## BAB III

**METODE PENELITIAN**

### Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimen. Rancangan penelitian meliputi pengambilan sampel, pengumpulan sampel, identifikasi sampel, pengelolaan sampel, pembuatan ekstrak, karakteristik, skrining fitokimia, pembuatan sediaan hidrogel,pembuatan nano sediaan hidrogel,evaluasi sediaan hidrogel, dan pengujian aktivitas pada bakteri *Staphylococcus aureus.*

### Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah Nano Hidrogel ekstrak daun jeruk purut dan kitosan kerang darah , dan variabel terikat adalah mutu fisik hidrogel ekstrak daun jeruk purut dan kitosan, dan aktivitas antibakteri terhadap *staphylococcus aureus.*

### Parameter Penelitian

Parameter dalam penelitian ini meliputi: karakteristik sampel daun jeruk purut, skiring fitokimia daun jeruk purut, uji organoleptis, uji homogenitas, uji pH, uji daya sebar, uji daya lekat, dan uji viskositas.

### Lokasi dan Jadwal Penelitian

### Jadwal Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan desember sampai dengan maret 2024.

40

### Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan.

### Bahan dan Peralatan

### Bahan Penelitian

bahan-bahan yang digunakan meliputi ekstrak daun jeruk purut (*citrus hystrix*), kitosan kerang darah, etanol 96%, aquadest,kalium iodida, raksa (iii) klorida, bismut (ii) nitrat, asam nitrat 0,5 n, pekat, *alfa naftol*, asam klorida pekat, natrium hidroksida, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, besi (iii) klorida, timbal (iii) asetat, kloralhidrat, klorofrom, asam klorida encer, serbuk mg, Hcl pekat, amil alkohol, n-heksan, nacl 0,9%, barium klorida1%, asam sulfat 1%, bakteri *staphylococcus aureus*, asam asetat 2%, carbopol, gliserin, propylene glycol, methyl paraben, dan triethanolamne (TEA), *mueller hinton agar* (MHA).

### Peralatan Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah belender, beaker glass, batang pengaduk *(Pyrex Iwaki)*, pipet tetes, tabung reaksi *(Pyrex Iwaki)*, cawan petri, erlenmeyer *(Shimadzu UV-1700)*, batang pengaduk, Kawat ose, corong, ayakan mesh 40, oven *(Memmert UN55)*, tanur tanur *(Muffle Furnace)*, timbangan analitik *(Shimadzu AUW-320)*, magnetic stirer, hot plate, sentrufugasi, pH elektroda, autoclaf, dan , *rotary evaporator* R-3 (Buchi).

### Persiapan Bahan

### Uji Determinasi

Determinasi tanaman daun jeruk purut *(Citrus hytrix* D.C*)* di Laboratorium Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Sumatra Utara Medan.

### Pengambilan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan yaitu daun jeruk purut yang diperoleh dari salah satu penjual yang ada di Kota Medan.

### Pengumpulan Sampel

Sampel daun jeruk purut yang didapat dari salah satu penjual yang ada di Kota Medan dibawa untuk dilakukan pembuatan Ektrak dan uji skrining.

### Pengelolaan Sampel

Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang telah dikumpulkan, dicuci bersih dengan air mengalir, lalu ditimbang berat basah, kemudian dikeringkan di bawah lampu, daun jeruk purut dianggap kering bila dapat dipatahkan rapuh dan hancur, lalu ditimbang berat kering. Kemudian diserbukkan dengan menggunakan belender lalu disimpan di dalam wadah kering dan terlindung dari cahaya matahari.

### Pembuatan Larutan Pereaksi

### Larutan Pereaksi Bouchardat

Sebanyak 4 gram kalium iodida dilarutkan dalam 20 mL *aquadest*, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 gram iodium dan dicukupkan dengan aquadest hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

### Larutan Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 gram raksa (II) klorida, dilarutkan dalam 60 mL aquadest, kemudian pada wadah yang lain ditimbang sebanyak 5 gram kalium iodida lalu dilarutkan dalam 10 mL aquadest. Kedua larutan dicampurkan dan ditambahkan aquadest hingga diperoleh larutan 100 mL (Depkes RI, 1989).

### Larutan Pereaksi Dragendorff

Sebanyak 8 g bismut (II) nitrat ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 20 mL asam nitrat pekat. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 27,2 gram kalium iodida lalu dilarutkan dalam 50 mL aquadest. Kemudian kedua larutan dicampurkan dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan aquadest hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

### Larutan Pereaksi Molish

Sebanyak 3 gram *alfa-naftol* ditambahkan beberapa tetes etanol kemudian dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

### Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N

Sebanyak 17 mL asam klorida pekat diencerkan dalam aquadest hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

### Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2N

Sebanyak 5,4 mL asam sulfat pekat diencerkan dengan aquadest hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

### Larutan Pereaksi Natrium Hidroksida 2N

Sebanyak 8 gram pellet natrium hidroksida dilarutkan dalam aquadest hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

### Larutan Pereaksi Liberman-burchard

Sebanyak 20 bagian asam asetat anhidrat dicampurkan dengan 1 bagian asam sulfat pekat dan 50 bagian kloroform. Larutan pereaksi harus dibuat baru (Baghaie dkk,2017).

### Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida

Sebanyak 1 gram besi (III) klorida dilarutkan dengan aquadest hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

### Larutan Pereaksi Timbal (II) asetat 0,4 M

Sebanyak 15,17 gram timbal (III) asetat dilarutkan dalam aquadest bebas karbondioksida hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

### Karakteristik Simplisia

### Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap simplisia daun jeruk purut *(Citrus hytrix* D.C*)* dan kitosan dengan cara memperhatikan warna, bentuk, bau dan ukurannya.

### Pemeriksaan Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia daun jeruk purut *(Citrus hytrix* D.C*)* dengan cara sampel serbuk daun jeruk purut diletakkan diatas kaca objek, ditetesi dengan kloralhidrat ditutup dengan cover glass, lakukan viksasi sampai jernih kemudian diamati di bawah mikroskop.

### Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotropi (destilasi toluen). Alat terdiri dari labu alas bulat 500 mL, alat penampung dan pendingin, tabung penyambung dan penerima 10 mL.

* + - 1. Penjenuhan toluene

Sebanyak 200 mL toluene dan 2 mL aquadest dimasukkan ke dalam labu alas bulat, dipasang alat penampung dan pendingin, kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit,

kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 mL.

* + - 1. Penetapan kadar air simplisia

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu alas bulat yang berisi toluen jenuh tersebut, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes tiap detik. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluen. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,05 mL. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (v/b) (Depkes RI, 1989).

Kadar air = (𝑣𝑜𝑙𝑢𝑚𝑒 𝑎𝑖𝑟 𝑎𝑘ℎ𝑖𝑟−𝑣𝑜𝑙𝑢𝑚𝑒 𝑎𝑖𝑟 𝑎𝑤𝑎𝑙) × 100%

berat simplisia

### Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 100 mL kloroform P (2,5 mL kloroform dalam 100 mL aquadest) selama 24 jam menggunakan labu tersumbat sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam dan disaring. 20 mL filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan penguap kemudian dipanaskan pada suhu 105˚C dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam air dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

Kadar Sari Larut Dalam Air = 𝐵𝑒𝑟𝑎𝑡 𝑠𝑎𝑟𝑖 ×FP×100%

Bobot simplisia

### Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (96%) dalam labu tersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring untuk menghindari penguapan etanol, kemudian diuapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan penguap kemudian dipanaskan pada suhu 105˚C hingga diperoleh bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 96% dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

Kadar Sari Larut Dalam Etanol = 𝐵𝑒𝑟𝑎𝑡 𝑠𝑎𝑟𝑖

Bobot simplisia

×FP×100%

### Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia ditimbang dengan seksama, lalu dimasukkan ke dalam krus porselin yang telah dipijarkan dan ditara (ditimbang sampai bobot tetap) kemudian krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pemijaran dilakukan pada suhu 600˚C selama 3 jam kemudian didinginkan dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung tehadap bahan yang

telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

Kadar Abu Total = 𝐵𝑒𝑟𝑎𝑡 𝐴𝑏𝑢

Bobot simplisia

× 100%

### Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, didinginkan dengan 25 mL asam klorida encer, aduk selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudian dicuci dengan air panas, residu dan kertas saring dipijarkan pada suhu 600˚C selama 3

jam kemudian didinginkan dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di

udara (Depkes RI, 1989).

Kadar Abu Yang Tidak Larut Asam = 𝐵𝑒𝑟𝑎𝑡 𝐴𝑏𝑢

Bobot simplisia

× 100%

* 1. **Pembuatan Ektrak Etanol Daun Jeruk Purut *(Citrus hystrix* D.C*)***

Pembuatan ektrak etanol daun jeruk purut *(Citrus hytrix* D.C*)* dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Serbuk simplisia 10 bagian (500 g) dimasukkan ke dalam bejana kemudian tuangkan 75 bagian (3750 mL) cairan penyari etanol lalu ditutup sambil diaduk sesekali dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya matahari. Setelah 5 hari campuran ampasnya diperas. Cuci ampasnya dengan cairan penyari etanol secukupnya hingga diperoleh 100 bagian (5 liter) maserat. Meserat kemudian dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya sela ma 2 hari, dan disaring. Maserat lalu dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* lalu ditimbang (Depkes RI, 1989).

% Rendemen = 𝐵𝑒𝑟𝑎𝑡 𝐸𝑘𝑠𝑡𝑟𝑎𝑘 𝐾𝑒𝑛𝑡𝑎𝑙 𝐸𝑡𝑎𝑛𝑜𝑙 × 100%

Bobot simplisia Kering

### Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia ekstrak daun jeruk purut *(Citrus hytrix* D.C*)*, meliputi pemeriksaan senyawa golongan flavanoid, tanin, saponin, steroid/triterpenoid, alkaloid dan glikosid. Skrining fitokimia dilakukan terhadap serbuk simplisia dan ekstrak simplisia (Depkes RI, 1995).

### Pemeriksaan Flavonoid

Simplisia serbuk dan ekstrak masing-masing 10 gram ditimbang kemudian ditambahkan 100 mL air panas, didihkan selama 5 menit dan disaring dalam

keadaan panas, filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 mL lalu ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol, dikocok, dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning jingga pada lapisan amil alcohol (Marin, 2014).

### Pemeriksaan Tanin

Simplisia serbuk dan ekstrak masing-masing ditimbang 0,5 gram sampel disari dengan 10 mL aquadest, lalu filtratnya diencerkan dengan aquadest sampai tidak berwarna. Diambil 2 mL larutan lalu ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Terjadinya warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Marjoni, 2020).

### Pemeriksaan Saponin

Simplisia serbuk dan ekstrak masing-masing ditimbang sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan aquadest panas sebanyak 10 mL, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, timbul busa/buih yang mantap tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Ditambahkan 1 tetes larutan asam klorida 2N, bila busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

### Pemeriksaan Steroid/ Triterpenoid

Simplisia serbuk dan ekstrak masing-masing ditimbang sebanyak 1gram sampel dimaserasi dengan 20 mL *n-*heksana selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap. Pada sisa ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Terjadinya warna ungu menunjukkan adanya triterpenoid atau warna hijau menunjukkan adanya steroid (Depkes RI, 1995).

### Pemeriksaan Alkaloid

Simplisia serbuk dan ekstrak masing-masing ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian ditambahkan 1 mL asam klorida dan 9 mL aquadest, dipanaskan air selama 2 menit, didinginkan kemudian disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut :

* + - 1. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning.
			2. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.
			3. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi dragendorff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan warna merah atau jingga. Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau paling sedikit dua atau tiga dari percobaan

### Pemeriksaan Glikosida

Simplisia serbuk dan ekstrak masing-masing ditimbang sebanyak 3 gram, kemudian disari dengan 30 mL campuran 7 mL bagian etanol 96% dan 3 bagian aquadest ditambah dengan 10 ml HCL 2N. Direfluks selama 30 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 mL filtrat ditambahkan 25 mL aquadest dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok, lalu didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari dengan 20 mL campuran 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol dilakukan berulang sebanyak tiga kali. Kumpulkan sari air diuapkan pada temperatur tiidak lebih dari 50˚C. Sisanya dilarutkan dalam 2 mL metanol. Kemudian diambil 0,1 mL larutan percobaan dimasukkan ke dalam tabung reaksi,

diuapkan di penangas air. Pada sisa ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes pereaksi molish. Kemudian secara perlahan ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung, jika terbentuk cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI, 1995).

### Pembuatan Nano Hidrogel Kitosan dan Ekstrak Daun Jeruk Purut.

Carbopol dikembangkan dalam aquadest selama 24 jam. Kemudian ditambahkan *methyl paraben* yang telah dilarutkan dalam *propylene glycol* diaduk hingga homogen lalu ditambahkan gliserin diaduk hingga homogen. Kemudian campuran tersebut ditetesi triethanolamine sampai pH netral. Selanjutnya ditambahkan Kitosan dan Ekstrak Daun Jeruk Purut ditambah sisa aquadest dan diaduk homogen,menggunakan homogenezer selama 3 jam kemudian diuji ukuran partikel dengan menggunakan PSA ( *Particele Size Analyzer)*

### Pembuatan Hidrogel Kitosan dan Ekstrak Daun Jeruk Purut.

Pembuatan membran pembalut luka kitosan/PVA dan ekstrak daun jeruk purut dapat dilihat pada formulasi berikut.

Formulasi pembuatan nanohidrogel ekstrak daun jeruk purut dan kitosan dapat dilihat pada Tabel 3.1 sebagai berikut :

**Tabel 3. 1** Formulasi Pembuatan Hidrogel Ekstrak daun jeruk purut dan kitosan

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **No** | **Nama Zat** | **F0** | **F1** | **F2** | **F3** |
| 1 | Kitosan (gram) | 0 | 2 | 4 | 6 |
| 2 | Ekstrak Daun Jeruk Purut (gram) | 0 | 2 | 4 | 6 |
| 3 | Carbopol (gram) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | *Tri Etanolamin* (tetes) | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 5 | Propilen glikol (gram) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 6 | *Glyserin* (gram) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 7 | *Methylparaben* (gram) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 8 | Aquades Ad 100 ml | 100 | 100 | 100 | 100 |

Carbopol masukkan kedalam lumpang panas masukkan aquadest, kemudian derus sampai homogen. Kemudian ditambahkan *methyl paraben* yang telah dilarutkan dalam *propylene glycol* diaduk hingga homogen lalu ditambahkan gliserin diaduk hingga homogen. Kemudian campuran tersebut ditetesi triethanolamine sampai pH netral. Selanjutnya ditambahkan Kitosan dan Ekstrak Daun Jeruk Purut kemudian ditambah sisa aquadest dan diaduk homogen menggunakan homogenezer.

### Evaluasi Sediaan Hidrogel Kitosan dan Ekstrak Daun Jeruk Purut

### Uji Stabilitas Fisik Hidrogel

Evaluasi stabilitas fisik sediaan hidrogel dilakukan pada suhu kamar. Pemeriksaan pada suhu kamar dengan cara sebagai berikut, sediaan yang akan diuji dibiarkan selama 3 minggu pada suhu kamar. Pada setiap minggunya diamati apakah terjadi pemisahan atau tidak. Sediaan yang tidak mengalami pemisahan dinilai sebagai basis yang stabil (Sakramentia dkk,2019). Evaluasi yang dilakukan diantaranya pemeriksaan organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, viskositas, dan iritasi kulit.

### Uji Organoleptis.

Pengamatan organoleptis yang dilakukan meliputi pengamatan bentuk, warna, dan aroma dari sediaan nano hidrogel ekstrak daun jeruk purut dan kitosan (Chasanah dkk, 2019).

### Uji Homogenitas

Hidrogel ditimbang sebanyak 0,1 gram dioleskan secara merata dan tipis pada kaca objek. Hidrogel harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak ada bercak (Chasanah dkk, 2019).

### Uji Viskositas

Pengukuran viskositas gel dilakukan dengan menggunakan Brookfield Viskometer. Sebanyak 200 gram hidrogel tetap berada di dalam beaker glass. Spindle no.4 dipasang, kemudian diturunkan hingga terendam menjadi produk gel. Kecepatan yang digunakan yaitu 30 rpm. Skala membaca sampai jarum merah yang bergerak telah stabil kemudian hasil yang didapat dicatat dalam satuan cps (*centipoise*). Pengujian ini dilakukan 3 kali pengulangan kemudiaan dihitung rata-ratanya (Nurcahyo, 2016).

### Uji Daya Sebar

Daya sebar di ukur dengan dua lempeng kaca, satu lempeng kaca diberi alas milimeter blok untuk memudahkan pengamatan dan pengukuran serta satu lempeng lagi digunakan sebagai penutup. Pengukuran daya sebar hidrogel dilakukan dengan cara meletakkan 1 gram hidrogel di tengah-tengah kaca. Tutup hidrogel dengan kaca penutup dan pemberat dengan total keseluruhan bobot adalah 125 g selama 1 menit, dihitung diameter luas sebaran. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Chasanah dkk, 2019).

### Uji Daya Lekat

Sediaan Hidrogel 0,25 gram diletakan diatas 2 object glass yang telah ditentukan. Kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Setelah itu beban diangkat dari object glass kemudian object glass dipasang pada alat uji. Alat uji diberi beban 80 gram kemudian dicatat waktu pelepasannya sampel dari object glass (Chasanah dkk, 2019).

### Uji pH

Sebelumnya dilakukan kalibrasi alat dengan larutan buffer pH 4.0 dan pH

7.0. Penentuan pH dilakukan dengan cara mencelupkan elektroda pH meter ke dalam hidrogel, mengamati angka yang tertera pada monitor. Hidrogel yang baik harus memiliki pH yang sesuai dengan pH kulit yaitu 4-6,5 (Chasanah dkk, 2019).

### Uji Iritasi Pada Sediaan

Dilakukan dengan cara uji tempel terbuka dengan mengoleskan sediaan pada bagian belakang telinga, dibiarkan terbuka dan diamati apa yaang terjadi. Reaksi iritasi positif ditandai dengan kemerahan, gatal, atau bengkak pada bagian belakang telinga yang diberi perlakuan (Chasanah dkk, 2019).

### Uji Aktivitas Antibakteri Nano Hidrogel Ekstrak Daun Jeruk Purut dan Kitosan Kerang Darah Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

### Sterilisasi Alat

Sebelum menggunakan alat-alat maka terlebih dahulu dicuci bersih dan dibilas dengan air mengalir. Alat-alat yang terbuat dari gelas dibungkus dengan kertas perkamen dan disterilkan dengan menggunakan oven suhu 180 oC selama 1 jam. Alat-alat logam disterilkan dengan panas lampu spiritus selama 30 detik.

Alat-alat karet dan plastik yang tidak tahan pemanasan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 oC selama 15 menit (Retnaningsih, 2019).

### Pembuatan Larutan NaCl 0,9 %

Sebanyak 0,9 g natrium klorida (NaCI) dilarutkan dengan 100 mL aquadest sedikit demi sedikit kedalam labu ukur 100 mL sampai homogen, dimasukkan dalam erlenmeyer dan di sterilkan dalam autoklaf pada suhu 12 1°C selama 1 menit.

### Pembuatan Standar Kekeruhan Mac Farland 0,5

Siapkan larutan Barium Klorida (BaCl2) 1% sebanyak 0,05 mL. Campurkan dengan larutan Asam Sulfat (HaSO4) 1% sebanyak 9,95 mL. Kook larutan hingga homogen dan terlihat keruh (Yamlean, 2020).

### Pembuatan Media Peremajaan Bakteri (Agar Miring)

MHA ditimbang sebanyak 9,5 gram (38g/L), Kemudian dilarutkan kedalam 250 mL aquadest. Media dipanaskan sampai mendidih agar tercampur dengan sempurna. Disterilisasi di dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121º C. Tunggu hingga agak dingin sekitar 40-45ºC. Tuang media steril ke dalam tabung reaksi untuk membuat agar miring (Yamlean, 2020).

* + 1. **Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus***

Bakteri Staphylococcus aureus diambil dengan menggunakan Ose steril dari kultur murninya. Lalu dinokulasikan dalam media agar miring, Dinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama lx 24 jam (Yamlean, 2020).

* + 1. **Uji Antibakteri Sediaan nano hidrogel ekstrak Daun Jerk Purut Terhadap *Staphylococcus aureus***

Siapkan media Mueller Hilton Agar (MHA) yang telah dibuat dalam cawan petri. Homogenkan suspensi biakan bakteri yang telah sesai dengan standar Mac Farland 0,5. Ambil suspensi biakan bakteri 0,1 mL menggunakan pipet mikro lalu diratakan diatas media agar yang sudah mengeras. Oleskan Cotton swab steril keseluruh bagian media sehingga inokulum terdistribusi secara merata. Tempatkan cakram yang telah direndam dengan larutan sediaan nano hidrogel pada permukaan media. Posisikan cawan secara terbalik dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Setelah itu, diukur zona hambat pertumbuhan bakteri menggunakan jangka sorong.