

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat eksperimental untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi dan dilaksanakan pada bulan Februari 2021 sampai dengan April 2021 di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains, Teknologi, dan Kesehatan Universitas Sahid Surakarta.

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

##### **3.2.1 Populasi**

Populasi adalah keseluruhan subjek penelitian (Jalius Jama, 1990). Populasi pada penelitian ini adalah daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang di dapat dari Klaten Jawa tengah.

##### **3.2.2 Sampel**

Sampel adalah bagian dari jumlah karakteristik yang dimiliki oleh populasi (Jalius Jama, 1990). Sampel penelitian ini adalah ekstrak etanol

96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan seri konsentrasi 10%, 30% dan 50%.

### 3.3. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Alat : Autoklaf, blender (maspion), cawan petri (normax), tabung reaksi (pyrex), beakerglass (pyrex), stirrer, inkubator, jangka sorong, jarum ose (lokal), lemari pendingin, timbangan, neraca analitik (acis), *laminar air flow* (LAF), 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 (Jaedun, 2011). Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah seri konsentrasi 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 (Jaedun, 2011). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis*.

### 3.5 Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) digunakan dalam penelitian ini memiliki kandungan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri antalin minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan terpenoid (Laili, 2017).
- b. Konsentrasi dari ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10%, 30% dan 50%. Konsentrasi ekstrak adalah faktor utama yang mempengaruhi besar kecilnya zona hambat yang dihasilkan dalam menghambat pertumbuhan

bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Semakin tinggi pengenceran maka semakin sedikit kandungan zat aktif yang terdapat didalamnya sehingga semakin kecil zona hambat yang terbentuk (Mastra, 2018).

- c. Aktivitas antibakteri ditandai dengan adanya respon dari bakteri uji terhadap pemberian 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).

### **3.6 Jalannya Penelitian**

- a. Pembuatan Simplisia

Sampel daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) segar di petik di pagi hari agar senyawa termolabil dalam sampel tidak menguap karena paparan sinar matahari. Sampel dikumpulkan sebanyak 1,5 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.

- b. Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Purut

Serbuk daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang diperoleh sebanyak 743,04 gr kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96%. Simplisia direndam dalam pelarut sebanyak 3715 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.

c. 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 gr 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, menunjukan positif flavonoid (Kursia *et al.*, 2016)

4) Saponin

Ekstrak sebanyak 0,1 gr dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air hangat atau panas lalu dikocok selama 30 menit. Setelah itu diamati busa yang timbul 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 menunjukan hasil yang positif (Kursia *et al.*, 2016)

5) Tanin

Ekstrak sebanyak 0,1 gr dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 3 tetes  $\text{FeCl}_3$ . 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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).

d. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Daun Jeruk Purut

Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya dilakukan pembuatan berbagai konsentrasi. Konsentrasi ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) yang digunakan antara lain 10%, 30% dan 50%. Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan konsentrasi 10% dibuat dengan menimbang sebanyak 1 gr ekstrak kental 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 30% dibuat dengan menimbang sebanyak 3 gr ekstrak kental 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 50% dibuat dengan menimbang sebanyak 5 gr ekstrak kental daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) kemudian ditambahkan dengan dimetilsulfoksida (DMSO) 10% sebanyak 10 mL.

e. Kontrol Negatif

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).

f. Kontrol Positif

Klindamisin digunakan sebagai kontrol positif. Konsentrasi efektif klindamisin terhadap bakteri uji adalah 30 µg. Kontrol positif klindamisin yang digunakan adalah klindamisin tablet dan pembuatannya dengan melarutkan 30 mg klindamisin dalam 10 mL aquades.

g. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan untuk semua peralatan yang akan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri ini. 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 (Cinthy & Silalahi, 2020).

h. Pembuatan Media Agar Darah

Sebanyak 3,8 gr *Mueller Hinton Agar* (MHA) dilarutkan ke dalam 100 mL aquades pro injeksi dan dipanaskan diatas *hot plate* selanjutnya disterilkan



di autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit kemudian didinginkan dengan suhu 45°C-50°C. Tuang dalam cawan petri sebanyak 15 ml kemudian tambahkan 3 tetes darah manusia golongan O lalu homogenkan dan biarkan memadat (Murtiningsih, 2014).

i. Pembuatan Media NA (Nutrient Agar)

Sebanyak 2 gr Nutrient Agar (NA) dilarutkan dalam 1 mL 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).

j. 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 kemudian divortex sampai homogen untuk memperoleh suspensi dengan tingkat kekeruhan yang sebanding dengan kekeruhan dari larutan standar *Mc. Farland*. Konsentrasi suspensi bakteri uji dapat dinyatakan berjumlah 108 CFU/mL jika tingkat kekeruhan suspensi bakteri uji sama dengan kekeruhan larutan standar *Mc. Farland* (Cinthya & Silalahi, 2020).

k. 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).

l. Kultur Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang sudah disuspensi dalam tabung reaksi kemudian diambil dengan kapas lidi steril, lalu ditambahkan pada media agar darah 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 pertumbuhannya (Nugrahani, 2020).

m. Uji Aktivitas Antibakteri Pada Ekstrak 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%. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi pada media agar menggunakan kertas cakram (*paper disc*). Uji aktivitas antibakteri dilakukan secara triplo. Kertas cakram dicelupkan kedalam sampel yaitu ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan konsentrasi 10%, 30%, 50%, kontrol positif klindamisin 0.3% 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 hasil uji aktivitas antibakteri 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 (Cinthya & Silalahi, 2020).

n. 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 (Cinthya & Silalahi, 2020).

**Tabel 3.6 Kategori penghambatan antimikriba berdasarkan diameter zona hambat**

Diameter (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
$\leq 5$ mm	Lemah
5 – 10 mm	Sedang
10 – 20 mm	Kuat
$\geq 20$ 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) 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 (Analysis Of Variance)* untuk melihat perbedaan zona hambat secara signifikan antara kelompok kontrol negatif, sampel dan kontrol positif.