

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Ekstraksi daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) menggunakan etanol 96% dan n-heksana kemudian dilanjutkan dengan mengidentifikasi keberadaan flavonoid dan triterpenoid. Pada penelitian ini digunakan metode difusi cakram sebagai tolak ukur untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) sebagai antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* penyebab jerawat.

B. Lokasi Penelitian

1. Lokasi penelitian

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Pembuatan larutan ekstrak dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo, Ungaran Timur, Semarang.
- c. Uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo, Ungaran Timur, Semarang.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2023.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi adalah kelompok subyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi pada penelitian ini populasi yang digunakan adalah Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) yang diperoleh dari Desa Gogik, Ungaran Barat, Semarang Jawa Tengah

2. Sampel

Sampel adalah sebagian dari populas. Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dan n-heksana.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional adalah definisi yang berguna untuk membatasi ruang lingkup atau pengertian variabel-variabel yang diamati atau diteliti dan bermanfaat untuk mengarahkan kepada pengukuran atau pengamatan terhadap variabel-variabel yang bersangkutan serta pengembangan instrument (Notoatmojo, 2018).

1. Daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) yang digunakan adalah yang segar, berwarna hijau muda, tidak berlubang, tidak berjamur, tidak berwarna kuning kecoklatan diperoleh dari Desa Gogik, Ungaran Barat, Semarang Jawa Tengah.
2. Etanol 96% dan n-heksana merupakan pelarut yang digunakan untuk ekstraksi daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.)
3. Identifikasi adanya senyawa Flavonoid dan Triterpenoid

4. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.
5. Daerah bening yang terbentuk disekitar cakram merupakan zona hambat.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol dan n-heksana daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) dengan variasi konsentrasi 0,02%, 0,04% dan 0,06% dengan kontrol positif Clindamicin dan kontrol negatif DMSO 10%.

2. Variabel Terikat

Diameter zona hambat ekstrak etanol 96% dan n-heksan daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes*.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali adalah variabel yang ikut berpengaruh yang dibuat sama pada setiap media percobaan dan terkendali. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah media pertumbuhan bakteri, bakteri *Propionibacterium acnes*, lama inkubasi, suhu inkubasi.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sterilisator, kertas saring, beker glass, centrifuge, vial, tabung reaksi, rak tabung reaksi, vortex, autoklaf, cawan petri, timbangan, ose bulat, lampu bunsen, inkubator, rotary

evaporator, anaerobic jar, corong Buchner, besi pelubang media, mikropipet, tabung erlenmeyer, jangka sorong (Ramadhan *et al.*, 2015).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah NA, aquades steril, DMSO, suspensi *P. acnes*, ekstrak etanol 96% dan n-heksan daun tempuyung, spirtus.

2. Uji Determinasi

Dilakukan determinasi sebelum penelitian untuk memastikan jenis dan kebenaran tanaman yang digunakan (Soemarie, 2016). Tanaman tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) yang diperoleh dari Desa Gogik, Ungaran Barat, Semarang Jawa Tengah akan di uji kebenarannya dilaboratorium biologi Universitas Diponegoro Semarang.

3. Penyiapan simplisia

Daun tempuyung diperoleh dari Desa Gogik, Ungaran Barat, Semarang Jawa Tengah Kemudian disortasi basah dari sisa kotoran dan bagian tanaman yang tidak digunakan dicuci dengan air yang bersih atau air mengalir, kemudian ditiriskan. Daun tempuyung yang sudah bersih kemudian dikeringkan selama 2-3 hari dengan cara dijemur pada sinar matahari tidak langsung. Daun tempuyung yang sudah kering diblender sampai menjadi serbuk, kemudian di ayak dengan ayakan 40 mesh dan simplisia serbuk di simpan dalam kantong plastik vacuum hingga dilakukan ekstraksi (Rahayu dkk, 2015).

4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Tempuyung

Sebanyak 300 gram serbuk daun tempuyung diekstraksi dengan pelarut etanol 96% (rasio 1:7) kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak dilanjutkan dengan water bath pada suhu 50⁰c untuk memperoleh ekstrak kental. Dilakukan hal yang sama untuk pembuatan ekstrak n-heksana daun tempuyung (Yanuarisa R., 2016)

5. Dentifikasi Kandungan Senyawa

a. Identifikasi Flavonoid

Ekstrak daun Tempuyung ditimbang sebanyak 0,3 gram dilarutkan dalam etanol sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan serbuk Mg 0,1 mg dan HCL pekat sebanyak 10 tetes melalui dinding tabung, dikocok perlahan. Jika terbentuk warna merah, kuning, coklat atau jingga menandakan positif flavonoid (Baud, 2014).

b. Identifikasi Terpenoid

Ekstrak daun Tempuyung ditimbang sebanyak 0,3 gram, ditambahkan dengan pereaksi Lieberman Burchard kemudian dikocok. Adanya senyawa golongan terpenoid ditandai dengan timbulnya berwarna merah kecoklatan (Hanani, 2015) (Afif, 2013).

6. Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak kental daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) dibuat dalam 5 konsentrasi yaitu 0,02%, 0,04% dan 0,06% Kemudian dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 10 ml.

Tabel 3. 1 Pembuatan Larutan Uji

No.	Sampel	Konsentrasi %	Volume DMSO 10%
1.	Kontrol negatif	DMSO 10%	Ad 10 mL
2.	Kontrol Posetif	Paper disk Clindamisin	-
3.	Ekstrak Etanol daun Tempuyung	0,02	Ad 10 mL
		0,04	Ad 10 mL
		0,06	Ad 10 mL
4.	Ekstrak n-heksana daun Tempuyung	0,02	Ad 10 mL
		0,04	Ad 10 mL
		0,06	Ad 10 mL

Sumber : Miranda 2023

7. Pembuatan Media dan Sterilisasi

a. Sterilisasi alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian aktivitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan dalam oven pada suhu 180°C selama \pm 2 jam, jarum ose dan pinset dibakar dengan pembakaran di atas api langsung dan media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

b. Pembuatan Media

Media NA sebanyak 5 gram dilarutkan ke dalam 250 liter akuades, kemudian diaduk dan dipanaskan menggunakan magnetic stirrer, setelah itu dimasukkan ke tabung reaksi ditutup menggunakan kapas kemudian disterilkan dengan autoclave dengan suhu 121°C selama 20 menit.

(Julianti, *et al.*, 2017)

8. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara bakteri *propionibacterium acnes*, ditumbuhkan pada tabung reaksi atau secara agar miring. Kemudian NA tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

9. Teknik Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* dibuat dengan cara dibiakkan pada media NA selama 24 jam. Koloni *Propionibacterium acnes* selanjutnya diambil sebanyak satu ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diisi 10 mL larutan steril (NaCl 0,9%). Kemudian koloni bakteri dikocok sampai koloni halus dan tampak tercampur dengan suspensi media hingga terlihat adanya kekeruhan. Setelah itu, setarakan dengan standar McFarland (McF) 0,5 (Merta dan I Nyoman, 2019)

10. Pembuatan Kontrol Positif (K+)

Kontrol positif yang digunakan adalah paper disk clindamisin yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo.

11. Pembuatan Kontrol Negatif (K-)

Dalam penelitian ini kontrol negatif menggunakan DMSO 10% yang dibuat dengan cara mencampur 1 mL DMSO murni dan 9 mL aquades kemudian dihomogenkan. Sebanyak 10 µL DMSO 10% diteteskan pada permukaan media dengan menggunakan mikropipet 10 µL (Assidqi *et al.*, 2012).

12. Uji Aktivitas Antibakteri

Pour plate merupakan teknik isolasi yang dilakukan dengan membuat pengenceran secara berturut-turut dengan menggunakan jarum inokulasi dan pipet. Selanjutnya bakteri tersebut dicampurkan dengan medium agar dan dibiarkan sampai padat. Metode difusi cakram digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri, cakram kosong direndam selama 15 menit pada masing-masing konsentrasi, kemudian cakram diletakkan pada permukaan media yang telah ditanami bakteri. Pengujian kontrol positif dilakukan dengan meletakkan paper disk klindamisin pada permukaan media yang telah berisi bakteri. Pengujian kontrol negatif dilakukan dengan cara merendam kertas cakram kosong selama 15 menit dalam DMSO 10%, kemudian diletakkan media yang telah ditanami bakteri. Pengujian antibakteri direplikasi sebanyak tiga kali. Media yang telah diberi perlakuan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam diukur diameter zona hambat (mm) yang terbentuk disekitar cakram menggunakan jangka sorong (Sa'adah, *et al.*, 2020).

G. Teknik Analisis Data

1. Aktivitas antibakteri pada fraksi daun Tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* penyebab jerawat dengan cara mengukur dan menghitung zona hambat (mm) yang terbentuk.
2. Dilakukan uji analisis One-way Anova menggunakan SPSS 20 dengan membandingkan diameter zona hambat pada perlakuan kontrol positif

dengan masing-masing perlakuan konsentrasi terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* penyebab jerawat.