

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu jenis penelitian eksperimental dengan melakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap *Propionibacterium acnes*.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-Juni 2022.

3.2.2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Kimia Farmasi, Laboratorium Steril dan Laboratorium Mikrobiologi Parasitologi STIKES Borneo Lestari.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semua tanaman ciplukan (*Physalis angulata L.*) yang diperoleh di wilayah Kalimantan Selatan.

3.3.2. Sampel

Sampel tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari daerah Banjarbaru. Daun ciplukan yang digunakan yaitu bagian daun segar yang berwarna hijau dimulai dari daun keempat dan kelima dari pucuk.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak etanol 70% daun ciplukan (*Physalis angulata* L.), kontrol positif berupa antibiotik Doksisisiklin 30 μ /disk, dan kontrol negatif Na-CMC 0,5%.

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah diameter zona hambat ekstrak etanol 70% daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

3.5. Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain yaitu autoklaf, aluminium foil, batang pengaduk, catton swab, bejana maserasi, *blender*, bunsen, cawan petri, corong, erlenmeyer, gelas ukur, inkubator, jangka sorong, jarum ose bulat, kapas, kertas perkamen, kertas saring, *Laminar Air Flow* (LAF), lemari

pendingin, mikropipet, oven, pinset, pipet tetes, rak tabung reaksi, *rotary evaporator*, spatula, *sputit*, *stopwatch*, tabung reaksi, timbangan analitik, dan vial.

3.5.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu daun ciplukan (*Physalis angulata* L.), antibiotik Doksisisiklin 30 μ /disk sebagai kontrol positif, Na-CMC 0,5% sebagai kontrol negatif, asam klorida (HCL) 2N, pereaksi *Dragenddroff*, pereaksi *Mayer*, pereaksi *Wagner*, *aquadest*, Serbuk Magnesium (Mg), asam klorida (HCL) pekat, amil alkohol, kloroform, pereaksi *Lieberman Burchad* (asam asetat anhidrat (CH₃CO)₂O, asam sulfat (H₂SO₄)), gelatin, NaCl 10%, bakteri *P.acnes* (Lab UI), etanol 70% (p.a), media *Mueller-Hinton Agar* (MHA), NaCl 0,9%, *Tryptic Soy Agar* (TSA).

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pengambilan Sampel

Tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) diperoleh dari daerah Banjarbaru. Sebanyak 1,5 kg daun ciplukan diambil pada bulan Januari 2022. Daun ciplukan yang digunakan yaitu bagian daun segar yang berwarna hijau dimulai dari daun keempat dan kelima dari pucuk.

3.6.2. Determinasi Tanaman Ciplukan (*Physalis angulata* L.)

Determinasi tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) dilakukan di Laboratorium Dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru.

3.6.3. Pembuatan Simplisia Daun Ciplukan (*Physalis angulata* L.)

Pembuatan simplisia dilakukan dengan pengumpulan sampel daun ciplukan sebanyak 1,5 kg. Kemudian dilakukan sortasi basah dengan memisahkan daun dari batang dan akarnya serta dari kotoran-kotoran dan zat asing yang masih menempel. Daun kemudian dicuci hingga bersih dengan air mengalir, selanjutnya daun dirajang menjadi bagian yang lebih kecil untuk mempermudah proses pengeringan dan penyerbukan. Daun ciplukan dikeringkan dengan sinar matahari, yang ditutup dengan menggunakan kain berwarna hitam. Setelah kering daun ciplukan selanjutnya disortasi kering untuk menghilangkan sisa-sisa pengotor dan bagian daun yang tidak ingin digunakan. Simplisia daun ciplukan kemudian dihaluskan menggunakan *blender* hingga diperoleh simplisia dalam bentuk serbuk dan diayak menggunakan ayakan *mesh* no 40 agar memudahkan pada saat digunakan dalam penelitian (Handayani & Heni, 2017).

$$\% \text{ Rendemen Simplisia} = \frac{\text{Bobot Total Simplisia}}{\text{Bobot Total Daun Segar}} \times 100\%$$

3.6.4. Pembuatan Ekstrak Daun Ciplukan (*Physalis angulata L.*)

Serbuk daun ciplukan ditimbang sebanyak 250 g, kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:4 atau sebanyak 1 L selama 1×24 jam dan dilakukan penyaringan. Residu yang diperoleh dari hasil penyaringan diremaserasi sebanyak 2 kali. Maserat yang diperoleh kemudian disaring menggunakan kertas saring lalu diperoleh filtrat yang dikumpulkan menjadi satu dan diuapkan untuk memisahkan pelarutnya. Uapapan dilakukan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C untuk memisahkan pelarut dan ekstrak. Kemudian ekstrak dipekatkan di atas *waterbath* dengan suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental dengan bobot tetap dan dihitung randemennya (Wirawan, 2018).

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Jumlah ekstrak yang dihasilkan}}{\text{Jumlah simplisia}} \times 100\%$$

3.6.5. Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,1 g serbuk simplisia ditimbang, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 9 mL air suling, dan ditambahkan 1 mL asam klorida (HCl) 2 N, dipanaskan diatas tangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring, filtrat dipakai untuk uji alkaloid. Pada tabung I, ditambahkan 2 tetes pereaksi *Mayer* akan terbentuk endapan menggumpal

berwarna putih atau kuning. Pada tabung II, ditambahkan 2 tetes pereaksi *Dragendroff*, akan terbentuk endapan berwarna coklat atau jingga kecoklatan. Pada tabung III, ditambahkan 2 tetes pereaksi *Wagner*, akan terbentuk endapan berwarna coklat sampai kehitaman. Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau paling sedikit dua atau tiga percobaan diatas (Lau & Herman, 2020).

b. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 10 mL aquadest dipanaskan hingga mendidih, diambil filtratnya. Kemudian ditambahkan magnesium (Mg) dan ditambahkan 1 mL HCl pekat, dan 1 mL amil alkohol. Campuran dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil (Anggreany *et al.*, 2020).

c. Uji Saponin

Ekstrak 0,1 gram dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan air panas 5 mL, dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat 10 detik. Saponin positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm, pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Anggreany *et al.*, 2020).

e. Uji Steroid/Terpenoid

Ekstrak 0,1 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan kloroform 0,5 mL ditambahkan pereaksi *Lieberman burchard* yang terdiri dari 1 mL asam asetat anhidrat $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ dan 1 tetes asam sulfat (H_2SO_4) . Terpenoid menunjukkan reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah keunguan. Reaksi positif steroid ditunjukkan adanya warna hijau kebiruan (Anggreany *et al.*, 2020).

f. Uji Tanin

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,1 g. Kemudian larutkan dalam aquadest secukupnya. Ambil 1 mL ekstrak ditambahkan dengan sedikit larutan gelatin 1% dan 5 mL NaCl 10%. Reaksi positif apabila terbentuk endapan kekuningan (Ikalinus *et al.*, 2015).

3.6.6. Pengujian Antibakteri *Propionibacterium acnes***a. Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat yang akan disterilisasi dalam penelitian ini seperti erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, dan pinset. Alat-alat yang terbuat dari kaca dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas. Selanjutnya disterilisasi dengan cara dimasukkan ke dalam oven selama 2 jam pada suhu 170°C . Untuk sterilisasi media seperti *Tryptic Soy Agar* (TSA) dan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) menggunakan

autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Styawan & Zuhdiyyah, 2018). Sedangkan sterilisasi jarum ose dan pinset disterilisasikan dengan cara membakar ujung peralatan di atas api bunsen sampai berpijar (Kharisma & Abdul, 2012).

b. Pewarnaan Gram

Pengamatan dilakukan dengan mengambil 1-2 tetes aquades steril diletakkan diatas kaca objek, koloni bakteri diambil satu ose dan sebarkan hingga merata, biarkan olesan tersebut kering karena udara. Setelah olesan kering kemudian lalukan kaca objek tersebut diatas nyala api sampai kaca objek terasa agak panas. Kemudian tetesi dengan larutan kristal violet, diamkan 1 menit, cuci dengan aqudest botol semprot dan keringkan. Selanjutnya tetesi dengan larutan iodium dan biarkan 2 menit, cuci dengan aqudest botol semprot dan keringkan. Kemudian tetesi dengan etanol 95% selama 30 detik, cuci dengan aqudest botol semprot dan keringkan. Setelah itu tetesi dengan larutan safranin diamkan selama 30 detik, cuci dengan aqudest botol semprot dan keringkan. Selanjutnya amati menggunakan mikroskop (Nurhidayati *et al.*, 2015).

c. Pembuatan Media *Tryptic Soy Agar* (TSA)

Media TSA ditimbang sebanyak 2 gram dilarutkan dalam 50 mL *aquadest* menggunakan erlenmeyer. Selanjutnya

dihomogenkan dengan *hotplate*. Kemudian media agar dituangkan kedalam gelas beker yang sebelumnya telah disterilkan lalu ditutup dengan aluminium foil. Media disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama kurang lebih 30 menit sampai media memadat. Media TSA adalah media yang digunakan sebagai media tumbuh bakteri (Yunitasari, 2017).

d. Peremajaan Bakteri Menggunakan Media TSA

Peremajaan bakteri menggunakan agar miring TSA dengan mengambil 1 ose bakteri menggunakan ose steril yang sudah dipanaskan dengan cara pemijaran kemudian digoreskan pada permukaan agar miring dengan cara *zig-zag* dan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Fitriyanti *et al.*, 2019).

e. Pembuatan Larutan Standar *Mc. Farland*

Pembuatan standar kekeruhan 0,5 unit *Mc. Farland* dibuat dari campuran H_2SO_4 1% sebanyak 9,95 mL dan larutan BaCl 1% sebanyak 0,05 mL, masukkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan hingga benar-benar tercampur (Zamilah *et al.*, 2020). Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh, dan disimpan di tempat yang terhindar dari cahaya matahari langsung (Handayani *et al.*, 2016).

f. Pembuatan Suspensi Bakteri

Dimasukkan 10 mL larutan NaCl (Natrium Klorida) 0,9% ke dalam tabung reaksi. Kemudian diambil biakan bakteri *P.acnes* hasil peremajaan menggunakan jarum ose steril dan disuspensikan ke dalam 10 ml larutan NaCl 0,9% steril. Selanjutnya dibuat suspensi bakteri hingga diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar kekeruhan *Mc.Farland* (Fitriyanti *et al.*, 2019). Adapun menurut Rinita (2017) standar kekeruhan larutan *Mc.Farland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL), apabila suspensi bakteri lebih keruh daripada standar *Mc.Farland* maka perlu ditambahkan NaCl 0,9% sedikit demi sedikit hingga tercapai kekeruhan sesuai dengan keinginan.

g. Pembuatan Suspensi Na-CMC 0,5%

Ditimbang Na-CMC sebanyak 0,5 g kemudian dilarutkan dalam 100 mL *aquadest* yang telah dipanaskan, selanjutnya diaduk hingga homogen. Pada penelitian ini menggunakan Na-CMC sebagai kontrol negatif (Tendean *et al.*, 2017).

h. Perhitungan Seri Konsentrasi Ekstrak Etanol 70% Daun Ciplukan

Ekstrak kental daun ciplukan dibuat larutan stok 100% dengan mencampurkan 18 gram ekstrak daun ciplukan dengan larutan Na-CMC hingga volume mencapai 18 mL. Kemudian dilakukan pencairan seri konsentrasi ekstrak etanol 70%

dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Nabila *et al.*, 2021).

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Keterangan:

C_1 : Konsentrasi awal

C_2 : Konsentrasi Akhir

V_1 : Volume awal

V_2 : Volume akhir

Perlakuan konsentrasi 30% dibuat dengan cara ekstrak kental daun ciplukan yang sudah dibuat larutan stok di ambil sebanyak 1,5 mL kemudian dilarutkan dalam 3,5 mL larutan Na-CMC 0,5%. Perlakuan konsentrasi 40% dibuat dengan cara ekstrak kental daun ciplukan yang sudah dibuat larutan stok di ambil sebanyak 2 mL kemudian dilarutkan dalam 3 mL larutan Na-CMC 0,5%. Perlakuan konsentrasi 50% dibuat dengan cara ekstrak kental daun ciplukan yang sudah dibuat larutan stok di ambil sebanyak 2,5 mL kemudian dilarutkan dalam 2,5 mL larutan Na-CMC 0,5%. Perlakuan konsentrasi 60% dibuat dengan cara ekstrak kental daun ciplukan yang sudah dibuat larutan stok di ambil sebanyak 3 mL kemudian dilarutkan dalam 2 mL larutan Na-CMC 0,5%. Perlakuan konsentrasi 70% dibuat dengan cara ekstrak kental daun ciplukan yang sudah dibuat larutan stok di ambil sebanyak 3,5 mL kemudian

dilarutkan dalam 1,5 mL larutan Na-CMC 0,5%. Perlakuan konsentrasi 80% dibuat dengan cara ekstrak kental daun ciplukan yang sudah dibuat larutan stok di ambil sebanyak 4 mL kemudian dilarutkan dalam 1 mL larutan Na-CMC 0,5%.

i. Pembuatan Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)

Sebanyak 5,7 gram Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dilarutkan dalam 150 mL *aquadest* dipanaskan hingga larut. Media disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C. Dinginkan sampai suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$, selanjutnya dibagi ke dalam 10 cawan petri steri sebanyak 15 mL. Setelah dingin, media padat disimpan dalam kulkas (Fitriyanti *et al.*, 2019).

j. Pengujian Antibakteri Dengan Metode Sumuran

Pengujian antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan teknik *Cup-plate technique* (metode sumuran) (Anisa & Lilih, 2020). Larutan uji dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak etanol 70% daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) menjadi 6 konsentrasi. Konsentrasi yang dibuat yaitu 30%, 40%, 50%, 60%, 70% dan 80%.

Media MHA yang telah memadat digoreskan dengan bakteri menggunakan *cottonbud steril* yang diambil dari suspensi bakteri. Enam cawan petri yang berisi media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) yang telah diinokulasi bakteri *P.acnes*

dibuat 3 lubang sumuran menggunakan perforator, kemudian masukkan ekstrak menggunakan mikropipet untuk satu konsentrasi ekstrak sebanyak 20 μL , untuk 3 cawan petri lainnya di buat 2 bagian untuk kontrol positif dan kontrol negatif. Lubang kontrol positif diisi dengan antibiotik Dosisiklin 30 $\mu\text{g/disk}$ dan lubang kontrol negatif diisi dengan Na-CMC 0,5% b/v.

Cawan petri yang berisi bakteri dengan berbagai konsentrasi ekstrak dimasukkan ke dalam lemari pendingin pada suhu 4⁰C agar senyawa berdifusi pada media sebelum terjadi pertumbuhan bakteri uji. Dilanjutkan proses inkubasi ke dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Setelah zona hambat terbentuk ukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dari masing-masing sampel (Fitriyanti *et al.*, 2019).

Uji dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Berdasarkan rumus Federer (Nabila *et al.*, 2021).

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

Dimana n adalah jumlah minimal pengulangan dan t adalah jumlah kelompok.

Perhitungan jumlah pengulangan:

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

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

$$7n \geq 15+7$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq \frac{22}{7}$$

$$n \geq 3,1 \sim 3 \text{ pengulangan.}$$

Perhitungan diameter zona hambat (Estikomah *et al.*, 2021).

$$\text{Rumus : } \frac{d1+d2}{2} - X$$

Keterangan :

$d1$ = Diameter vertikal zona bening pada media

$d2$ = Diameter horizontal zona bening pada media

X = Lubang sumuran

3.6.7. Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan SPSS dengan taraf kepercayaan ($p > 0,05$). Adapun pengujian dengan SPSS yaitu untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna dari masing-masing kelompok uji yang mengandung kontrol positif antibiotik Doksisisiklin 30 $\mu\text{g/disk}$ dan kontrol negatif Na-CMC 0,5% dengan berbagai variasi konsentrasi ekstrak etanol 70% daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P.acnes* penyebab jerawat.

Data pada penelitian ini dianalisis menggunakan uji normalitas dan uji homogenitas, jika data yang diperoleh

berdistribusi normal dan homogen, maka selanjutnya dilakukan uji *One Way Anova*. Jika data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen, maka analisis dilakukan dengan menggunakan uji nonparametric yakni uji *Kruskall-Wallis*. Sedangkan untuk menentukan apakah ada perbedaan signifikan secara statistik antara 2 atau lebih kelompok variabel, maka analisis menggunakan uji *Mann-Whitney*.