

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni secara *in vitro*.

#### **B. Sampel Penelitian**

##### 1. Bakteri Uji

Bakteri uji penelitian adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang merupakan biakan bakteri dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta, Jalan Ngadinegaran MJ III/62 Yogyakarta.

##### 2. Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah buah jeruk purut yang diperoleh dari perkebunan CV Merapi Farma Herbal jalan Kaliurang, km 21,5 Hargobinangun, Pakem, Yogyakarta.

Ekstrak buah jeruk purut dengan konsentrasi 0,78%, 1,57%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% dan 100% hasil pembuatan ekstrak di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Povidone iodine pada penelitian ini digunakan sebagai kontrol positif dan aquades digunakan sebagai kontrol negatif.

### 3. Besar Sampel

Terdapat kelompok perlakuan untuk ekstrak buah jeruk purut dengan konsentrasi 0,78%; 1,57%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100% yang ditempatkan pada 6 cawan petri dimana setiap cawan petri di bagi menjadi 4 bagian. *Povidone iodine 1%* sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif di tempatkan pada 2 cawan petri.

Jumlah sampel minimal pengulangan yang digunakan setiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan rumus Federer (1977).

Rumus Federer (1977)

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan:

n= Jumlah pengulangan

t= Jumlah kelompok perlakuan

Perhitungan jumlah sampel pengulangan dalam penelitian menggunakan

Rumus Federer adalah:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(8-1) \geq 15$$

$$(n-1)(7) \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah sampel yang dilakukan minimal adalah 3 kali pengulangan.

a. Kriteria inklusi sampel adalah :

Ekstrak etanol 96% buah jeruk purut

b. Kriteria eksklusi sampel adalah:

Selain ekstrak etanol 96% buah jeruk purut

4. Lokasi dan waktu penelitian

a. Pembuatan sampel kultur bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

b. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

c. Percobaan pada bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

d. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli - September 2017.

### **C. Variabel Penelitian**

1. Variabel pengaruh

a. Larutan Povidone iodine 1%.

b. Ekstrak buah jeruk purut dengan konsentrasi 0,78%; 1,57%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100%.

## 2. Variabel terpengaruh

Bakteri *Staphylococcus aureus* pada media agar diukur zona radikal setelah pemberian larutan *Povidone iodine* 1% dan ekstrak buah jeruk purut dengan konsentrasi 0,78%; 1,57%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100%.

## 3. Variabel terkontrol

- a. Bakteri *Staphylococcus aureus*
- b. Ekstrak buah jeruk purut dengan konsentrasi 0,78%; 1,57%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100%
- c. Larutan etanol 96 % sebagai pelarut
- d. Kedalaman pada cawan petri 3 mm
- e. Suhu inkubator 37°C
- f. Diameter cakram yaitu 6 mm
- g. Konsentrasi bakteri  $10^8$  CFU/ml (Larutan BRWON III)
- h. Media Kultur bakteri *Trypticase Soy Agar* (TSA)
- i. Media cair *Brain Heart Infusion* (BHI)
- j. Volume larutan tiap cakram 50 $\mu$ l
- k. Lama inkubasi 24 jam
- l. Suhu inkubasi 37°C
- m. Suhu ruangan laboratorium

## 4. Variabel tak terkontrol

- a. Penyebaran suspensi bakteri didalam cawan petri.

#### D. Definisi Operasional

- a. Jeruk merupakan buah yang teridentifikasi di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Gajah Mada Yogyakarta dengan kriteria buah jeruk purut berbentuk bulat konsistensi padat, kulit berwarna hijau tua dan segar. Jeruk purut mulai diproses setelah satu hari pasca panen yang berasal dari perkebunan jeruk purut CV Merapi Farma Herbal di Yogyakarta.
- b. Bakteri *Staphylococcus aureus* adalah bakteri gram positif, aerob, biasanya tersusun dalam kelompok ireguler seperti anggur yang dapat menyebabkan infeksi pada rongga mulut. Bakteri tersebut diperoleh dari biakan bakteri yang tersedia di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.
- c. *Povidone iodine* 1% merupakan antiseptik yang berfungsi untuk mencegah terjadinya infeksi dan membersihkan debris dalam rongga mulut. *Povidone iodine* 1% memiliki unsur iodium yang merupakan suatu germisid efektif sebagai antibakteri. Larutan *povidone iodine* 1% diambil sebanyak 5 ml.
- d. Ekstrak buah jeruk purut konsentrasi 100% adalah sediaan yang diperoleh dari buah jeruk purut, menggunakan teknik maserasi dengan pelarut etanol 96% yang dilakukan di Laboratorium Teknik Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- e. Metode difusi adalah suatu cara uji kepekaan bakteri yang menggunakan perbenihan padat yang diusap dengan biakan bakteri kemudian ditetesiekstrak buah jeruk purut.

- f. Zona radikal adalah daerah sekitar cakram dimana sama sekali tidak ditemukan pertumbuhan bakteri yang diukur dari cakram ke bagian terluar yang tidak ditumbuhi bakteri, pengukuran menggunakan *sliding caliper*.

## **E. Instrumen Penelitian**

### 1. Alat

- a. Tabung Erlenmeyer
- b. Toples
- c. Corong
- d. *Vacum rotary evaporator*
- e. Alat penyerbuk
- f. Mikropipet
- g. Kapas lidi steril
- h. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi
- i. Ose steril
- j. Cawan petri
- k. Oven
- l. Pipet
- m. Jangka sorong
- n. Lampu spirtus
- o. Inkubator
- p. Kertas saring
- q. Neraca timbangan

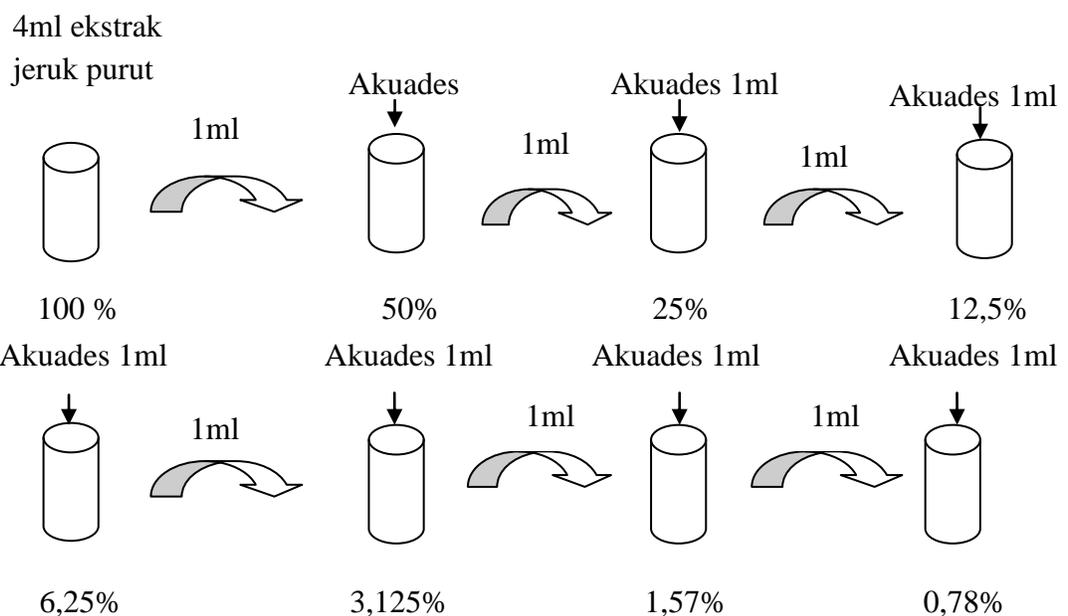
## 2. Bahan

- a. Larutan *povidone iodine 1%*
- b. Ekstrak buah jeruk purut konsentrasi 0,78%; 1,57%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100%
- c. Bakteri *Staphylococcus aureus*
- d. Larutan etanol 96 %
- e. Media agar *Trypticase Soy Agar*(TSA)
- f. Media cair *Brain Heart Infusion* (BHI)

## F. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak jeruk purut diawali dengan memilih jeruk dengan karakteristik tua, berwarna hijau gelap, segar, tidak ditemukan penyakit pada kulit jeruk dan telah teridentifikasi di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Jeruk purut kemudian dicuci bersih dan dipotong tipis-tipis, dikeringkan menggunakan oven selama 12 jam dengan suhu 40°C dipisahkan anatara buah dan biji. Jeruk purut yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan blender. Sebanyak 50 gram sampel dilakukan maserasi dalam 250 ml etanol 96% selama 24 jam. Setelah 24 jam filtrat disaring dan residunya dimaserasi kembali dengan etanol teknis 96% dengan cara yang sama. Maserasi diulang sebanyak tiga kali dan kemudian masing-masing filtrat pada setiap ulangan dikumpulkan menjadi satu dalam *elenmeyer* yang di tutup rapat. Ekstrak kemudian diuapkan menggunakan

*rotary evaporator* selama 35 menit, suhu 60°C, 80 rpm, ekstrak ditampung diatas cawan porselen, dikeringkan menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak tersebut kemudian ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik dan disimpan di freezer hingga digunakan. Pengenceran ekstrak diperoleh dengan cara mengencerkan dengan akuades steril, dengan konsentrasi :



Gambar 4. Pengenceran Ekstrak Buah JerukPurut (*Citrus hystrix*).

## 2. Pembuatan suspensi bakteri

Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* disubkultur dalam lempeng agar TSA selama 24 jam pada suhu 37°C. Beberapa koloni bakteri diambil menggunakan ose steril kemudian dimasukkan kedalam 1 ml NaCl kemudian dicampur hingga homogen dan diinkubasi 3-5 jam dengan suhu 37°C. Setelah

diinkubasi larutan NaCl yang telah bercampur dengan bakteri di masukkan kedalam 9 ml media cair BHI (*Brain Heart Infusion*) dalam tabung reaksi sehingga sesuai dengan standar Brown III dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml. Larutan diencerkan lagi hingga  $10^8$  CFU/ml.

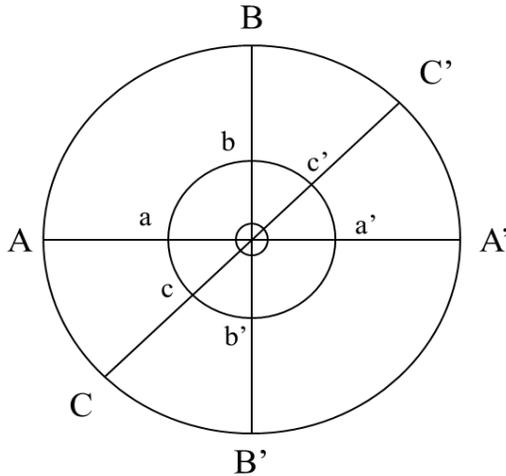
### 3. Inokulasi suspensi bakteri pada media agar

Pada suspensi bakteri dicelupkan kapas lidi steril, kemudian kapas tersebut ditekan pada dinding tabung supaya tidak terlalu basah dan dioleskan pada media agar *Trypticase Soy Agar* (TSA) dalam 8 cawan petri yang tersedia secara merata. Media agar TSA yang sudah diolesi bakteri dalam 8 cawan petri, kemudian diletakan 4 kertas cakram dengan diameter 6 mm pada setiap cawan petri. Cawan yang digunakan untuk uji ekstrak buah jeruk purut adalah 6 buah yang akan ditetesi dengan larutan uji ekstrak buah jeruk purut dengan konsentrasi 0,78%; 1,57%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100%, sedangkan 2 cawan petri berikutnya setiap 1 cawan petri ditetesi *povidone iodine* 1% dan larutan aquades steril.

### 4. Uji daya antibakteri

Ekstrak buah jeruk purut yang telah dibuat dengan konsentrasi 0,78%; 1,57%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100%, *povidone iodine* 1% dan aquades steril masing-masing ditetaskan dengan mikropet pada setiap cakram, kemudian cawan petri dimasukan inkubator selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$

## 5. Pengukuran zona radikal



Gambar 5. Pengukuran zona radikal

Keterangan :

Titik O = Titik pusat lubang cakram

Garis A-A', B-B', C-C' = Zona hambatan yang terbentuk

Garis a-a', b-b', c-c' = Diameter lubang cakram

Cara pengukuran :

Pengukuran I =  $(AA' - aa')$

Pengukuran II =  $(BB' - bb')$

Pengukuran III =  $(CC' - cc')$

Zona hambatan =  $\frac{\text{Pengukuran I} + \text{II} + \text{III}}{3}$

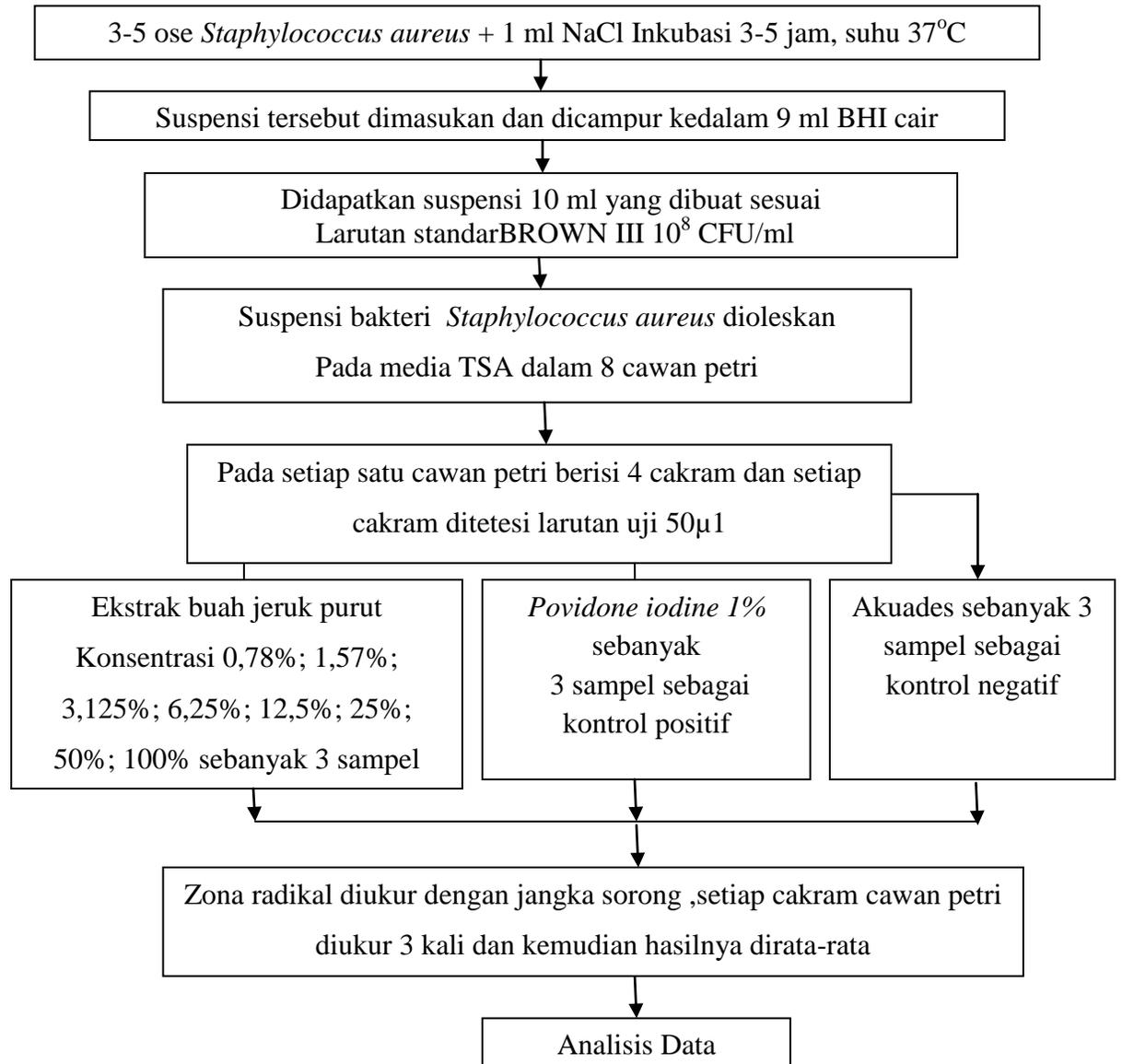
Penilaian zona hambat dilihat dari hasil pengukuran diameter yang digolongkan menjadi (1) tidak ada zona hambat, (2) lemah yaitu zona hambat kurang dari 5 mm, (3) sedang yaitu zona hambat 5-10 mm, (4) kuat yaitu zona hambat 11-20 mm, dan (5) sangat kuat yaitu zona hambat 21-30 mm (Launa, 2015).

#### **G. Analisis data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian berupa data rasio. Pertama dilakukan uji normalitas terlebih dahulu dengan menggunakan metode *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50. Uji normalitas ini digunakan untuk mengetahui apakah dari sampel yang diambil berdasarkan populasi yang terdistribusi normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah dari keenam sampel mempunyai variasi yang sama. Setelah uji normalitas homogenitas terpenuhi maka untuk mengetahui perbedaan efektifitas daya antibakteri antara *povidone iodine* 1% dan ekstrak buah jeruk purut terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* maka dapat digunakan uji statistik *One Way Anova* apabila diketahui distribusi data normal. Sebaliknya jika data terdistribusi tidak normal, maka uji statistik yang digunakan adalah *Kruskal-wallis*. Kemudian untuk mengetahui perbedaan efektifitas daya antibakteri antara setiap kelompok uji *Staphylococcus aureus* digunakan uji analisis *Least Significant Different (LSD)* dari lanjutan uji

statistik *One Way Anova* dan menggunakan uji analisis *Mann-Whitney* untuk kelanjutan dari *uji Kruskal-Wallis*.

## H. Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian.