

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode yang bersifat eksperimental di laboratorium. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2022 sampai dengan Juni 2022 di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Sains, Teknologi, Dan Kesehatan Universitas Sahid Surakarta.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri dari objek subjek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh penelitian untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulan (Sugiyono, 2017). Populasi pada penelitian ini adalah daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C).

3.2.2 Sampel

Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki populasi (Sugiyono, 2017). Sampel penelitian ini adalah fraksi n-Heksana, etil asetat, air, dan ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C).

3.3 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

- a. Alat : alat-alat gelas (*pyrex*), jarum ose (lokal), pinset (lokal), mikropipet (*Dragon onemed*), cawan petri (normax), autoklaf (GEA), inkubator (*memmert*), *stirrer* (IKA), lampu bunsen (lokal), oven (*memmert*), blender (Maspion), *Laminar Air Flow* (LAF) (*Biobase*), lemari pendingin (Toshiba), timbangan (*Acis*), neraca analitik (*Acis*), bunsen (lokal), dan *rotary evaporator* (*bio base*).
- b. Bahan : Ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C), fraksi (n-heksana, etil asetat, dan air) ekstrak etanol daun jeruk purut, n-heksana PA (Medika), etil asetat (Medika), etanol 96% (*Merck*), aquades (*Klins*), pereaksi *dragendorff*, pereaksi *mayer*, HCl pekat, FeCl₃, kloroform, H₂SO₄ pekat, asam asetat anhidrat, dimetilsulfoksida (*Merck*), Nutrient Agar (*Merck*), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (*merck*), klindamisin (*Merck*), *Propionibacterium acnes*, NaCl 0,9% steril, kertas saring (lokal), kertas perkamen (lokal), kapas steril (lokal), *aluminium foil* (lokal), dan kertas cakram (lokal).

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah obyek yang mempunyai variasi antara satu sama lainnya. Identifikasi variabel dalam penelitian digunakan untuk membantu dalam menentukan alat pengumpulan data, kemudian ditarik

kesimpulan variabel bebas dan variabel terikat (Sugiyono, 2017). Penelitian yang dilakukan terdapat dua variabel, antara lain:

a. Variabel bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah seri konsentrasi fraksi n-Heksana, etil asetat, air, dan ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) hasil dari metode fraksinasi partisi.

b. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah *skrining* fitokimia dan aktivitas antibakteri fraksi n-Heksana, etil asetat, air, dan ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *propionibacterium acnes* hasil dari metode fraksinasi partisi.

3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional penelitian merupakan suatu sifat ataupun nilai dari obyek atau kegiatan yang mempunyai variasi tertentu yang ditetapkan dalam peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulan (Sugiyono, 2017).

- a. Konsentrasi yang digunakan dalam masing-masing fraksi dari penelitian ini adalah 10%, 25%, dan 50%.
- b. Pelarut non polar adalah n-Heksana, yang digunakan dengan tujuan agar kandungan senyawa yang bersifat non polar larut dalam pelarut non polar.
- c. Pelarut semi polar adalah etil asetat, digunakan dengan tujuan agar kandungan senyawa yang bersifat semi polar dapat tersari.

- d. pelarut polar adalah air, digunakan dengan tujuan untuk kandungan senyawa yang bersifat polar larut dalam pelarut tersebut.
- e. *Propionibacterium acnes* adalah bakteri penyebab jerawat yang terjadi ketika lubang kecil pada permukaan kulit atau pori-pori tersumbat.
- f. Uji aktivitas antibakteri adalah suatu metode untuk menentukan tingkat kerentanan bakteri terhadap zat antibakteri dan untuk mengetahui senyawa murni yang memiliki aktivitas antibakteri.
- g. Zona hambat adalah zona yang ditandai dengan adanya daerah jernih pada medium biakan bakteri yang mampu menunjukkan adanya aktivitas bakteri yang dihambat oleh bakteri *Propionibacterium acnes*.

3.6 Rencana Jalannya Penelitian

3.6.1 Pembuatan Simplisia

Sampel daun jeruk purut (*Citrus Hysrix* D.C) segar dipetik dipagi hari agar senyawa termolabil dalam sampel tidak menguap karena paparan sinar matahari. Sampel dikumpulkan sebanyak 2,5 kg disortasi basah, dicuci bersih dibawah air yang mengalir dan ditiriskan. Kemudian dilakukan pengecilan ukuran dan dikeringkan di oven pada suhu 60 °C hingga meremah, selanjutnya dijadikan serbuk dengan ukuran *mesh* 60 (Setyaningrum, 2021).

3.6.2 Ekstraksi dan Fraksinasi

a. Ekstraksi

Serbuk daun jeruk purut (*Citrus Hysrix* D.C) yang diperoleh kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96%.

Simplisia direndam dalam pelarut dengan perbandingan 1:5 selama 8 hari pada suhu ruang dengan proses pengadukan setiap 1x24 jam. Maserat yang didapatkan, disaring kemudian diuapkan untuk memisahkan pelarutnya. Maserat yang diperoleh dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada temperatur 65 °C, kemudian ekstrak diuapkan dengan *waterbath* hingga didapat ekstrak kental (Melani, 2020).

b. Fraksinasi

Dilakukan fraksinasi antara ekstrak etanol dengan pelarut bertingkat yaitu pelarut n-Heksana, etil asetat, dan air dengan 4 kali replikasi. Ekstrak kental 10 gram dilarutkan dengan sedikit etanol 96% kemudian dimasukkan dalam corong pisah, ditambahkan pelarut n-heksana 100 mL digojog perlahan, setelah itu didiamkan sampai terjadi pemisahan larutan dan diambil fraksi n-heksana. Residu yang dihasilkan difraksi kembali dengan pelarut etil asetat 100 mL, digojog perlahan dan didiamkan sampai larutan mengalami pemisahan, didapatkan fraksi etil asetat. Sedangkan sisa sampel yang tidak juga larut dalam etil asetat dikumpulkan sebagai fraksi air. Ketiga fraksi yang didapat dilakukan pemekatan dengan *water bath* pada temperatur 50 °C hingga diperoleh fraksi yang kental (Nuari *et al.*, 2017).

3.6.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah uji pendahuluan dalam penelitian dengan tujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti. Skrining fitokimia dilakukan dengan melihat reaksi pada proses pengujian warna pada penggunaan suatu pereaksi (Kristanti *et al.*, 2008).

a. Minyak Atsiri

Skrining fitokimia minyak atsiri dengan meneteskan ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix D.C*) pada kertas saring. Positif mengandung minyak atsiri apabila bekas penetesan tidak meninggalkan noda. Minyak atsiri memiliki titik didih rendah sehingga mudah menguap pada suhu kamar (Rini *et al.*, 2017).

b. Alkaloid

Ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix D.C*) dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Tabung ditetesi HCl 0,5 N dan pereaksi *mayer*, apabila mengandung alkaloid maka ditandai adanya endapan kuning. Tabung ditetesi HCl 0,5 N dan pereaksi *dragendroff*, apabila endapan berwarna jingga maka mengandung alkaloid (Lany Indrayani, 2006).

c. Flavonoid

Ekstrak sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,5

mg. selanjutnya ditambahkan HCl pekat 3-5 tetes, positif flavonoid ditunjukkan dengan adanya warna *orange*, merah, hitam, hijau, dan jingga (Kursia *et al.*, 2016).

d. Saponin

Ekstrak sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL aquades hangat atau panas dikocok dan diamkan selama 5 menit. Apabila busa tidak hilang maka tambahkan HCl 2 N, jika masih ada busa yang stabil maka positif saponin (Harborne, 2006).

e. Tanin

Ekstrak sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditetesi dengan 3 tetes FeCl_3 . Positif tanin ditandai dengan adanya warna hijau kehitaman atau biru (Kursia *et al.*, 2016).

f. Terpenoid

Ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) diuapkan hingga kering, setelah itu residu yang didapatkan dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat. Selanjutnya campuran ditetesi dengan 2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung. Positif triterpenoid ditunjukkan dengan warna merah atau violet dan positif terpenoid ditunjukkan dengan warna hijau kebiruan (Harborne, 2006).

3.6.4 Pembuatan Seri Konsentrasi Fraksi

Fraksi yang telah dikentalkan kemudian dilakukan pembuatan berbagai konsentrasi 10%, 25%, dan 50%. Pelarut yang digunakan untuk mengencerkan fraksi kental adalah DMSO 10%. Konsentrasi 10% dibuat dengan menimbang 0,10 gram fraksi kental ekstrak etanol daun jeruk purut kemudian ditambah dengan DMSO 10% sebanyak 1 mL. Konsentrasi 25% dibuat dengan menimbang 0,25 gram fraksi kental kemudian ditambah DMSO 10% sebanyak 1 mL. Konsentrasi 50% dibuat dengan menimbang 0,5 gram fraksi kental kemudian ditambah DMSO 10% sebanyak 1 mL (Setyaningrum, 2021).

3.6.5 Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan pada semua peralatan yang akan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri ini. Alat-alat gelas disterilkan di oven dalam temperatur 170 °C selama 1 jam. Media disterilkan di autoklaf dalam temperatur 121 °C selama 15 menit. Jarum ose dan pinset disterilkan kembali sebelum digunakan dan sesudah digunakan dalam melakukan uji antibakteri di atas lampu bunsen (Cinthya & Silalahi, 2020).

b. Pembuatan Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Media MHA (*Mueller Hinton Agar*) dibuat dengan menimbang sejumlah 3,8 gram kemudian dilarutkan dalam 100

mL akuades, bila perlu dengan bantuan pemanasan. Selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit. Media MHA dituangkan pada cawan petri steril, didiamkan pada suhu kamar hingga memadat (Utomo *et al.*, 2018).

c. Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

Sebanyak 2,8 gram *Nutrient Agar* dilarutkan pada 100 mL akuades dan dipanaskan diatas *hot plate*. Sterilkan di autoklaf dalam waktu 15 menit pada temperatur 121 °C, kemudian dinginkan pada temperatur antara 45-50 °C. Menuangkan kedalam cawan petri sebanyak 15 mL, dihomogenkan dan dibiarkan memadat (Cinthya & Silalahi, 2020).

d. Pembuatan Standar Kekeruhan (*Larutan Mc. Farland*)

Sebanyak 99,5 mL larutan asam sulfat 1% v/v dan 0,5 mL larutan barium klorida 1,175% b/v. Dicampurkan kedua larutan diatas dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan sampai homogen untuk memperoleh suspensi dengan tingkat kekeruhan yang sebanding dengan kekeruhan dari larutan standar *Mc. Farland*. Konsentrasi suspensi bakteri uji dapat dinyatakan berjumlah 10^8 CFU/mL, apabila tingkat kekeruhan suspensi bakteri uji sama dengan kekeruhan larutan standar *Mc. Farland* (Cinthya & Silalahi, 2020).

e. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri *Propionibacterium acnes* dari biakan murni diambil 2-3 ose dan disuspensikan dengan NaCl 0,9%, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C. Pertumbuhan bakteri diamati hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc. Farland* (Cinthya & Silalahi, 2020).

f. Kultur bakteri *Propionibacterium acnes*

Bakteri *Propionibacterium acnes* yang sudah disuspensi dalam tabung reaksi kemudian diambil dengan kapas lidi steril, kemudian ditambahkan pada media NA (*nutrient agar*) dengan cara menggoreskan dengan kapas lidi steril yang berisi bakteri uji secara merata ke seluruh permukaan media. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 - 48 jam, diamati pertumbuhan bakterinya (Nugrahani, 2020).

g. Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah dimetilsulfoksida (DMSO) 10%, dikarenakan DMSO merupakan pelarut organik serta tidak memiliki sifat bakterisidal. Pernyataan tersebut menandakan bahwa DMSO tidak mempunyai aktivitas antibakteri, maka dapat dipastikan aktivitas antibakteri yang diperoleh tidak dipengaruhi secara langsung oleh DMSO (Amalia *et al.*, 2016). DMSO juga memiliki manfaat sebagai pelarut

ekstrak kental dalam pembuatan seri konsentrasi (Cinthya & Silalahi, 2020).

h. Kontrol Positif

Antibiotik klindamisin digunakan dengan tujuan sebagai pembanding dengan melihat zona hambat pada bakteri uji (Ninla *et al.*, 2014). Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini yaitu antibiotik klindamisin 0,2%. Zat ini dibuat dengan cara melarutkan 20 mg klindamisin ke dalam 10 mL akuades (Setyaningrum, 2021). Klindamisin memiliki sifat bakteristatik, bekerja dengan menghambat pertumbuhan bakteri (Astika, Candra, dan Senja, 2020).

i. Uji Terhadap Bakteri

Semua alat dan bahan yang akan digunakan disterilkan. Ekstraksi yang dilakukan menggunakan pelarut etanol 96%. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi pada media agar menggunakan kertas cakram (*paper disc*). Uji aktivitas antibakteri dilakukan secara 3 kali replikasi. Kertas cakram dicelupkan kedalam sampel yaitu ekstrak etanol 96% daun jeruk purut dengan masing-masing konsentrasi fraksi, kontrol (positif dan negatif), kemudian diletakkan diatas media MHA yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Inokulasi dilakukan dengan suhu 37 °C selama 24 jam. Pengamatan hasil uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan terbentuknya zona

hambat disekitar kertas cakram. Antibiotik klindamisin sebagai kontrol positif digunakan sebagai pembanding yang dilihat zona hambatnya pada mikroba uji dan DMSO sebagai kontrol negatif (Cinthya dan Silalahi, 2020).

3.6.6 Pengamatan dan Pengukuran Diameter Hambatan

Pengamatan hasil uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram. Pengukuran zona hambat 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*. Pengamatan dan pengukuran diameter zona hambatan setelah masa inkubasi 1 x 24 jam pada suhu 37 °C. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Koeswardono, 1982). Luas zona hambatan yang terbentuk pada media diukur dengan menggunakan jangka sorong. Pengukuran zona hambatan dilakukan untuk semua replikasi kemudian data yang diperoleh dihitung rata-ratanya (Cinthya & Silalahi, 2020).

Tabel 3.1 Klasifikasi Respon Zona Hambat

Diameter zona hambat	Respon hambatan pertumbuhan
≥ 20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

(Sumber: Ambarwati, 2007)

3.7 Analisis Data

Data yang didapat dari uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan metode partisi terhadap *Propionibacterium acnes* dilakukan uji normalitas keseluruhan data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* yang bertujuan untuk menguji normalitas distribusi nilai sampel dengan melihat distribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan uji *levene test* yang bertujuan untuk menguji keseragaman nilai sampel dengan melihat kehomogenitas data tersebut. Setelah itu diolah menggunakan perangkat komputer software SPSS 16.0 (*Statistic Program for Social Science*) menggunakan uji *One Way ANOVA (Analysis of variance)*, untuk melihat perbedaan zona hambat secara signifikan antara kelompok sampel, kontrol negatif, dan kontrol positif. Terakhir dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD* (uji nyata jujur), uji ini dilakukan untuk melihat adanya perbedaan yang lebih spesifik antara kelompok sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif.