

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan yaitu eksperimen. Rancangan penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), Variabel bebas dari penelitian ini yaitu ekstrak kulit jeruk BW) konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%. variabel terikat dari penelitian ini yaitu pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Kesehatan Tanjungkarang. Proses determinasi kulit jeruk BW dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung dan proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan pada bulan Febuari - Juni 2021.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini yaitu kulit jeruk BW yang diambil dari buah yang sudah matang dengan ciri ciri kulit yang berwarna hijau kekuningan, tektur buah tidak terlampau keras lagi dan bagian bawah sudah agak empuk jika dijentik dengan jari (Sarwono, 1988). Buah Jeruk diperoleh dari petani jeruk BW yang berada di daerah Pesawaran, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung yang berusia 8 bulan dari bunga mekar. Bagian kulit jeruk yang digunakan adalah seluruh bagian permukaan kulit yang kemudian dibuat ekstrak dengan pelarut etanol 96 % dan dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% yang digunakan sebagai larutan uji. Bakteri *Propionibacterium acnes* diperoleh dari Universitas Indonesia. Jumlah perlakuan ekstrak kulit jeruk 10 perlakuan dengan 3 kali pengulangan yang didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus Federer, yaitu $(t-1)(r-1) \geq 1$.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Ekstrak kulit jeruk BW	Kulit jeruk BW dibuat simplisandan dilakukan maserasi dengan pelarut ethanol 96% untuk dibuat ekstrak.	Metode Maserasi	Pengenceran dengan rumus V1.%1 = V2.%2	Ekstrak kulit jeruk BW konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.	Ordinal
Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	Pertumbuhan koloni bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827 yang dihambat oleh ekstrak kulit jeruk BW konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.	Metode dilusi padat	Coloni Counter	1.KHM (Konsentrasi terendah yang dapat menghambat bakteri, ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang masih dapat tumbuh di cawan) 2.KBM (Konsentrasi ekstrak terendah yang dapat membunuh bakteri pada media MHA)	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur

Prosedur pengumpulan data dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu :

- a. Pembuatan surat izin penelitian dan pemesanan strain bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 ke Laboratorium Universitas Indonesia
- b. Determinasi kulit jeruk BW di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung
- c. Pembuatan ekstrak kulit jeruk BW di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung
- d. Identifikasi dan peremajaan bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827
- e. Pembuatan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 dan pengenceran bertingkat metode *Standar Plate count* (SPC)
- f. Pengujian antibakteri ekstrak kulit jeruk BW terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 dengan metode dilusi padat.

2. Metode Pemeriksaan

Metode pemeriksaan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode dilusi padat. Pemeriksaan dilakukan dengan Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* yang terlebih dulu dilakukan pengenceran menggunakan Standar Plate Count (SPC)

3. Prinsip pemeriksaan

Pengenceran bertingkat bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 yang memiliki koloni antara 30-300 dicampurkan ke dalam ekstrak kulit jeruk BW sesuai konsentrasi yang diuji lalu diinokulasi dengan metode *spread plate* pada permukaan media Mueller Hinton Agar (MHA) lalu diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Penentuan nilai KHM dan KBM dilakukan dengan menghitung jumlah koloni *Propionibacterium acnes* pada masing-masing konsentrasi ekstrak kulit jeruk BW dengan menggunakan *colony counter*. Konsentrasi ekstrak kulit jeruk BW terendah yang mengalami penurunan pertumbuhan koloni bakteri ditentukan sebagai KHM dan konsentrasi ekstrak kulit jeruk BW terendah yang tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri ditentukan sebagai KBM.

4. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian yaitu autoclave, tabung reaksi, rak tabung, oven, hotplate, batang pengaduk, petridisk, ose, incubator, lampu spirtus, gelas ukur, elenmeyer, karet penghisap, pipet ukur, mikropipet, penangas air, kain hitam, alumunium foil, evaporator, alat *spreader*, dan *digital colony counter*.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu pelarut etanol 96%, aquadest steril, standar Mac Farland 0,5, NaCl 0,85%, antibiotik Tetrasiklin 200 mg, larutan uji yaitu ekstrak kulit jeruk BW dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% dan strain murni *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

c. Media

Media yang digunakan dalam penelitian yaitu media Mueller Hinton Agar, Blood Agar Plate, dan Nutrient Broth.

5. Cara Kerja

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu kemudian dibungkus dengan kertas kopi, dimasukkan dalam oven dan disterilkan pada suhu 160°C selama 1 jam (Soemarno, 2000).

b. Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk BW

1) Pemilihan Kulit Jeruk BW

Kulit jeruk yang akan di ekstraksi adalah kulit jeruk BW yang diambil dari buah yang sudah matang dengan ciri ciri kulit yang berwarna hijau kekuningan, tektur buah tidak terlampau keras lagi dan bagian bawah sudah agak empuk jika dijentik dengan jari dengan bagian kulit yang digunakan adalah seluruh bagian permukaan kulit (Sarwono, 1988)

2) Persiapan dan Determinasi Kulit Jeruk BW

Kulit jeruk BW diperoleh dari petani jeruk yang berada di daerah Pesawaran, Provinsi Lampung. Kemudian kulit jeruk tersebut dideterminasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang digunakan. Dengan cara mencocokkan morfologi yang ada pada kulit jeruk terhadap kepustakaan dan dibuktikan dibidang Botani Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

3) Pembuatan Simplisia

Jeruk dicuci hingga bersih dan dikeringkan menggunakan tissue, jeruk disiapkan di 3 tempat yang berbeda untuk dilakukan pengulangan 1, 2 dan 3 , lalu kulit jeruk dikupas lalu kulit yang segar dan dipotong kecil kecil. Pada pengulangan 1 disiapkan kulit basah 1630gr, pengulangan 2 disiapkan 1410gr, dan pengulangan 3 disiapkan 1565gr. Selanjutnya kulit jeruk dikeringkan dengan cara dijemur secara tidak langsung dengan cara menutup dengan kain hitam saat penjemuran atau bisa menggunakan oven dengan suhu 50-60°C selama 150 menit (Dharma, 2020). Kulit jeruk yang telah kering lalu

dihaluskan menggunakan *blender* serta diayak sehingga menjadi bentuk serbuk dan disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup dan didapatkan hasil bubuk simplisia pada pengulangan 1 sebanyak 875gr, pada pengulangan 2 sebanyak 732gr, dan pengulangan 3 sebanyak 706gr. Pembuatan simplisia dilakukan masing masing sesuai tempatnya tidak dijadikan satu. Selanjutnya dikerjakan sesuai dengan masing masing simplisia, sampai ke pengujian antibakteri.

4) Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Jeruk BW

- a) Kulit jeruk BW (*Citrus reticulata* Blanco) yang telah menjadi serbuk simplisia ditimbang sebanyak sebanyak 875gr untuk pengulangan 1, pada pengulangan 2 sebanyak 732gr, dan pengulangan 3 sebanyak 706gr.
- b) Kemudian ditambahkan masing masing 3.500 ml etanol 96% sampai semua serbuk kulit jeruk BW terendam larutan tersebut dan diamkan selama 72 jam dan diaduk setiap 24 jam.
- c) Hasil maserasi disaring untuk memisahkan cairan etanol dengan ampasnya dan dihasilkan ekstrak cair.
- d) Ekstrak kulit jeruk BW (*Citrus reticulata* Blanco) diuapkan menggunakan *rotatory evaporator* untuk memperoleh ekstrak kental.

(Marjoni, 2016)

Rumus Pengenceran :

$$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$$

Keterangan :

V_1 = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

$\%_1$ = Konsentrasi larutan uji (100%)

V_2 = Volume larutan uji dengan Aquades Steril (ml)

$\%_2$ = Konsentrasi yang akan dibuat (%)

Tabel 3.1 Pengenceran larutan ekstrak etanol kulit jeruk BW

Konsentrasi (%)	Volume ekstrak Kulit Jeruk k BW (ml)	Volume Aquades Steril (ml)	Volume larutan (ml)
10	0,5	4,5	5
20	1	4	5
30	1,5	3,5	5
40	2	3	5
50	2,5	2,5	5
60	3	2	5
70	3,5	1,5	5
80	4	1	5
90	4,5	0,5	5
100	5	0	5

c. Persiapan bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

a. Peremajaan bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

1) Pembuatan Media Blood Agar Plate

Media Blood Agar Base ditimbang sebanyak 2,4 gram kemudian dimasukkan dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dalam 60 ml aquadest, ditutup dengan sumbat kapas yang dibungkus aluminium foil, dipanaskan pada hot plate hingga larut, lalu kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, Media yang telah steril ditunggu hingga suhu 45°C lalu ditambahkan darah 5,6 ml selanjutnya dihomogenkan dan dituang ke dalam cawan petri sebanyak 20 ml, dan ditunggu hingga mengeras.

2) Biakan murni bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 diambil menggunakan ose lalu diinokulasi dengan cara digores pada media agar darah dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3) Bakteri yang tumbuh pada media blood agar plate dapat dilanjutkan untuk keperluan identifikasi atau dapat disimpan.

b. Identifikasi bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

1) Disiapkan alat dan media yang diperlukan

2) Koloni bakteri terpisah dari media Blood Agar Plate (BAP) dengan karakteristik bentuk koloni kecil, berwarna putih, permukaan halus dan konsistensi yang padat (Lestari, 2015), diambil dan diinokulasi pada media TSIA lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam

3) Koloni bakteri terpisah dari media Blood Agar Plate (BAP) diambil dan diinokulasi pada media simon citrat lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam

- 4) Koloni bakteri terpisah dari media Blood Agar Plate (BAP) diambil dan diinokulasi pada media SIM lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
 - 5) Koloni bakteri terpisah dari media Blood Agar Plate (BAP) diambil dan diinokulasi pada media gula gula seperti glukosa, laktosa, maltosa, manitol dan sukrosa lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
 - 6) Koloni bakteri terpisah dari media Blood Agar Plate (BAP) diambil dan dilakukan uji katalase pada koloni *Propionibacterium acnes* ATCC 11827. (Lestari, 2015)
- c. Pembuatan suspensi bakteri yang setara dengan standar Mac Farland 0,5
- 1) Pembuatan Media Nutrient Broth

Media Nutrient Broth ditimbang sebanyak 0,2 gram dan dilarutkan dalam 25 ml aquadest lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer, dan dipanaskan di atas hot plate, kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi 5 ml pada masing-masing tabung, lalu ditutup kapas dan disterilkan dalam autoclave selama 15 menit pada tekanan 1 atm suhu 121°C. Media dapat disimpan di lemari pendingin apabila tidak segera digunakan.
 - 2) Pembuatan Larutan Standar Mac Farland 0,5

Larutan Barium Chloride Dihidrat ($\text{BaCl}_2\text{H}_2\text{O}$) 1% sebanyak 0,5 ml dicampur dengan asam sulfat (H_2SO_4) 1% sebanyak 99,5 ml. Reagen di kocok hingga homogen. Standar kekeruhan ini dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditutup rapat supaya tidak terjadi penguapan. Kekeruhan Standar Mac Farland 0,5 diukur menggunakan alat nefolometer agar benar-benar setara dengan jumlah bakteri sebanyak 1.500 juta/ml. setiap akan digunakan dikocok terlebih dahulu (Soemarno, 2000).
 - 3) Pembuatan NaCl 0,85%

Kristal NaCl ditimbang sebanyak 1,27 gram kemudian dimasukkan kedalam labu ukur dan ditambahkan 150 ml aquadest lalu dihomogenkan. Larutan NaCl 0,85% dituang kedalam erlenmeyer, lalu ditutup dengan sumbat kapas yang dibungkus aluminium foil kemudian disterilkan dengan autoclave suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.
 - 4) Pembuatan Suspensi Bakteri

Koloni bakteri *Propionibacterium acnes* yang telah diremajakan diambil menggunakan ose lalu dimasukkan ke dalam tabung yang berisi media nutrien broth dan dihomogenkan lalu didiamkan selama 4 jam. Suspensi bakteri kemudian disamakan kekeruhannya dengan standar Mac Farland 0,5. Jika suspensi terlalu keruh ditambahkan NaCl 0,85% atau jika suspensi terlihat jernih, ditambahkan lagi dengan kuman hingga kekeruhannya sama dengan standar Mac Farland 0,5.

d. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar

Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA) digunakan untuk pengenceran bertingkat dan mengujian antibakteri. Pembuatan Media Muller Hinton Agar (MHA) ditimbang sebanyak 19 gram kemudian dimasukkan dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dalam 500 ml aquadest, ditutup dengan sumbat kapas yang dibungkus aluminium foil, dipanaskan pada hot plate hingga larut, lalu kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, Media yang telah steril selanjutnya dituang ke dalam cawan petri sebanyak 20 ml, dan ditunggu hingga mengeras.

e. Pembuatan suspensi *Propionibacterium acnes*

Pembuatan suspensi *Propionibacterium acnes* dilakukan dengan menggunakan pengenceran bertingkat, pengenceran suspensi *Propionibacterium acnes* akan digunakan untuk uji antibakteri.

Cara melakukan pengenceran suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* sebagai berikut :

- 1) Pengenceran dilakukan dengan cara mengambil 1 ml suspensi bakteri 0,5 Mac Farland lalu dicampurkan dengan larutan 9 ml NaCl 0,85% sehingga diperoleh larutan dengan tingkat pengenceran 10^{-1} .
- 2) Larutan pada tingkat pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dan dihomogenkan dengan 9 ml NaCl, sehingga diperoleh larutan dengan tingkat pengenceran 10^{-2} .
- 3) Dilakukan perlakuan yang sama sampai tingkat pengenceran 10^{-7}
- 4) Masing-masing pengenceran dipipet sebanyak 1 ml dan dituang pada cawan petri lalu ditambahkan media Muller Hinton Agar dengan suhu sekitar 45°C

lalu dihomogenkan membentuk angka 8 dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam

- 5) Koloni yang tumbuh pada media dihitung menggunakan *colony counter*.
- 6) Pengenceran *Propionibacterium acnes* yang dipilih yang memiliki jumlah koloni antara 30-300 koloni (Muntalif, 2018)
- 7) Pengenceran yang jumlah bakterinya 30-300 koloni akan digunakan untuk pengujian antibakteri metode dilusi padat.

d. Uji Antibakteri Metode Dilusi Padat

- 1) Tabung reaksi sebanyak 12 disiapkan dalam keadaan steril untuk 1 kali pengulangan
- 2) Ekstrak kulit jeruk BW dipipet masing-masing sebanyak 1 ml dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ke dalam tabung reaksi.
- 3) Pembuatan kontrol positif tetrasiklin 200 mg atau setara dengan 0,2%
Satu tablet antibiotik tetrasiklin dengan dosis 200 mg dihaluskan menggunakan mortar dan dilarutkan menggunakan etanol sebanyak 100 ml lalu dihomogenkan (Das dan Reynolds, 2014).
- 4) Tetrasiklin sebagai kontrol positif dan aquadest steril sebagai control negative, dipipet sebanyak 1 ml kontrol positif dan kontrol negatif aquadest steril lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- 5) Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* ditambahkan 0,1 ml dari pengenceran yang jumlah kolininya 30-300 koloni ke dalam tiap-tiap tabung lalu dihomogenkan.
- 6) Campuran dari tiap-tiap tabung dipipet sebanyak 0,1 ml dan ditanam pada permukaan media MHA yang telah mengeras dengan metode *spread plate* lalu diinkubasi pada suhu 37⁰C pada inkubator selama 24 jam.
- 7) Koloni yang tumbuh dilakukan perhitungan koloni *Propionibacterium acnes* dengan menggunakan *colony counter*.

Interpretasi Hasil Uji antibakteri Metode Dilusi Padat

- a. Konsentrasi ekstrak kulit jeruk BW terendah yang dapat menghambat bakteri, ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang masih dapat tumbuh di cawan (KHM)
- b. Konsentrasi ekstrak kulit jeruk BW terendah yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri ditentukan sebagai konsentrasi bunuh minimum (KBM) (McKane dan Kandel, 1996; Koneman *et al.*, 1997)

F. Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh berupa jumlah koloni bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian dilakukan analisa data. Analisa data yang digunakan yaitu analisa data univariat dan analisa data bivariat. Analisa univariat dilakukan dengan menghitung nilai rata-rata jumlah koloni bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 untuk menentukan nilai KHM dan KBM. Analisa bivariat dilakukan menggunakan alat bantu berupa perangkat *software* SPSS. Analisa bivariat digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang nyata antar setiap perlakuan menggunakan uji statistik *ANOVA (Analysis of variance)*, apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji duncan pada taraf 5% atau tingkat kepercayaan 95%.

G. Etical Clearance

Penelitian ini telah dilakukan uji laik etik oleh KEPK Poltekkes Tanjungkarang dengan nomor registrasi No.102/KEPK-TJK/X/2022 tanggal 10 Mei 2022 dan mendapatkan izin laik etik, karena penelitian ini tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dari proses penelitian dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah ekstrak, limbah media plate serta limbah suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 pada tabung dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, limbah suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* yang telah direbus dibuang pada saluran pembuangan, lalu plate dan tabung direbus kembali dengan penambahan detergen, setelah itu air bekas rebusan plate dan tabung dibuang pada saluran pembuangan, plate dan tabung dicuci dengan detergen pada air mengalir.

