

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Peneliti melakukan perbandingan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dan jenis penelitian ini yakni eksperimental laboratorium. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode Difusi Agar *Kirby Bauer* dengan tujuan guna melihat daya hambat ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis pada bakteri *S. mutans*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Peneliti melakukan penelitian di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi Prodi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Determinasi tanaman jeruk nipis dijalankan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli-Agustus 2023.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini yaitu daun dan kulit jeruk nipis yang didapatkan di perkebunan Sumber Batikan, Trirenggo, Kec. Bantul, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta (-7.9082423, 110.3431691).

2. Sampel

Pada penelitian ini menggunakan sampel daun sebanyak 2,5 kg dan kulit jeruk nipis sebanyak 2,5 kg. Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun jeruk nipis berwarna hijau tua, daun yang utuh serta tidak berlubang atau sobek, dan kulit jeruk nipis yang berwarna hijau kekuningan (setengah matang), yang di panen pada bulan juni dan di petik pada pagi hari.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas
Seri konsentrasi ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis.
2. Variabel terikat
Diameter zona hambat bakteri *S. mutans*.
3. Variabel terkontrol
Waktu inkubasi media uji selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator, sampel yang digunakan, sampel yang di panen pada bulan juni dan dipetik pada pagi hari.

E. Definisi Operasional Variabel

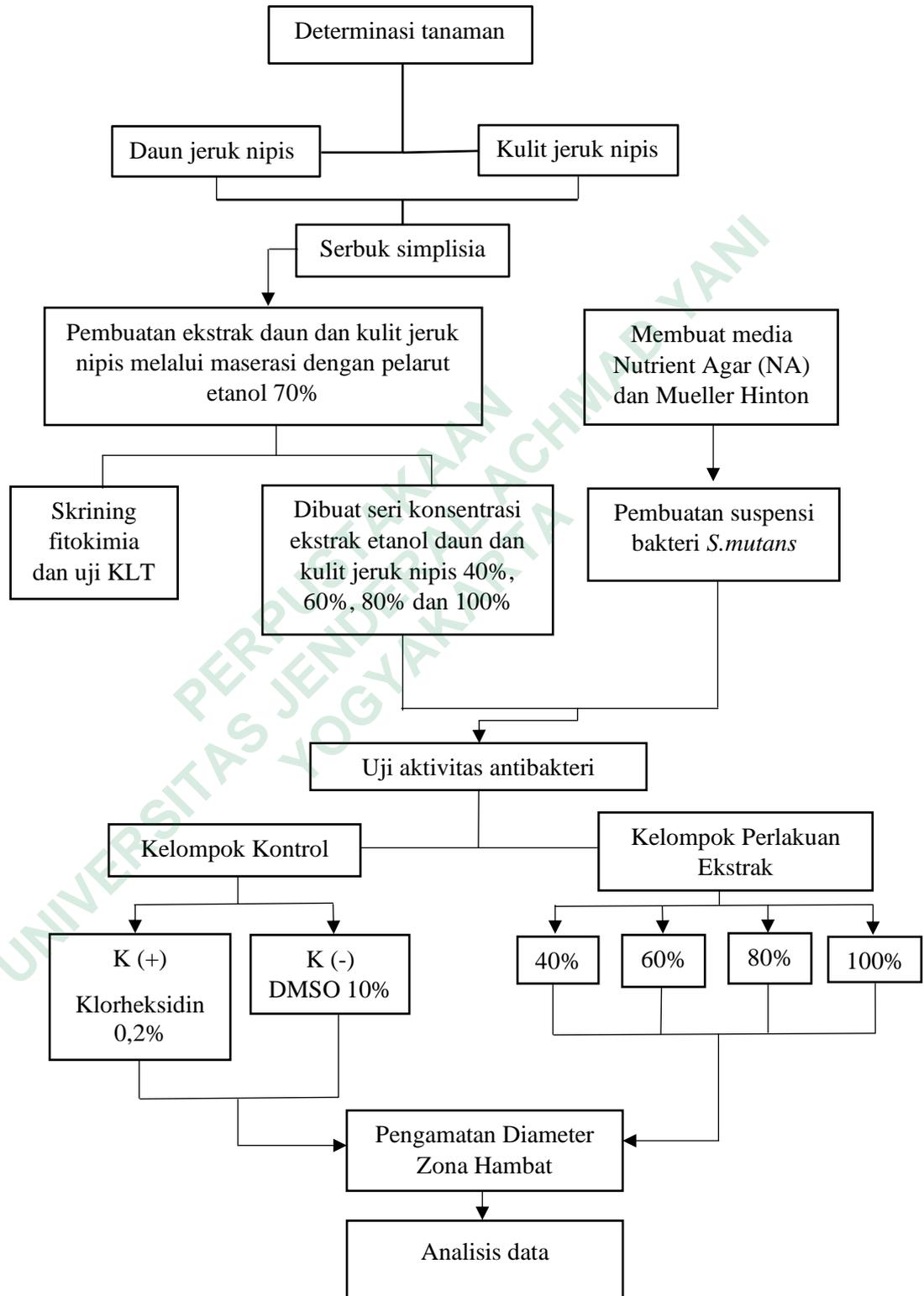
1. Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dari hasil ekstraksi senyawa aktif dengan menggunakan pelarut. Ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis dibuat seri konsentrasi 40%; 60%; 80% dan 100%.
2. Diameter zona hambat yaitu zona bening disekitar cakram yang tidak ditumbuhi oleh bakteri uji yang kemudian diukur menggunakan jangka sorong secara vertikal, dan horizontal.
3. Waktu inkubasi media uji selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator, sampel yang digunakan yaitu daun jeruk nipis berwarna hijau tua, daun yang utuh serta tidak berlubang atau sobek, dan kulit jeruk nipis yang berwarna hijau kekuningan (setengah matang), yang di panen pada bulan juni dan di petik pada pagi hari.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Diperlukan peralatan guna preparasi simplisia yaitu oven, grinder (Fomac), ayakan 40 mesh, timbangan analitik (Ohaus).
 - b. Alat yang diperlukan untuk ekstraksi yaitu spatula kayu, timbangan analitik (Ohaus), toples kaca besar, ayakan ukuran 40 mesh, kompor listrik, penangas air, wajan, erlenmeyer 1000 mL; 500 mL (Iwaki), corong 100 mm; 90 mm (Iwaki), gelas ukur 1000 mL (Iwaki).

- c. Alat uji organoleptik dan uji fitokimia yaitu tabung reaksi, rak tabung, timbangan analitik (Ohaus), labu ukur, kertas saring, pipet tetes, corong (Iwaki), *hotplate*, pipet ukur, propipet.
 - d. Alat uji KLT yaitu gelas bejana, gelas beaker, lampu UV 254 dan 366 nm, *white tip*.
 - e. Dibutuhkan peralatan untuk melakukan pengujian aktivitas antibakteri yaitu erlenmeyer 1000 mL; 100mL (Iwaki), jarum ose, mikropipet 100-1.000 μ L, cawan petri, batang L, lemari pendingin, *magnetic stirrer*, pembakar bunsen, oven, jangka sorong, inkubator, BSC (Daihan Labtech), autoklaf (B-one), pinset, *cotton bud*, *beaker glass*, tabung reaksi, batang pengaduk, *hot plate*, spektrofotometer UV-Vis.
2. Bahan
- a. Bahan yang diperlukan pada saat determinasi yaitu tanaman jeruk nipis.
 - b. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi yaitu, simplisia yang lolos pada ayakan 40 mesh, etanol 70%.
 - c. Bahan yang digunakan pada uji penapisan fitokimia yaitu ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis, H_2SO_4 , HCL 2 N, etanol 70%, pereaksi dragendroff, pereaksi wagner, pereaksi mayer, akuades, $FeCl_3$ 1%, serbuk magnesium.
 - d. Bahan yang digunakan untuk uji KLT yaitu, etil asetat, n-heksan, metanol, etanol, kloroform, kertas saring, larutan standar kuesertin 0,1%, etanol 70%, ekstrak etanol daun, kulit jeruk nipis, plat silika.
 - e. Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas bakteri yaitu ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis, bakteri *S.mutans* ATTC 25175, *papper blank disk*, nutrient agar (Merck) , DMSO 10%, alumunium foil, kasa, H_2SO_4 1%, NaCl 0,9%, $BaCl_2$ 1%, MHA (Merck), klorheksidin 0,2%, kertas payung, *Mc Farland* 0,5, BaCl 1%, H_2SO_4 1%, kapas, *blue tip*.

G. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 6. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman jeruk nipis *Citrus aurantifolia*

Determinasi daun serta kulit jeruk nipis dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Dilakukannya determinasi yakni bertujuan untuk menentukan benar tidaknya tanaman yang dipakai dengan yang diinginkan yaitu spesies *Citrus aurantifolia*.

2. Preparasi sampel

- a. Pembuatan simplisia

Sebanyak $\pm 2,5$ kg masing-masing daun dan kulit jeruk nipis dicuci dibawah air yang mengalir setelah itu dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C hingga sudah sesuai dengan indikator yang apabila diremas akan mudah hancur. Setelah itu simplisia dihaluskan dengan grinder hingga menjadi serbuk, lalu lakukan pengayakan untuk mendapatkan hasil yang diinginkan menggunakan ayakan berukuran 40 mesh dan serbuk siap untuk diekstraksi.

- b. Pembuatan ekstrak

Dilakukan ekstraksi pada serbuk daun dan kulit jeruk nipis masing-masing menggunakan metode ekstraksi dingin yaitu cara maserasi dengan perbandingan 1:10 dengan pelarut etanol 70%. Perendaman dilakukan pada wadah kedap selama 3×24 jam, dengan pengadukan setiap 12 jam dan penyimpanannya ditempat yang terbebas dari cahaya matahari. Hasil dari perendaman disaring, residu ekstrak direndam ulang menggunakan etanol 70% sebanyak 1 L selama sehari dan diaduk tiap 12 jam sekali, lalu disaring kedua ekstrak cair yang didapatkan. Gabungkan kedua filtrat, setelah itu uapkan di penangas air dengan suhu 40°C , untuk dilakukan pemekatan pelarut hingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak kental yang didapatkan dituang ke dalam botol kaca, lalu diberi label dan simpan dalam kulkas (Parama *et al.*, 2019). Hasil ekstrak yang sudah kental ditimbang dan dihitung lalu dinyatakan dalam bentuk persentase (%b/b) (Chairunnisa *et al.*, 2019). Perhitungan rendemen dilakukan menggunakan persamaan (1).

$$\text{Rendemen (\%b/b)} = \frac{\text{berat ekstrak (gram)}}{\text{berat simplisia (gram)}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

3. Kontrol kualitas ekstrak

a. Uji organoleptik

Pengujian ini dilakukan melalui pengamatan warna, tekstur, rasa dan bau pada ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis.

b. Skrining fitokimia

1) Identifikasi Alkaloid

Timbang ekstrak sebanyak 0,5 gram dan siapkan tabung reaksi untuk tempat sampel yang telah ditimbang tadi kemudian tambahkan etanol, panaskan hingga mendidih lalu saring dan dikocok, kemudian tambahkan serbuk magnesium dan teteskan HCl. Setelah itu di saring dibagi menjadi 3 bagian, tambahkan reagen ke setiap tabung. Ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer pada tabung reaksi pertama apabila terjadi endapan putih maka menunjukkan hasil positif, 3 tetes pereaksi Dragendroff pada tabung kedua apabila menunjukkan warna endapan jingga maka hasil positif dan 3 tetes pereaksi Wagner pada tabung ketiga jika tabung ketiga terdapat endapan merah kecoklatan maka hasilnya adalah positif mengandung alkaloid (Agustina *et al.*, 2017).

2) Identifikasi Flavonoid

Timbang ekstrak sebanyak 0,5 gram. Tuang ekstrak pada tabung reaksi lalu tambahkan serbuk magnesium sejumlah 0,1 gram dan tambahkan 2-3 tetes HCl pekat. Untuk mencapai hasil positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya kuning jingga hingga merah (Mahmud *et al.*, 2022).

3) Identifikasi Saponin

Timbang ekstrak sebanyak 0,5 gram dan tambahkan 5 mL air panas pada tabung reaksi serta digojok selama 30 detik. Jika terdapat busa kemudian ditambahkan dengan larutan HCl 2N selanjutnya tunggu hingga 2 menit, apabila busa tidak hilang maka positif adanya saponin (Agustina *et al.*, 2017).

4) Identifikasi Tanin

Timbang ekstrak sebanyak 0,5 gram dan tuang ke dalam tabung reaksi setelah itu dipanaskan kurang lebih 5 menit. Dilanjutkan penambahan FeCl_3 1% sebanyak 3 tetes. Apabila menunjukkan warna biru kehitaman atau coklat kehijauan artinya positif adanya tanin (Mahmud *et al.*, 2022).

5) Identifikasi Terpenoid/Steroid

Timbang ekstrak sebanyak 0,5 gram lalu uji dilakukan dengan metode Liebermann-Burchard yaitu dengan penambahan CH_3COOH , dibiarkan sebentar lalu ditambahkan H_2SO_4 . Jika berwarna ungu atau jingga menunjukkan positif terpenoid, dan menunjukkan positif steroid apabila menghasilkan warna biru (Agustina *et al.*, 2017).

c. Identifikasi golongan senyawa dengan metode KLT

1) Persiapan plat KLT

Silika gel GF₂₅₄ yang berukuran 10 cm x 4 cm digunakan sebagai fase diam, lalu ditandai dengan garis bagian atas dan bawah masing-masing 1 cm untuk menunjukkan batas proses elusi.

2) Penjenuhan bejana

Untuk uji flavonoid digunakan fase gerak n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 1 : 4 dalam 10 mL. Kemudian dilakukan penjenuhan. Penjenuhan bejana dengan sempurna diperlukan agar proses elusi dan pemisahan dapat berjalan dengan baik, kemudian dilakukan penjenuhan dengan memasukkan kertas saring ke dalam chamber, dianggap jenuh ketika pengelusnya sudah sampai pada puncak kertas saring.

3) Pembuatan larutan standar kuersetin 0,1% dan larutan sampel

Ditimbang sebanyak 2 mg serbuk kuersetin kemudian masukkan kedalam gelas beaker lalu larutkan menggunakan metanol p.a 2 mL. Ditimbang masing-masing ekstrak 10 mg lalu di encerkan menggunakan pelarut 10 mL untuk mendapatkan konsentrasi 1%.

4) Penotolan sampel dan standar pembanding

Tahap pertama yang dilakukan yakni panaskan terlebih dahulu plat silika GF₂₅₄ yang telah dipotong sesuai ukuran dan sudah diberi garis atas dan bawah sebesar 1 cm menggunakan oven dengan suhu 110°C selama 30 menit untuk mengurangi kadar air pada plat silika. Plat silika kemudian di totolkan ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis dengan konsentrasi 1% serta standar pembanding kuersetin 0,1%. Tutup kembali dengan rapat dan biarkan hingga pengelusi sampai batas atas plat. Plat diangkat lalu dianginkan, kemudian diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Agar bercak pada plat terlihat jelas, lakukan penyemprotan dengan menggunakan AlCl₃.

5) Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan sinar UV 254 nm dan 366 nm.

Bercak yang terlihat dapat dilakukan penandaan dengan menggunakan pensil guna menentukan nilai Rf. Kemudian bandingkan antara standar kuersetin dan sampel. Nilai Rf dapat dihitung dengan menggunakan persamaan (2).

$$RF = \frac{\text{jarak bercak dari titik penotolan (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} \dots\dots\dots(2)$$

4. Uji aktivitas antibakteri

a. Sterilisasi alat

Semua alat yang akan digunakan, dibersihkan dibawah air mengalir lalu dikeringkan. Semprotkan alkohol 70% pada semua alat kemudian dikeringkan, selanjutnya bungkus semua alat dengan kertas payung untuk meminimalisir keberadaan bakteri. Alat yang disterilisasi yakni batang L, tabung reaksi, cawan petri dan *beaker glass*, kemudian alat disterilkan dengan metode panas kering menggunakan oven selama 1 jam dengan suhu 171°C. Dilakukan sterilisasi pada jarum ose dan pinset menggunakan api bunsen dengan cara dipijarkan sesaat sebelum digunakan.

b. Sterilisasi bahan

Bahan yang disterilisasi yaitu NaCl 0,9%, *blue tip*, media NA, akuades, dan media MHA. Metode sterilisasi ini menggunakan metode

panas basah yaitu menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

c. Pembuatan media

Pembuatan media dilakukan sebanyak dua kali yaitu media Nutrient Agar sebagai media peremajaan bakteri dan media Muller-Hinton agar untuk uji aktivitas antibakteri.

1) Nutrient Agar untuk peremajaan bakteri

Peremajaan ini dilakukan agar bakteri dapat aktif tumbuh secara optimal. Sejumlah 1,2 gram NA dan 60 mL akuades dilarutkan di dalam erlenmeyer, panaskan di atas *hot plate* dan dibantu *magnetic stirrer* hingga homogen. Media yang sudah dibuat dimasukkan kedalam erlenmeyer, kemudian lubang tabung erlenmeyer ditutup dengan kain kassa atau kapas lalu dibungkus dengan *aluminium foil*. Sterilkan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit yang bertekanan 1 atm. Media yang sudah disterilkan kemudian dituang pada 6 tabung reaksi steril dengan tiap-tiap tabung sebanyak 5 mL secara aseptis. Media didiamkan hingga memadat di suhu ruang dengan kemiringan 30°. Kultur isolat bakteri yang diuji diremajakan dan diinokulasikan pada media tersebut dan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

2) Muller-Hinton Agar untuk uji aktivitas antibakteri

Sebelum perlakuan uji langkah yang pertama yakni menimbang 10,54 gram MHA dan dilarutkan kedalam labu erlenmeyer yang berisi 310 mL akuades, panaskan di atas *hot plate* hingga mendidih menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut homogen. Tutup lubang erlenmeyer menggunakan kapas dan dibalut dengan *aluminium foil*, selanjutnya disterilisasi pada suhu 121°C dengan waktu 15 menit dengan tekanan 1 atm menggunakan autoklaf. Masukkan kedalam cawan petri steril didalam BSC lalu media dibiarkan hingga memadat. Media yang digunakan yakni MHA, alasannya karena secara umum media tersebut baik untuk uji sensitivitas antimikroba.

d. Pembuatan larutan *McFarland* 0,5

Larutan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 mL dicampur menggunakan larutan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL ke erlenmeyer, lalu dikocok hingga terbentuk larutan keruh (Taufouqurrahman & Pijaryani, 2023). Diukur nilai absorbansi standar *McFarland* dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm, agar mengetahui bahwa larutan standar tersebut memiliki nilai absorbansi 0,08-0,1. Jika hasil yang didapat tidak memenuhi syarat 0,08-0,1 maka dilakukan pengenceran dengan akuades dan diukur kembali dengan spektrofotometer UV-Vis sampai memenuhi syarat. Standar *McFarland* yang akan digunakan yaitu *McFarland* 0,5 artinya perkiraan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

e. Pembuatan suspensi bakteri

Kultur murni yang dipakai ialah bakteri *S.mutans* dibiakan dalam media NA secara aseptis dimasukkan ke inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakan *S.mutans* kemudian diambil sebanyak 1-2 ose, kemudian diencerkan dengan menggunakan NaCl 0,9% 5 mL dan disetarakan dengan kekeruhan standar *McFarland* atau setara dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ (CFU/mL) (Rukmana & Mulyowati, 2015).

f. Pembuatan seri konsentrasi larutan uji dan kontrol positif

Ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis dilarutkan sebanyak 20 gram menggunakan 20 mL DMSO 10% untuk memperoleh konsentrasi 100%. Lalu dibuat variasi konsentrasi 40%; 60% dan 80% dalam 5 mL DMSO 10% dengan rumus pengenceran $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ (Putri *et al.*, 2019). Larutan kontrol positif didapatkan dari RSGM Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

g. Uji Aktivitas Antibakteri

Diambil bakteri uji sebanyak 0,1 mL atau 100 µL, diinokulasikan di atas media MHA dan ratakan menggunakan batang L, kertas cakram yang akan digunakan direndam pada DMSO 10%, klorheksidin dan larutan sampel dengan seri konsentrasi yang sudah dibuat (40%, 60%, 80% dan 100%) selama 10 menit. Kertas cakram yang sudah direndam diletakkan di

atas permukaan media MHA secara aseptis dengan menggunakan pinset dan di tandai sesuai perlakuannya, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening di sekitar cakram diukur dengan menggunakan jangka sorong. Hasil yang diperoleh dihitung nilai rata-rata dan di tentukan klasifikasinya.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Analisis yang dilakukan yakni secara deskriptif dan diolah secara statistik dengan program SPSS. Zona hambat yang terbentuk dari beberapa seri konsentrasi dari 2 sampel dianalisis untuk mengetahui perbedaannya signifikan atau tidak. Sebelum dilakukan analisis secara statistik, data yang diperoleh harus di cek normalitas dan homogenitasnya. Untuk menentukan normalitas data digunakan uji *Shapiro-Wilk*. Pengujian ini dipakai apabila jumlah datanya < 50 . Jika tingkat signifikansi $> 0,05$ maka datanya dinyatakan terdistribusi normal. Kemudian uji homogenitas ditujukan guna melakukan pengujian varian data semua kelompok yaitu menggunakan uji *Lavene's*. Data disebut homogen apabila menghasilkan nilai signifikansi $> 0,05$. Setelah data normalitas dan homogenitas telah sesuai syarat, dilanjutkan uji *One-Way ANOVA (Analysis of Variance)* atau metode satu arah dengan tingkat kepercayaan 95%. Metode *One-Way ANOVA* untuk menentukan apakah data ada pengaruh konsentrasi terhadap zona hambat yang dibuktikan dengan nilai signifikan. Selanjutnya dilakukan uji *Kruskal-Wallis* apabila data yang diperoleh tidak terdistribusi normal.