

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental dilaboratorium yang meliputi pengambilan sampel, pemeriksaan makroskopis, pembuatan simplisia, pemeriksaan karakteristik, penapisan fitokimia, pembuatan ekstrak etanol daun jeruk purut. Pemisahan tersebut difraksinasi dengan metode Kromatografi Cair Vacum (KCV) menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan air. Pelarut yang diperoleh kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* menggunakan metode difusi agar. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni 2022 sampai dengan Agustus 2022 di laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Sains, Teknologi, dan Kesehatan Universitas Sahid Surakarta.

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

##### **3.2.1 Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk purut (*Citrus Hystrix DC*).

##### **3.2.2 Sampel**

Sampel dalam penelitian ini adalah fraksi n-heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus Hystrix DC*).

### 3.3 Instrumen Penelitian

#### 3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas (*pyrex*), cawan petri (*normax*), mikropipet (*Dragon onemed*), blender (*Maspion*), autoklaf (GEA), blender (*maspion*), inkubator (*memmert*), jarum ose (lokal), lemari pendingin (Toshiba), timbangan (*acis*), neraca analitik (*acis*), laminar air flow (*Biobase*), oven (*memmert*), pinset (lokal), lampu bunsen(lokal), *rotary evaporator (bio base)*, dan satu set alat Kromatografi Cair Vakum (KCV).

#### 3.3.2 Bahan

Bahan digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk purut (*Citrus Hystrix DC*). Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Propionibacterium acnes*, dan bahan lain yaitu etanol 96% (*Merck*), aquadest (klins), n-Heksana PA (Teknis), etil asetat (Teknis), HCl, larutan *mayer*, larutan *Dragendrof*, HCl pekat, FeCl<sub>3</sub>, kloroform, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, asam asetat anhidrat., dimetylsulfoksida (DMSO) (*Merck*), NA (*Nutrient Agar*) (*Merck*), Mueller Hinton Agar (MHA) (*Merck*), NaCl 0,9% steril, kertas saring (lokal), kertas perkamen (lokal), kapas steril (lokal), *alumunium foil* (lokal), dan kertas cakram (lokal).

### 3.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus Hystrix DC*) dengan beberapa konsentrasi yaitu 2,5 %, 5 %, dan 10 %. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah *skrining* fitokimia dan aktivitas antibakteri dari fraksi n-heksana, etil asetat dan air ekstrak etanol daun jeruk purut terhadap *Propionibacterium acnes* hasil dari metode fraksinasi KCV.

### 3.5 Definisi Operasional

- a. Konsentrasi yang digunakan dalam masing-masing fraksi dari penelitian ini adalah 2,5%, 5%, dan 10%.
- b. Metode fraksinasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kromatografi cair vakum (KCV) dengan pelarut n-Heksana, etil asetat, dan air.
- c. Pelarut non polar adalah n-Heksana, yang digunakan dengan tujuan agar kandungan senyawa yang bersifat non polar larut dalam pelarut non polar.
- d. Pelarut semi polar adalah etil asetat, digunakan dengan tujuan agar kandungan senyawa yang bersifat semipolar dapat tersari.
- e. Pelarut polar adalah air, digunakan dengan tujuan untuk kandungan senyawa yang bersifat polar larut dalam pelarut tersebut.
- f. *Propionibacterium acnes* adalah bakteri penyebab jerawat yang terjadi apabila pori-pori kulit tersumbat.

- g. Uji aktivitas antibakteri adalah uji yang digunakan untuk mengetahui senyawa murni yang memiliki aktivitas antibakteri.
- h. Zona hambat adalah daerah disekitar disk yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri.

### **3.6 Rencana Jalannya Penelitian**

#### **3.6.1 Determinasi Tanaman**

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 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 3 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).

#### **3.6.3 Pembuatan Ekstrak**

Serbuk daun jeruk purut yang diperoleh sebanyak 2,4 kg kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:5 selama

8 hari pada suhu ruang dengan proses pengadukan setiap 1x24 jam. Kemudian dipekatkan dalam *rotary evaporator* pada temperatur 65 °C, kemudian ekstrak diuapkan dengan *waterbath* hingga didapat ekstrak kental (Melani, 2020).

### 3.6.3 Fraksinasi

Menyiapkan alat KCV, kemudian ditimbang silika gel 60 sebanyak 20 gram dimasukkan kedalam kolom sampai 2/3 tinggi kolom sambil pompa vakum dijalankan. Permukaan ditekan sampai terbentuk lapisan yang cukup padat. Selanjutnya pelarut yang mempunyai kepolaran rendah (*n*-heksana) dituangkan kedalam kolom dan pompa dihidupkan. Setelah pelarut terisap hingga kering maka kolom siap digunakan.

Ditimbang ekstrak 10 gram dan dimasukkan sisa silika gel 60, kemudian dicampurkan sedikit demi sedikit hingga didapat ekstrak kering yang mudah mengalir. Selanjutnya dituangkan kedalam kolom dengan merata dan permukaan kolom ditutup aluminium foil. Pelarut dituangkan kedalam kolom dari tingkat kepolaran rendah ke tinggi yaitu 100 mL *n*-heksana kemudian dihidupkan pompa dihisap hingga kering, setelah itu hasil fraksi diletakkan di cawan. Kemudian dilanjutkan dengan *etil asetat* 100 mL dituangkan kedalam kolom, dihisap hingga kering dan diletakkan pada cawan. Terakhir pelarut air dituangkan kedalam kolom, dihisap hingga kering dan hasil fraksi diletakkan di cawan. Ketiga fraksi yang didapat dilakukan pemekatan dengan *waterbath* pada temperatur 50 °C hingga diperoleh fraksi yang kental.

### 3.6.4 Identifikasi Kandungan Kimia

#### a. Identifikasi Minyak Atsiri

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

#### b. Identifikasi Alkaloid

Fraksi 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. Identifikasi Flavonoid

Fraksi 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. Identifikasi Saponin

Fraksi 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. Identifikasi Tanin

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

f. Identifikasi Terpenoid

Fraksi ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) diupkan 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung. Positif triterpenoid ditunjukkan dengan warna merah atau violet dan positif terpenoid ditunjukkan dengan warna hijau kebiruan (Harborne, 2006).

### 3.6.5 Pembuatan Konsentrasi Fraksi

Fraksi yang telah dikentalkan kemudian dilakukan pembuatan berbagai konsentrasi 2,5%, 5%, dan 10%. Pelarut yang digunakan untuk mengencerkan fraksi kental adalah DMSO 10%. Konsentrasi 2,5% dibuat dengan menimbang 0,025 gram fraksi kental ekstrak etanol daun jeruk purut kemudian ditambah dengan DMSO 10% sebanyak 1 mL. Konsentrasi 5% dibuat dengan menimbang 0,05 gram fraksi kental

kemudian ditambah DMSO 10% sebanyak 1 mL. Konsentrasi 10% dibuat dengan menimbang 0,1 gram fraksi kental kemudian ditambah DMSO 10% sebanyak 1 mL (Setyaningrum,2021).

### 3.6.6 Pengujian Aktivasi 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 (Maimunah dkk, 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 15 menit. Media MHA dituangkan pada cawan petri steril, didiamkan pada suhu kamar hingga memadat

#### c. Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

Sebanyak 2,8 gram *Nutrient Agar* dilarutkan pada 100 mL akuades dan dipanaskan di atas *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 (Maimunah dkk, 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* (Maimunah dkk, 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* (Maimunah dkk, 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 (Maimunah *dkk.*, 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 (Maimunah dkk, 2020).

i. Pengamatan dan Pengukuran Diameter Hambatan

Pengukuran zona hambat di sekitar cakram dinyatakan dalam mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri di sekitar cakram menunjukkan bahwa kandungan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) memiliki efek penghambatan terhadap *Propionibacterium acnes*. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali ulangan (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-rata (Maimunah dkk, 2020).

**Tabel 3.1 Klasifikasi Respon Zona Hambat**

Diameter zona hambatan	Respon hambatan pertumbuhan
$\geq 20$ mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
$\leq 5$ mm	Lemah

(Sumber: Ambarwati, 2007)

### 3.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri pada fraksi n-heksan, etil asetat dan air ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dianalisis menggunakan *Oneway ANOVA (Analysis Of Variance)* untuk melihat perbedaan zona hambatan secara signifikan antara kelompok kontrol negatif. Sebelumnya sampel dan kontrol positif dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro wilk test* (uji beda antara data yang diuji normalitasnya dengan data normal baku) dan homogenitas dengan uji *levene test* (uji dalam statistika yang dapat digunakan untuk menguji kesamaan varians dari dua atau lebih). Kemudian dilakukan uji *Tukey* yang mana bertujuan untuk mengetahui apakah ada data yang sama atau tidak.