

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat eksperimental untuk mengetahui aktivitas antibakteri faksi ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan cara maserasi kemudian difraksinasi dengan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV) berturut-turut dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan air, hasil fraksi n-heksan, etil asetat dan air diujikan pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* . Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi dan dilaksanakan pada bulan juni 2022 sampai dengan agustus 2022 di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains, Teknologi, dan Kesehatan Universitas Sahid Surakarta.

3.2 Populasi dan Sampel

- a. Populasi adalah keseluruhan subjek penelitian. Populasi pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C).
- b. Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut. Sampel penelitian ini adalah fraksi n-heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan seri konsentrasi 2,5%, 5% dan 10%.

3.3 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Alat : Autoklaf (AGM), blender (maspion), cawan petri (normax), tabung reaksi (*pyrex*), beakerglass (*pyrex*), Magnet stirrer, incubator (memmert), jangka sorong, jarum ose (lokal), lemari pendingin, timbangan, neraca analitik (acis), *laminar air flow* (LAF) (memmert), oven (memmert), pinset (lokal), mikropipet (*dragon onemed*), dan lampu bunsen (lokal).

- b. Bahan : Ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C), *Nutrient agar* (NA) (Merck), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (merck), *Staphylococcus epidermidis* (USB), *akuades pro injeksi*, etanol 96% (medika), Klindamisin, dimetilsulfoksida (DMSO), NaCl 0,9% steril, kertas saring (lokal), kapas, kassa steril, kertas perkamen (lokal), alumunium foil dan kertas cakram.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah segala sesuatu yang berbentuk apa saja dan diterapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan diteliti sehingga diperoleh informasi tentang hal tersebut, kemudian ditarik kesimpulan variabel bebas dan variabel terikat.

a. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mampu mempengaruhi atau menjadi penyebab terjadinya perubahan atau timbulnya variabel terikat. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah seri konsentrasi fraksi n-heksana, etil asetat dan air ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C).

b. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri fraksi n-heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis*.

3.5 Definisi Operasional

Pembuatan fraksi n-heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun

a. Konsentrasi

Konsentrasi dalam pengujian aktivitas antibakteri sangat berpengaruh terhadap besar kecilnya zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*. Dinyatakan dalam garis besar semakin tinggi pengenceran maka semakin sedikit kandungan antibakteri yang terdapat didalamnya sehingga semakin kecil zona hambat yang terbentuk (Mastra, 2018). Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian ini antara lain 10 %, 5 % dan 2,5 %.

b. Aktivitas antibakteri

ditandai dengan adanya respon dari bakteri uji terhadap pemberian fraksi n-heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yaitu dengan terbentuknya zona bening di sekitar *paper disc* yang kemudian diukur luasnya karena setiap konsentrasi akan memiliki luas zona hambatan yang berbeda beda. Faktor yang mempengaruhi ukuran daerah penghambatan salah satunya adalah konsentrasi antibakteri karena setiap seri konsentrasi ekstrak memiliki kemampuan berbeda-beda dalam menghambat pertumbuhan bakteri (Mastra, 2018)

c. Fraksinasi

Merupakan proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran (padat, cair, terlarut, suspensi atau isotop) dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi) komposisi perubahan menurut kelandaian. Pembagian atau pemisahan ini didasarkan pada bobot dari tiap fraksi, fraksi yang lebih berat akan berada paling dasar sedang fraksi yang lebih ringan akan berada di atas. Fraksinasi bertingkat biasanya menggunakan pelarut organik seperti eter, aseton, benzena, etanol, diklorometana, atau campuran pelarut tersebut. Asam lemak, asam resin, lilin, tanin, dan zat warna adalah bahan yang penting dan dapat diekstraksi dengan pelarut organik (Adijuwana dan Nur 1989). Fraksinasi bertingkat umumnya diawali dengan pelarut yang kurang polar dan dilanjutkan dengan pelarut yang

lebih polar. Tingkat polaritas pelarut dapat ditentukan dari nilai konstanta dielektrik pelarut (Lestari dan Pari 1990)

3.6 Jalannya Penelitian

a. Pembuatan Simplisia

Sampel daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) segar yang di petik di pagi hari sebanyak 15 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.

b. Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Purut

Serbuk daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang diperoleh sebanyak 2445 gr kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96%. Simplisia direndam dalam pelarut sebanyak 12245 mL (perbandingan 1:5) selama 5 hari pada suhu ruang dengan proses pengadukan setiap 1x24 jam. Hasil yang diperoleh disaring kemudian diuapkan untuk memisahkan pelarutnya. Penguapan dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator*, selanjutnya ekstrak diuapkan dengan *waterbath* hingga di dapat ekstrak kental (Kristanti *et al.*, 2008).

c. Proses fraksinasi kromatografi cair vakum (KCV)

Ditimbang serbuk silika gel 60 Merck, dimasukkan ke dalam kolom sedikit demi sedikit sampai dua pertiga tinggi kolom dan pompa vakum dijalankan. Kemudian permukaan ditekan sampai terbentuk

lapisan yang cukup padat. Selanjutnya pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan pada permukaan kolom dan pompa dijalankan setelah pelarut terhisap hingga kering kolom telah siap untuk dipakai. Ditimbang ekstrak sebanyak 50% dari silika gel 60 yang digunakan untuk membuat kolom. Kemudian ditimbang silika gel 60 sama banyak dengan jumlah berat ekstrak. Campurkan ekstrak dengan silika gel 60 sedikit demi sedikit kemudian di aduk sampai didapat ekstrak kering yang mudah mengalir. Selanjutnya dituangkan pada kolom dengan merata, kemudian ditutup dengan aluminium foil. Menuangkan fase gerak dengan tingkat kepolaran terendah ke tertinggi yaitu n-heksana, etil asetat, dan air. Hasil fraksinasi dikentalkan dengan diangin – anginkan atau diuapkan di atas waterbath dan ditimbang beratnya

d. Skrining Fitokimia

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

1) 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).

2) Alkaloid

Ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) diuapkan sampai kering, kemudian residu ditambah 1,5–2% HCl dan larutan dibagi dalam tiga tabung. Tabung 1 larutan ditambah 3 tetes pereaksi *Dragendorff*, dan tabung 2 ditambah 3 tetes pereaksi *Mayer*. Jika tabung 1 terbentuk endapan jingga dan pada tabung 2 terbentuk endapan kekuning-kuningan menunjukkan adanya alkaloid (Lany Indrayani, 2006).

3) Flavonoid

Ekstrak sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,5 mg lalu ditambahkan HCl pekat 3 tetes. Warna kuning, hijau, hitam jingga dan orange, menunjukkan positif flavonoid (Kursia *et al.*, 2016)

4) Saponin

Ekstrak sebanyak 0,1 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air hangat atau panas lalu dikocok selama 30 menit. Dilihat busanya dan diukur berapa cm busa yang terbentuk. Dibiarkan selama 5 menit dan jika busanya tidak hilang ditambahkan HCl 2 N. Apabila masih terdapat busa yang konstan maka menunjukkan hasil yang positif (Kursia *et al.*, 2016)

5) Tanin

Ekstrak sebanyak 0,1 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 3 tetes FeCl₃. Warna biru menunjukkan keberadaan tanin (Kursia *et al.*, 2016)

6) Terpenoid

Ekstrak etanol 96 % daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) diuapkan sampai kering, kemudian residu yang dihasilkan dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya campuran ini ditetesi dengan 2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpen, sedangkan munculnya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya terpenoid (Lany Indrayani, 2006).

e. Pembuatan Konsentrasi Fraksi Ekstrak Daun Jeruk Purut

Fraksi ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya dilakukan pembuatan berbagai konsentrasi. Konsentrasi fraksi ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang digunakan antara lain 2,5%, 5% dan 10%. Fraksi Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan konsentrasi 10% dibuat dengan menimbang sebanyak 1 g fraksi ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) kemudian ditambahkan dimetilsulfoksida (DMSO) 10% sebanyak 10 mL. Fraksi Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan konsentrasi 2,5% dibuat dengan menimbang sebanyak 0,25 g fraksi ekstrak daun jeruk purut (*Citrus*

hystrix D.C) kemudian ditambahkan dimetilsulfoksida (DMSO) 10% sebanyak 10 mL. Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan konsentrasi 5% dibuat dengan menimbang sebanyak 0,5 g Fraksi ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) kemudian ditambahkan dengan dimetilsulfoksida (DMSO) 10% sebanyak 10 mL.

g. Kontrol Negatif (DMSO)

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah dimetilsulfoksida (DMSO) 10% karena pelarut ini merupakan pelarut organik dan tidak bersifat bakterisidal. Hal ini menandakan bahwa dimetilsulfoksida (DMSO) tidak memiliki aktivitas antibakteri, sehingga dapat dipastikan aktivitas antibakteri yang dihasilkan tidak dipengaruhi secara langsung oleh dimetilsulfoksida (DMSO) (Amalia *et al.*, 2016).

h. Kontrol Positif (Klindamisin 0,2%)

Klindamisin digunakan sebagai kontrol positif. Kadar yang sensitif terhadap bakteri uji yaitu 20 µg. Kontrol positif klindamisin yang digunakan adalah klindamisin tablet dan pembuatannya dengan melarutkan 20 mg klindamisin dalam 10 mL aquades. (Cinthya & Silalahi, 2020)

i. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri ini, disterilkan terlebih dahulu sebelum dipakai. Alat-alat gelas disterilkan didalam oven pada suhu 170°C selama 1 jam. Media disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Jarum *ose* dan pinset di

sterilkan kembali pada setiap sebelum digunakan dan sesudah digunakan dalam melakukan uji antibakteri diatas lampu bunsen (Cinthya & Silalahi, 2020).

j. Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

Sebanyak 20 gram *Nutrient Agar* (NA) dilarutkan dalam 1 liter *aquades pro* injeksi dan di panaskan di atas *hot plate* selanjutnya disterilkan di autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit kemudian didinginkan dengan suhu antara 45°C - 50°C. Tuang ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL lalu homogenkan dan biarkan memadat (Cinthya & Silalahi, 2020).

k. 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 di atas dalam tabung reaksi dan divortex sampai homogen. Sehingga diperoleh suspensi dengan tingkat kekeruhan yang dikenal dengan kekeruhan *Mc. Farland*. Apabila kekeruhan suspensi bakteri uji sama dengan kekeruhan suspensi *Mc. Farland*, maka konsentrasi suspensi bakteri uji adalah 108 CFU/mL (Cinthya & Silalahi, 2020).

l. Pembuatan Suspensi Bakteri uji

Bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang telah diinokulasi dalam media agar miring diambil dengan kawat *ose* steril lalu disuspensikan kedalam tabung yang berisi 2 mL larutan NaCl 0,9% lalu di inkubasi dengan suhu 37°C. Diamati pertumbuhan bakteri dalam tabung reaksi

hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc.Farland* (Cinthya & Silalahi, 2020).

m. Kultur Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang sudah disuspensi dalam tabung reaksi kemudian diambil dengan kapas lidi steril, lalu ditambahkan pada media agar Na dengan cara menggores dengan kapas lidi steril yang berisi bakteri uji secara merata ke seluruh permukaan media. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 sampai 48 jam dan diamati pertumbuhan bakterinya (Nugrahani, 2020).

n. Uji Aktivitas Antibakteri

Pada fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air Ekstrak etanol Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C) terhadap *Staphylococcus epidermidis*. Semua alat dan bahan yang akan digunakan di sterilkan. Ekstraksi yang dilakukan menggunakan pelarut etanol 96%. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan kertas cakram (*paper disc*). Uji aktivitas antibakteri dilakukan secara triplo. Kertas cakram dicelupkan kedalam sampel yaitu masing – masing pada fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, kontrol positif klindamisin 0.2% dan kontrol negatif dimetilsulfoksida (DMSO) 10%, kemudian diletakkan di atas media NA yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Inkubasi dilakukan dengan suhu 37°C

selama 24 jam. Pengamatan dilakukan terhadap terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram. Antibiotik klindamisin sebagai kontrol positif digunakan sebagai pembanding yang dilihat zona hambatnya pada mikroba uji dan dimetilsulfoksida (DMSO) sebagai kontrol negatif dan yang digunakan untuk melarutkan ekstrak kental dalam pembuatan seri konsentrasi (Cinthy & Silalahi, 2020).

o. Pengamatan dan Pengukuran Diameter Hambatan

Pengamatan dan pengukuran diameter zona hambatan dilakukan setelah masa inkubasi 1 x 24 jam pada suhu 37°C. 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 (Cinthy & Silalahi, 2020).

Tabel 3.6 Kategori penghambatan antimikriba 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 fraksi n-Heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dilakukan uji normalitas keseluruhan data menggunakan *Kolmogorov test* untuk melihat distribusi normal. Selanjutnya dilakukan *Levene test* untuk melihat homogenitas data Berdasarkan hasil normalitas dan

homogenitas yang didapat kemudian dianalisis menggunakan *Oneway ANOVA* (*Analisis Of Variance*) untuk melihat perbedaan zona hambat secara signifikan antara kelompok fraksi n-Heksana,etil asetat, air ekstrak daun jeruk purut, klindamisin (kontrol positif), dan DMSO (kontrol negatif).