

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan suatu penelitian eksperimental di laboratorium yang dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut hasil fraksinasi metode partisi terhadap bakteri *S. epidermidis*. Pengujiannya dengan menggunakan metode difusi dan dilakukan dari bulan Februari 2022 hingga Mei 2022 di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains, Teknologi, dan Kesehatan Universitas Sahid Surakarta.

#### **3.2. Populasi dan Sampel**

##### **3.2.1. Populasi**

Dalam penelitian kali ini, populasinya adalah daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C).

##### **3.2.2. Sampel**

Sampel dari penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C).

### 3.3. Instrumen Penelitian

Instrumen yang akan digunakan pada penilitan kali ini adalah sebagai berikut:

- a. Alat : Alat-alat gelas (pyrex), blender (Maspion), cawan petri (normax), autoklaf (GEA), *stirrer* (IKA), lampu bunsen (lokal), inkubator (Memmert), timbangan (Acis), *Laminar Air Flow* (LAF) (Biobase), jarum *ose* (lokal), jangka sorong (Kenmaster), neraca analitik (Acis), lemari pendingin (Toshiba), mikropipet (*Dragon Onemed*), kertas cakram (lokal), *rotary evaporator* (IKA), *waterbath* (Memmert), dan oven (Memmert).
- b. Bahan : Ekstak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C), fraksi n-Heksana, Etil asetat, dan Air daun jeruk purut, pelarut n-Heksana PA (lokal), pelarut Etil asetat (lokal), pereaksi *dragendorff*, pereaksi *mayer*, HCl pekat, FeCl<sub>3</sub>, kloroform, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, asam asetat anhidrat (Medika), kertas saring (lokal), kapas (lokal), kassa steril, kertas perkamen (lokal), *aluminium foil* (lokal), *Nutrient Agar* (NA) (Merck), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Merck), *Staphylococcus epidermidis* (USB), akuades (Klins), klindamisin, etanol 96% (Medika), dimetilsulfoksida (DMSO), dan NaCl 0,9% steril.

### 3.4. Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini, terdapat dua variabel sebagai berikut:

#### 3.4.1. Variabel Bebas

Pada penelitian kali ini, variabel bebasnya adalah seri konsentrasi dari ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) hasil dari metode fraksinasi partisi.

#### 3.4.2. Variabel Terikat

Uji skrinning fitokimia dan aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) hasil dari metode fraksinasi partisi dalam menghambat laju pertumbuhan *S. epidermidis* menjadi variabel terikat pada penelitian ini.

### 3.5. Definisi Operasional

- a. Konsentrasi dari ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang digunakan adalah 10%, 25%, dan 50%. Hal ini berpengaruh pada daya hambat pertumbuhan bakteri yang nantinya akan dihasilkan (Rastina, *et al.*, 2006).
- b. Bakteri *S. epidermidis* adalah bakteri penyebab jerawat yang muncul pada kulit manusia. Bakteri tersebut dibiakkan dengan menggunakan

media NA (*nutrient agar*) dan diujikan pada empat sampel penelitian yang meliputi ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C).

- c. Aktivitas antibakteri adalah kemampuan suatu sampel untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji, dinyatakan positif jika pemberiannya menghasilkan suatu zona hambat setelah dicampurkan pada bakteri uji (*S. epidermidis*).
- d. Zona hambat adalah zona yang muncul akibat terhambatnya pertumbuhan bakteri uji (*S. epidermidis*). Zona ini ditandai dengan terbentuknya daerah jernih yang pada area kertas cakram sampel yang tengah diuji aktivitas antibakterinya. Zona hambat dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

### **3.6. Rencana Jalannya Penelitian**

#### **3.6.1. Pembuatan Simplisia**

Sampel daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) segar sebanyak 3 kg dipetik di pagi hari agar senyawa yang bersifat termolabil di dalam sampel tidak rusak karena terkena sinar matahari. Sampel disortasi basah, dicuci dengan air mengalir, ditiriskan, dan dipotong menjadi kecil-kecil. Sampel kemudian dikeringkan pada suhu 60 °C di dalam oven hingga meremah dan diserbukan dengan ukuran *mesh* 60 (Anggraheni, 2021).

### 3.6.2. Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Purut

Sebanyak 2.445 gram serbuk daun jeruk purut yang telah diperoleh dimaserasi dengan menggunakan etanol 96%. Simplisia tersebut direndam dalam pelarut dengan perbandingan 1:5 selama 8 hari pada suhu ruang, pengadukan dilakukan setiap 1 x 24 jam. Hasil yang diperoleh disaring, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* dilanjutkan dengan *waterbath* hingga pelarutnya hilang dan didapatkan ekstrak yang kental (Anggraheni, 2021).

### 3.6.3. Fraksinasi Ekstrak

Proses fraksinasi dilakukan dengan metode partisi, diawali dengan menggunakan pelarut non polar terlebih dahulu (n-Heksana). Diambil ekstrak etanol sebanyak 40 g, ditambahkan 200 mL etanol dan 500 mL akuades lalu dihomogenkan, dimasukkan ke dalam corong pisah. Sampel kemudian difraksinasi dengan 250 mL n-Heksana, digojog, dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan. Fraksi n-Heksana dikumpulkan. Proses fraksinasi diulang kembali sampai lapisan n-Heksana jernih.

Setelah didapat fraksi n-Heksana, langkah selanjutnya adalah membuat fraksi Etil asetat dan Air. Sampel yang tidak larut dalam n-Heksana kemudian difraksinasi menggunakan Etil asetat dengan perbandingan 1:1. Dilakukan refraksi sebanyak 2 kali baru setelah itu hasilnya dikumpulkan. Sedangkan sisa sampel yang

tidak larut dalam Etil asetat dikumpulkan sebagai fraksi Air (Maravirnadita, 2018).

Fraksi-fraksi yang telah didapat selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental. Sampel kemudian dikeringkan untuk menghilangkan pelarutnya dan dihitung rendeman yang diperoleh (Sertini, 2016).

#### **3.6.4. Skrinning Fitokimia**

Menurut Kristanti (2008), skrinning fitokimia adalah suatu uji pendahuluan yang dilakukan dengan tujuan mengetahui senyawa apa yang terkandung di dalam sampel yang sedang diteliti. Tahap ini dapat dilakukan dengan menggunakan reaksi pengujian warna sebagai berikut:

a. Minyak Atsiri

Digunakan uji bercak dengan cara meneteskan 1 tetes sampel pada sepotong kertas saring lalu dibiarkan sejenak hingga menguap. Hasil dinyatakan positif jika tidak terdapat noda lemak pada kertas tersebut (Faisal, *et al.*, 2016).

b. Alkaloid

Ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut diuapkan hingga kering kemudian ditambahkan 1,5 – 2% larutan HCl dan dibagi menjadi tiga tabung. Masing-masing tabung ditambahkan pereaksi

*dragendorff*. Hasil dinyatakan positif jika terbentuk endapan merah kecoklatan (Indrayani, *et al.*, 2006).

c. Flavonoid

0,01 g ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, etil asetat, dan air ekstrak dimasukkan ke dalam tabung rekasi kemudian ditambahkan 0,05 mg serbuk magnesium, lalu ditambahkan 1 – 2 tetes HCl pekat. Hasil dinyatakan positif jika sampel menunjukkan warna kuning, hitam, hijau, jingga, dan oranye (Kursia, *et al.*, 2016).

d. Tanin

$\text{FeCl}_3$  diteteskan ke dalam 0,01 g sampel. Hasil dinyatakan positif jika tercipta warna biru (Kursia, *et al.*, 2016).

e. Saponin

0,01 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 mL air hangat, dikocok selama 30 menit. Setelah itu diamati busa yang timbul. Sampel kemudian didiamkan selama 5 menit. Jika busa tidak hilang, ditambahkan HCl 2 N. Hasil dinyatakan positif jika busa konstan (tidak hilang) (Kursia, *et al.*, 2016).

f. Terpenoid

Menguapkan sampel ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut hingga kering kemudian dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Sampel selanjutnya ditetesi 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Hasil dinyatakan positif jika terbentuk warna hijau kebiruan (Indrayani, *et al.*, 2006).

### **3.6.5. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Etanol, Fraksi n-Heksana, Etil asetat, dan Air Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut**

Ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut yang telah dikentalkan kemudian dibuat berbagai konsentrasi, antara lain 10%, 25%, dan 50%. Konsentrasi 10% dibuat dengan cara menimbang 0,1 g sampel kental kemudian ditambahkan DMSO 10% sebanyak 1 mL. Konsentrasi 30% dibuat dengan cara menimbang 0,25 g fraksi kental ekstrak etanol daun jeruk purut kemudian ditambahkan DMSO 10% sebanyak 1 mL, dan konsentrasi 50% dengan cara menambahkan DMSO 10% sebanyak 1 mL ke dalam 0,5 g sampel fraksi kental ekstrak etanol daun jeruk purut (Anggraheni, 2021).

### **3.6.6. Uji Aktivitas Antibakteri**

Uji aktivitas antibakteri meliputi beberapa tahap, antara lain:

- a. Sterilisasi Alat

Tahap sterilisasi alat dilakukan untuk memastikan semua alat berada di dalam keadaan steril dan tidak tercemar bakteri lain selain bakteri uji. Alat-alat gelas disterilkan dengan oven pada suhu 170 °C selama 1 jam sedangkan media disterilkan dengan autoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Untuk jarum *ose* dan pinset sterilisasinya menggunakan lampu bunsen dan dilakukan setiap sebelum dan sesudah pemakaian (Silalahi *et al.*, 2020).

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

Sebanyak 3,8 g *Mueller Hinton Agar* (MHA) dilarutkan ke dalam 100 mL akuades, kemudian dipanaskan di atas *hot plate*. Media selanjutnya disterilkan di dalam autoklaf pada 121 °C selama 15 menit lalu didinginkan pada suhu 45 – 50 °C. Sebanyak 15 mL media dituang ke dalam cawan petri secara aseptis di dalam LAF (*Laminar Air Flow*), kemudian didiamkan hingga memadat dan disimpan dalam suhu 4 °C (Utomo, *et al.*, 2018).

c. Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

Dilarutkan sebanyak 2 g NA ke dalam 1 mL akuadestilata dan dipanaskan di atas *hot plate*. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit kemudian didinginkan pada suhu 45 – 50 °C. Media kemudian dituang di cawan petri, dihomogenkan, dan dibiarkan memadat (Maimunah, *et al.*, 2020).

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

Mencampurkan 99,5 mL larutan asam sulfat 1% v/v dan 0,5 mL larutan barium klorida 1,175% b/v dalam tabung reaksi, kemudian dihomogenkan hingga memperoleh tingkat kekeruhan yang sebanding dengan kekeruhan dari larutan standar *Mc Farland*. Konsentrasi suspensi dapat dikatakan sama dengan kekeruhan *Mc Farland* jika bakteri ujinya berjumlah 108 CFU/mL (Maimunah, *et al.*, 2020).

e. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri yang sebelumnya sudah diinokulasikan di media agar diambil, kemudian disuspensikan ke dalam 2 mL larutan NaCl 0,9% dan diinkubasi pada suhu 37 °C, sehingga mendapat kekeruhan yang sama dengan larutan standar *Mc Farland* (Maimunah, *et al.*, 2020).

f. Kultur Bakteri *S. epidirmidis*

Suspensi bakteri diambil dengan kapas lidi steril kemudian ditambahkan pada media MHA dengan cara menggoreskan kapas lidi steril ke seluruh permukaan media. Sampel selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 – 48 jam dan diamati pertumbuhan bakterinya (Nugrahani, *et al.*, 2021).

g. Uji Aktivitas Antibakteri pada Ekstrak etanol, Fraksi n-Heksana, Etil asetat, dan Air Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut terhadap *S. epidirmidis*

Dilakukan secara triplo dengan menggunakan metode difusi pada media agar menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dicelupkan ke dalam sampel; baik ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, etil asetat, maupun air ekstrak etanol daun jeruk purut dengan konsentrasi 10%, 25%, dan 50%. Kontrol positif berupa klindamisin 0,2% dan kontrol negatif berupa DMSO 10%, kemudian diletakkan di atas media NA yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu, diamati terbentuk atau tidaknya zona hambat di sekitar kertas cakram. Sampel dinyatakan positif mengandung aktivitas antibakteri jika terbentuk zona hambat seperti yang ada pada kontrol positif (Maimunah, *et al.*, 2020).

#### 1) Kontrol Negatif

Pada penelitian kali ini, yang digunakan sebagai kontrol negatif adalah DMSO 10%. Pemilihan bahan ini didasarkan oleh sifat DMSO yang merupakan pelarut organik dan tidak bersifat bakterisidal sehingga dapat dipastikan senyawa ini tidak akan mengganggu pertumbuhan bakteri uji (Amalia dan Haitami, 2016).

#### 2) Kontrol Positif

Antibiotik klindamisin dengan konsentrasi 0,2% dipilih untuk menjadi kontrol positif pada penelitian ini, dibuat

dengan cara melarutkan 20 mg klindamisin ke dalam 10 mL akuades (Kristianto, 2014).

Setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam, sampel kemudian dihitung diameter hambatannya dengan menggunakan jangka sorong. Berikut kategori hasilnya:

**Tabel 3.1 Kategori penghambatan antimikroba**

<b>Diameter (mm)</b>	<b>Respon Hambatan Pertumbuhan</b>
$\leq 5$ mm	Lemah
5 – 10 mm	Sedang
10 – 20 mm	Kuat
$\geq 20$ mm	Sangat kuat

(sumber: Ambarwati, 2007)

### 3.7. Analisis Data

Setelah memperoleh data aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut hasil fraksinasi dengan menggunakan metode partisi terhadap bakteri *S. epidermidis* dari hasil penelitian, data tersebut kemudian dianalisis. Pengujiannya menggunakan *oneway ANOVA (Analysis of Variance)* untuk melihat perbedaan zona hambat secara signifikan antara kelompok sampel, kontrol negatif, dan kontrol positif. Namun sebelumnya perlu dilakukan uji pendahuluan berupa uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu sebagai syarat pengerjaannya. Oleh karena itu, tahap pertama yang dilakukan adalah menguji normalitas keseluruhan data menggunakan *Shapiro-wilk test* untuk melihat data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Selanjutnya dilakukan *levene test* untuk melihat

kehomogenitasannya. Jika data telah terbukti terdistribusi normal dan homogen, berarti syarat uji *ANOVA* telah terpenuhi dan dapat dilakukan. Selain itu dilaksanakan pula uji lanjutan berupa uji *Tukey* HSD untuk mengetahui lebih lanjut ada atau tidaknya perbedaan rata-rata yang signifikan dari setiap data yang diperoleh.