak satu ose steril dari biakan murni *Propionibacterium acnes* diambil dan diinokulasikan dengan cara digoreskan pada media Nutrient Agar (NA), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

4. Persiapan Suspensi Bakteri

Satu ose steril *Propionibacterium acnes* diambil, lalu disuspensikan ke dalam 5 ml larutan NaCl 0,9% di dalam tabung reaksi. Larutan kemudian dihomogenkan hingga tingkat kekeruhannya sesuai dengan standar 0,5 McFarland.

5. Pembuatan larutan 0,5 McFarland

Sebanyak 0,05 ml larutan barium klorida (BaCl_2) 1% dicampurkan dengan 9,95 ml larutan asam sulfat (H_2SO_4) 1% di dalam tabung reaksi, lalu dikocok hingga tercampur secara merata.

6. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Kontrol negatif menggunakan larutan DMSO 10%, yang dibuat dengan melarutkan 10 mL DMSO murni ke dalam 100 mL akuades steril.

7. Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Larutan klindamisin digunakan sebagai kontrol positif. Larutan ini dibuat dengan melarutkan 100 mg serbuk klindamisin ke dalam 10 mL larutan DMSO 10%.

8. Persiapan Larutan Uji Ekstrak

Larutan uji ekstrak dibuat menggunakan metode pengenceran bertingkat. Sebanyak enam buah vial disiapkan untuk masing-masing konsentrasi. Pada vial 1, ditimbang ekstrak sebanyak 2 gram tanpa penambahan pelarut, sehingga mewakili konsentrasi 100%. Vial 2 hingga vial 6 masing-masing diisi dengan 1 mL larutan DMSO 10%. Selanjutnya, untuk membuat konsentrasi 50% pada vial 2, dimasukkan ekstrak sebanyak 1 gram ke dalam vial yang berisi 1 mL DMSO 10%. Selanjutnya, dilakukan pengenceran bertingkat sebagai berikut: ambil 1 mL larutan dari vial 2 dan masukkan ke dalam vial 3 untuk memperoleh konsentrasi 25%; ambil 1 mL dari vial 3 dan masukkan ke dalam vial 4 untuk konsentrasi 12,5%; ambil 1 mL dari vial 4 dan masukkan ke dalam vial 5 untuk konsentrasi 6,25%; dan terakhir, ambil 1 mL dari vial 5 dan masukkan ke dalam vial 6 untuk mendapatkan konsentrasi 3,125%.

9. Uji Aktivitas Antibakteri

Sebanyak 10 μ L suspensi *Propionibacterium acnes* ditetaskan di atas permukaan media *Nutrient Agar* (NA), lalu diratakan secara merata menggunakan *spreader*. Media dibiarkan selama beberapa menit agar suspensi bakteri dapat meresap ke dalam media. Selanjutnya, dibuat sumuran menggunakan pelubang gabus nomor 2. Ke dalam masing-masing sumuran dimasukkan larutan uji sebanyak 50 μ L, yang meliputi kontrol positif, kontrol negatif, serta ekstrak daun *Begonia heracleifolia* dengan konsentrasi bertingkat (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%), menggunakan mikropipet. Setiap sumuran diberi penanda sesuai jenis larutan yang dimasukkan. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam dalam posisi tegak. Setelah inkubasi, zona jernih yang terbentuk di sekitar sumuran diamati dan diameternya

diukur secara horizontal dan vertikal menggunakan jangka sorong. Nilai zona ditentukan dengan rumus sebagai berikut:

$$L = \frac{(D1-D3) + (D2-D3)}{2} \times 100\%$$

Keterangan:

L = Lebar Zona Hambat

D1 = Lebar Zona Hambat Horizontal

D2 = Lebar Zona Hambat Vertikal

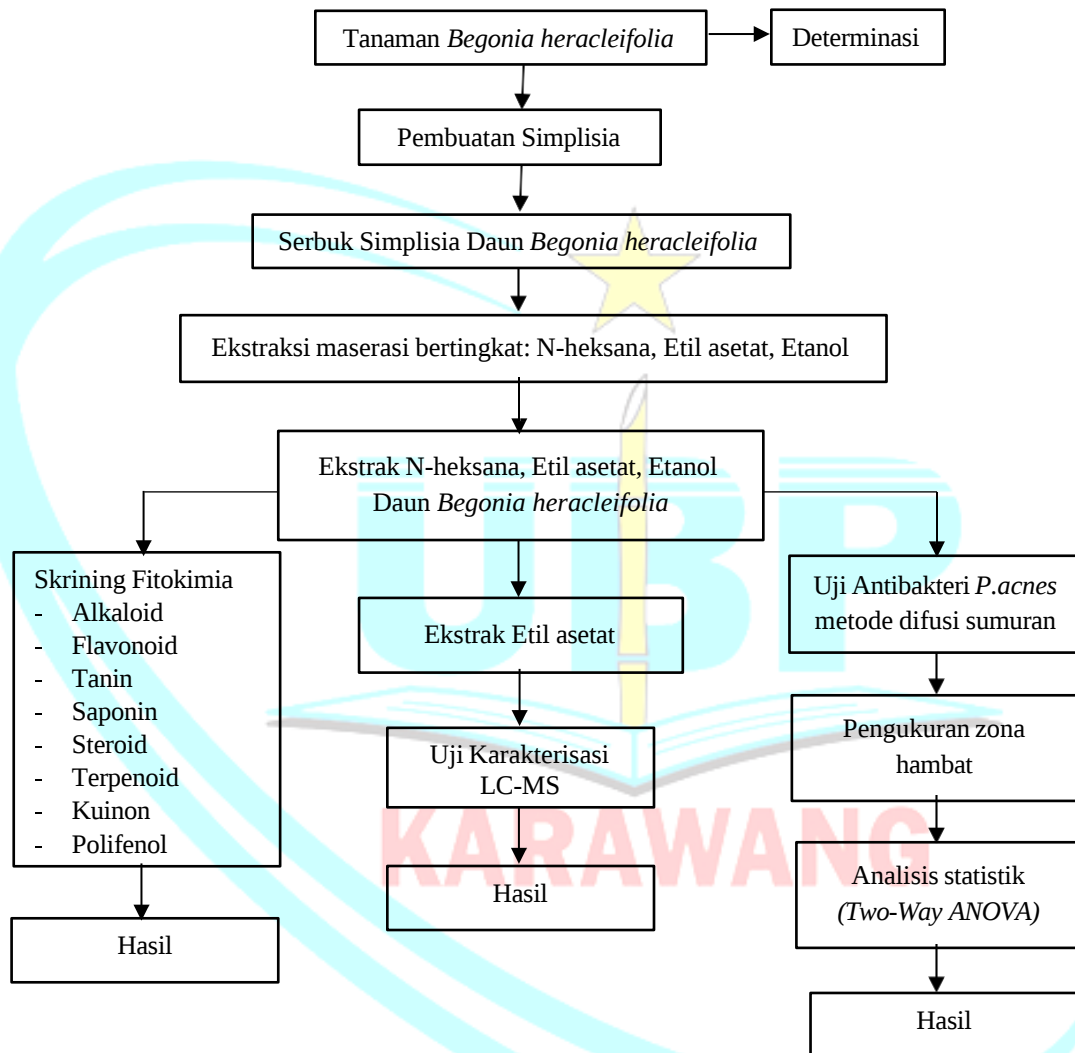
D3 = Diameter Sumuran

3.6 Analisis Data

Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun Begonia Tapak Hitam (*Begonia heracleifolia* Schltdl. & Cham.) dianalisis menggunakan metode *Two-Way ANOVA* dengan bantuan perangkat lunak GraphPad Prism versi 10. Analisis ini dilanjutkan dengan uji lanjutan *Tukey's Multiple Comparison Test* untuk mengetahui perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Perbedaan dianggap signifikan apabila diperoleh nilai $p \leq 0,05$.

3.7 Diagram Alir Penelitian

Rangkaian tahapan dalam penelitian ini ditunjukkan pada diagram alir berikut:



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian