

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental yang dilakukan dengan meneliti aktivitas antibakteri dari sampel hasil ekstrak etanol daun jeruk purut dengan menggunakan metode difusi di laboratorium Universitas Sahid Surakarta pada bulan April 2021.

3.2. Populasi dan Sampel

3.2.1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang diambil dari Klaten, Jawa Tengah.

3.2.2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75%.

3.3. Instrumen Penelitian

3.3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol coklat, inkas, pipet volume, autoklaf, blender (maspion), cawan petri (normax), inkubator (memmert), jangka sorong, jarum ose (lokal), kertas perkamen (lokal), kertas saring (lokal), kapas, neraca analitik (acis), *laminar air flow* (horizontal), oven (memmert), pinset (lokal), mikropipet (dragon onemed), lampu bunsen (lokal).

3.3.2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) berwarna hijau dan bebas dari hama dan penyakit yang diambil Klaten, Jawa Tengah. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Propionibacterium acnes*.

Bahan kimia yang digunakan adalah pelarut etanol 96% (supelco), kertas cakram (oxoid), akuadest, etanol, HCl, besi (III) klorida, larutan mayer, larutan Dragendrof, kalium tellurite, hydrogen peroksida, asetat anhidrida, asam sulfat pekat, asam asetat, cat kristal violet, larutan lugol iodine, cat safranin, dimethylsulfoksida (DMSO), BaCl₂ (calcium), H₂SO₄ pekat (millipore) dan NA (*Nutrient Agar*).

3.4. Variabel Penelitian

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan kedalam berbagai variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat.

- a. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan beberapa konsentrasi yaitu 25%, 50% dan 75%.
- b. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 96% daun jeruk purut terhadap *Propionibacterium acne* dengan metode difusi.

3.5. Definisi Operasional

Aktivitas antibakteri yang terjadi dapat dilihat dari respon bakteri uji terhadap pemberian ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar *paper disc*. Untuk menentukan efektivitas dari konsentrasi dapat diukur luas zona hambatannya dari masing-masing konsentrasi, karena setiap konsentrasi akan memiliki luas zona hambatan yang berbeda-beda (Mastra, 2018).

3.6. Jalannya Penelitian

3.6.1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian adalah melakukan determinasi tanaman jeruk purut yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi daun jeruk purut (*Citrus hystrix*

D.C) terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Program Studi Biologi Universitas Setia Budi Surakarta.

3.6.2. Pembuatan ekstrak

Serbuk daun jeruk purut sebanyak 800 gram dimasukkan kedalam botol coklat dan ditambah pelarut 4 liter etanol 96%. Campuran itu di diamkan selama 5 hari dan sesekali dikocok kemudian dipekatkan dalam *rotary evaporator* (Cinthya & Silalahi, 2020).

3.6.3. Identifikasi kandungan kimia pada ekstrak daun jeruk purut

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C). Identifikasi senyawa flavonoid, saponin, alkaloid, tannin dan steroid dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Sahid Surakarta.

a. Identifikasi Minyak Atsiri

Teteskan 1 tetes minyak atsiri pada sepotong kertas saring, bila dibiarkan minyak atsiri akan menguap sempurna tanpa meninggalkan noda lemak (transparan) (Pambudi, 2018).

b. Identifikasi flavonoid

Ekstrak etanol daun jeruk purut 0,5 g dicampur 5 ml air panas, lalu ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg, 2 ml alkohol-asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran dikocok kuat-kuat kemudian jika larutan terbentuk warna kuning jingga sampai merah, maka positif mengandung flavonoid (Mustikasari & Aryani, 2010).

c. Identifikasi saponin

Ekstrak sebanyak 0,5 g ditambahkan aquadestilata, kemudian dipanaskan selama 2 sampai 3 menit. Setelah dipanaskan tunggu sampai dingin lalu kocok dengan kuat. Adanya busa yang stabil dan setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang menandakan adanya kandungan saponin (Ramyashree *et al.*, 2012).

d. Identifikasi alkaloid

Ekstrak sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan aquadestilata. Setelah itu ditambahkan 1 ml HCl 2 N. Dibuat dalam 2 tabung. Tabung 1 ditambahkan reagen Mayer terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan. Tabung 2 ditambahkan reagen *Dragen droff* terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Harbone, 1997).

e. Identifikasi Tanin

Ekstrak sebanyak 0,5 g ditambahkan aquadestilata sampai terendam dan dipanaskan selama 3 sampai 5 menit. Kemudian ditambahkan 2 tetes larutan NaCl 10% lalu direaksikan dengan menambahkan FeCl_3 . Perubahan warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Harbone, 1997).

f. Identifikasi Steroid

Ekstrak sebanyak 0,5 g ditambahkan asam asetat glacial sebanyak 2 tetes dan asam sulfat pekat 2 tetes. Larutan dikocok perlahan, dibiarkan selama beberapa menit. Steroid memberikan warna biru atau hijau (Harbone, 1997).

3.6.4. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Propionibacterium acnes* dari biakan murni diambil kurang lebih 2-3 ose dan ditanam pada media NaCl fisiologis kekeruhan disetarakan dengan *Mc. Farland* 0,5 kemudian isolat diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-5 jam.

3.6.5. Identifikasi bakteri uji *Propionibacterium acnes*

Uji makroskopis dilakukan dengan cawan tuang, bakteri uji *Propionibacterium acnes* diinokulasikan pada media NA yang telah ditetesi darah manusia golongan O sebanyak 0,5 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C. penampakan membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen yang berwarna kehijauan (Grady *et al.*, 2005).

3.6.6. Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi

Metode difusi adalah metode menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi yang telah dibuat dan diinokulasi pada NA dengan metode

perataan dan medium didiamkan 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke media. Pada media tersebut dibuat 5 sumuran dengan menggunakan *disc* dengan jarak yang sama. Satu *disc* untuk blanko dan *disc* yang lain diisi ekstrak yang diuji dengan konsentrasi 75%, 50%, dan 25%, menggunakan kontrol positif adalah klindamisin 0,3% dan kontrol negatif adalah DMSO 10%. Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya. Pengukuran zona hambat yang ada disekitar *disc* dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri sekitar *disc* menandakan bahwa kandungan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) memiliki daya hambat terhadap *Propionibacterium acnes*. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Koeswardono, 1982).

Tabel 3.1 Kategori penghambatan antimikroba berdasarkan diameter zona hambat

Diameter (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤ 5 mm	Lemah
5 – 10 mm	Sedang
10 – 20 mm	Kuat
≥ 20 mm	Sangat Kuat

(Sumber : Ambarwati, 2007)

3.7. Analisa Data

Data yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) terhadap *Propionibacterium acnes* yang meliputi uji normalitas (*Kolmogorov test*), uji homogenitas (*Levene test*) dan uji perbedaan dari setiap sampel dengan *One-Way ANOVA* untuk melihat perbedaan zona hambat secara signifikan antara kelompok kontrol negatif, sampel dan kontrol positif.