

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain penelitian

Desain pada penelitian ini yaitu eksperimental laboratorium. Dalam penelitian ini ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Daya hambat antibakteri ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diuji dengan menggunakan metode difusi cakram.

B. Lokasi dan Waktu

Uji determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Pembuatan ekstrak, uji skrining fitokimia dan aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jendral Achmad Yani Yogyakarta pada bulan Januari sampai Agustus 2024.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi: Penelitian ini menggunakan kulit buah dan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dari perkebunan Sumber Batikan, Trirenggo, Kecamatan. Bantul, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta (-7.9082423, 110.3431691).
2. Sampel: Sampel yang digunakan terdiri dari masing-masing tiga kilogram kulit buah dan daun jeruk nipis. Kulit buah jeruk nipis yang dipilih yaitu kulit buah yang berwarna hijau kekuningan, sedangkan daun jeruk nipis yang dipilih yaitu daun jeruk berwarna hijau tua utuh (tidak berlubang) dan tidak di tumbuhi jamur. Sampel Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang digunakan diperoleh dari balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas
Seri konsentrasi ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis.
2. Variabel Terikat
Diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.
3. Variabel Terkendali
Waktu inkubasi media uji, karakteristik sampel kulit buah dan daun jeruk nipis.

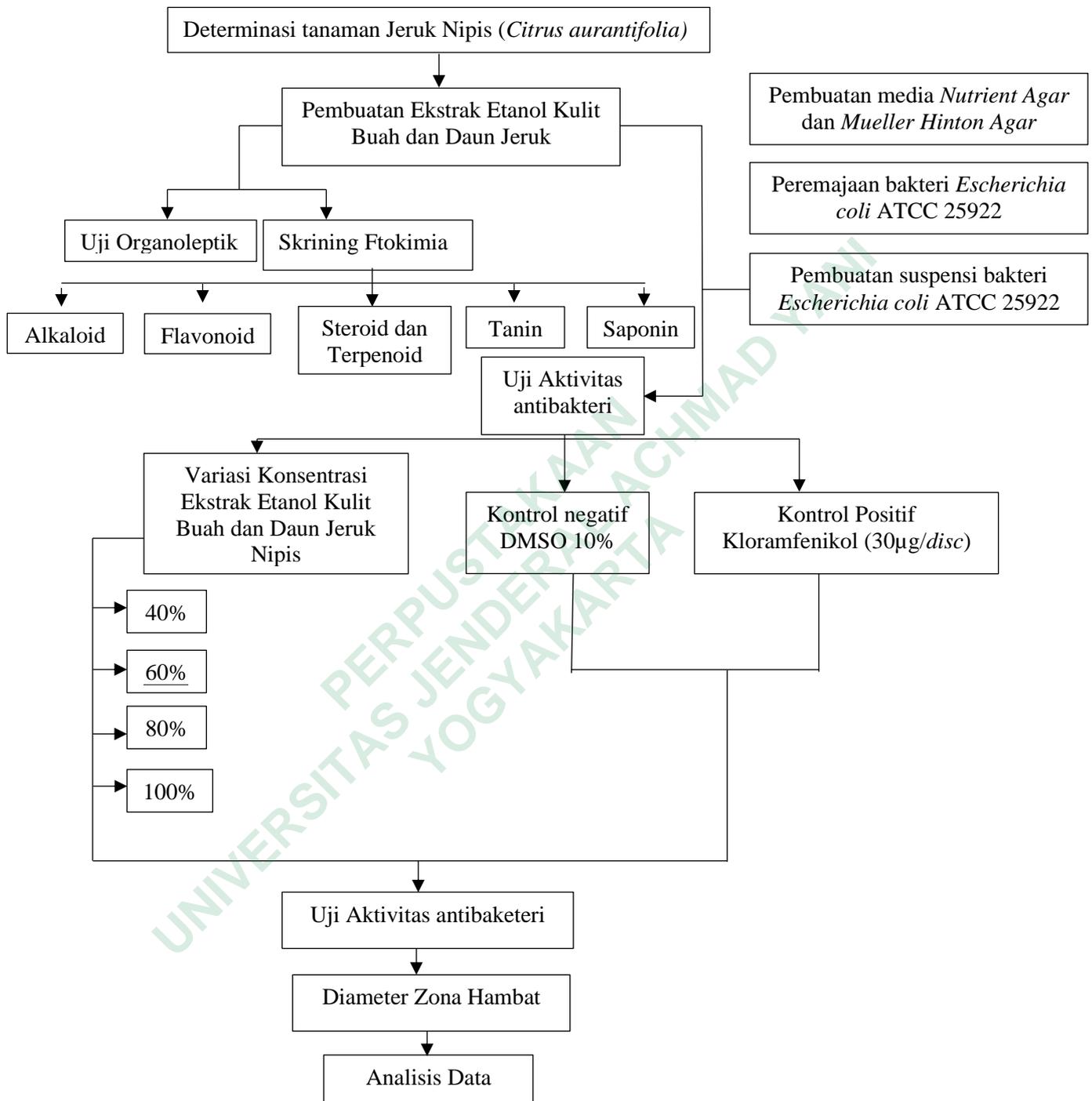
E. Definisi Operasional

1. Zona hambat adalah zona bening di sekitar kertas cakram yang tidak ditumbuhi bakteri dan diukur dengan menggunakan jangka sorong secara horizontal, diagonal dan vertikal.
2. Bagian tanaman jeruk nipis yang digunakan yaitu kulit buah jeruk nipis yang berwarna hijau kekuningan dan daun jeruk nipis yang berwarna hijau tua utuh (tidak berlubang) serta tidak di tumbuhi jamur.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
Ayakan 40 mesh, autoklaf (GEA), baskom, BSC, batang L, *blue tip*, corong plastic, cawan petri, Erlenmeyer (Iwaki), gelas ukur, gelas beaker, *hotplate*, inkubator (Memmer IN30), jarum ose, jangka sorong, kaca arloji, lemari pendingin, *magnetic stirrer*, mikropipet 100-1000 μL (OHAUS), neraca analitik, oven (Memmer IN60), pipet tetes, pipet ukur, propipet, pembakar bunsen, pinset, rak tabung, spatula kayu, toples kaca, timbangan, tabung reaksi (Iwaki)
2. Bahan
Kulit buah dan daun jeruk nipis, kertas saring, etanol 70%, reagen wagner, reagen dragendroff, reagen mayer, kloramfenikol *disc*, bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, HCl 2 N, serbuk magnesium, akuades, FeCl_3 , aluminium foil, media NA (Darmstadt), media MHA (Oxoid), NaCl 0,9%, DMSO, asam asetat, asam sulfat.

G. Pelaksanaan penelitian



Gambar 5. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan Sampel

a. Determinasi Tanaman Jeruk Nipis

Determinasi tanaman jeruk nipis dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi tanaman dilakukan dengan mengumpulkan gambar seluruh bagian tanaman jeruk nipis (buah, daun, akar, dan batang).

b. Preparasi Sampel

1) Pengumpulan Sampel

Sampel buah dan daun jeruk nipis diambil dari perkebunan Sumber Batikan Trirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta (-7.9082423,110.3431691). Buah jeruk nipis berwarna hijau kekuningan dikumpulkan sebanyak 10 kg kemudian kulit buah jeruk nipis dipisahkan menggunakan pisau untuk mendapatkan bagian kulit buah hingga lapisan mesokarp. Hasil kulit buah yang dikumpulkan yaitu sebanyak 3 kg. Daun jeruk nipis berwarna hijau tua sebanyak 3 kg dikumpulkan dengan memilih daun utuh (tidak berlubang) dan tidak di tumbuhi jamur.

2) Pembuatan Simplisia

Kulit buah dan daun jeruk nipis yang telah dikumpulkan dibersihkan menggunakan air mengalir, kemudian kulit buah dan daun jeruk nipis dikering anginkan selama 24 jam pada suhu ruang untuk selanjutnya dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 3x24 jam. Kulit buah dan daun jeruk nipis yang telah kering ditandai dengan simplisia yang mudah hancur pada saat diremas. Simplisia yang telah kering selanjutnya di blender untuk mendapatkan serbuk kulit buah dan daun jeruk nipis. Serbuk kulit buah dan daun jeruk nipis diayak menggunakan ayakan 40 mesh. Dikumpulkan serbuk yang telah lolos dari pengayakan pada masing-masing sampel.

3) Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Buah dan Daun Jeruk Nipis

Ekstraksi kulit buah dan daun jeruk nipis dilakukan dengan metode maserasi menggunakan perbandingan serbuk simplisia dan pelarut 1:10

selama 3x24 jam. Pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi yaitu etanol 70%. Sebanyak 150 gram serbuk sampel kulit buah dan daun jeruk nipis dimasukkan kedalam wadah kaca dan ditambahkan 1.5 L etanol 70%. Pengadukan dilakukan tiap 12 jam dengan menggunakan spatula hingga serbuk simplisia yang mengendap di bawah wadah naik ke permukaan. Proses maserasi dilakukan pada suhu ruang dengan kondisi terhindar dari cahaya matahari. Hasil maserasi pertama kemudian disaring menggunakan kertas saring dengan bantuan corong kaca. Serbuk sisa penyaringan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 1,5 L dan dilakukan remaserasi selama 1x24 jam dengan perlakuan yang sama seperti pada maserasi awal. Hasil remaserasi disaring menggunakan kertas saring dengan bantuan corong kaca, kemudian kedua hasil maserasi dilakukan penguapan pelarut dengan menggunakan penanggas air pada suhu 40°C hingga menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang, disimpan dalam botol kaca kemudian disimpan di dalam lemari pendingin (Nurhaini *et al.*, 2021). Dihitung nilai rendemen ekstrak kental yang diperoleh dinyatakan dengan Persamaan 1.

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

2. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan untuk mengamati bau, warna, rasa serta bentuk ekstrak kental kulit buah dan daun jeruk nipis.

3. Skrining Fitokimia

Pengujian skrining fitokimia pada ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis sebagai berikut :

a. Identifikasi Alkaloid

Ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis masing-masing ditimbang 0,5 gram kemudian dilarutkan menggunakan pelarut etanol sebanyak 15 mL. Hasil yang diperoleh disaring untuk mendapatkan filtratnya. Filtrat dibagi kedalam tiga tabung reaksi masing-masing

sebanyak 5 mL. Pada tabung pertama di tetesi pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes, tabung kedua ditetesi pereaksi Wagner sebanyak 3 tetes dan pada tabung ketiga ditetesi pereaksi Dragendrof sebanyak 3 tetes. Pada penambahan pereaksi Mayer, apabila terdapat endapan putih atau kuning menunjukkan positif mengandung alkaloid. Pada pereaksi Wagner, apabila terdapat endapan coklat menunjukkan positif mengandung alkaloid dan pada pereaksi Dragendrof apabila terdapat endapan jingga menunjukkan positif mengandung alkaloid (Arifuddin *et al.*, 2020).

b. Identifikasi Flavonoid

Ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis masing-masing ditimbang 0,5 gram kemudian dilarutkan kedalam etanol sebanyak 1 mL, lalu tambahkan serbuk Mg dan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Apabila larutan berubah warna menjadi merah/kuning/jingga maka hal tersebut menunjukkan bahwa positif mengandung flavonoid (Arifuddin *et al.*, 2020).

c. Identifikasi Steroid dan Terpenoid

Ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian dilarutkan dalam etanol sebanyak 1 mL dan ditambahkan pereaksi *Lieberman-Bouchard* yang terdiri dari asam asetat sebanyak 2 tetes dan asam sulfat sebanyak 1 tetes. Positif mengandung senyawa steroid apabila terdapat cincin berwarna biru kehijuan sedangkan hasil menunjukkan positif mengandung senyawa terpenoid apabila terdapat cincin kecoklatan atau violet pada larutan (Arifuddin *et al.*, 2020).

d. Identifikasi Tanin

Ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis masing-masing ditimbang 0,5 gram kemudian dilarutkan menggunakan etanol sebanyak 1 mL dan ditambahkan dengan 3 tetes pereaksi FeCl_3 pada masing-masing campuran. Hasil menunjukkan positif mengandung tanin apabila warna larutan berubah menjadi hijau kehitaman atau biru (Arifuddin *et al.*, 2020).

e. Identifikasi Saponin

Ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis masing-masing ditimbang sebanyak 0,5 gram. Tambahkan 10 mL air suling panas ke dalam

masing-masing ekstrak pada tabung reaksi, kemudian dipanaskan menggunakan penangas air. Kocok campuran dengan kuat hingga menimbulkan buih, kemudian tambahkan larutan HCl 2N sebanyak 1 tetes, tunggu selama 10 menit. Positif mengandung saponin ditunjukkan dengan tidak menghilangnya buih setelah penambahan HCl 2 N (Arifuddin *et al.*, 2020).

4. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Semua alat gelas dibersihkan diatas air mengalir hingga bersih kemudian dibungkus menggunakan kertas payung, selanjutnya alat disterilkan dengan metode panas kering menggunakan oven pada suhu 171°C selama 1 jam. Dilakukan sterilisasi pada jarum ose dan pinset menggunakan api bunsen dengan cara dipijarkan sebelum digunakan.

b. Sterilisasi Bahan

Bahan yang harus disterilkan antara lain *blue tip*, NaCl 0,9%, media *Nutrient agar*, dan media *Muller Hinton Agar*. Media disterilisasi dengan menggunakan metode sterilisasi panas basah autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atmosfer selama 15 menit.

c. Pembuatan Media

1) Pembuatan *Nutrient Agar* (NA)

Ditimbang sebanyak 1 gram NA dilarutkan dengan 50 mL akuades didalam erlenmeyer dan dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Media disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, tekanan 1 atmosfer. Media yang telah steril dimasukan kedalam tabung reaksi sebanyak 10 mL. Media dimiringkan dengan posisi 30° hingga memadat.

2) Pembuatan *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Ditimbang 4,1 g MHA dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 120 mL. Panaskan campuran menggunakan *hot plate* hingga homogen. Media yang telah homogen disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atmosfer. Media hasil sterilisasi

dimasukkan ke dalam cawan steril sebanyak 15 mL, lalu didiamkan hingga memadat (Hudaya, 2010).

d. Peremajaan Bakteri

Kultur bakteri *Escherichia coli* murni diambil menggunakan jarum ose steril, kemudian diinokulasikan pada media NA di dalam BSC dengan cara digoreskan secara zig zag. Bakteri yang telah digores pada media NA diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Hasanuddin & Salnus, 2020).

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Diambil 1-2 ose hasil peremajaan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan dilarutkan menggunakan NaCl 0,9% steril sebanyak 10 mL kemudian di vortex untuk menghomogenkan suspensi bakteri. Suspensi yang telah divortex selanjutnya dibaca nilai kekeruhannya menggunakan alat turbidimeter. Nilai kekeruhan suspensi bakteri yang digunakan yaitu setara dengan *Mc Farland* 0,5.

f. Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Uji

Ekstrak etanol kulit buah dan daun jeruk nipis ditimbang sebanyak 20 gram, kemudian dilarutkan menggunakan 20 mL DMSO 10% untuk memperoleh konsentrasi 100%. Dibuat variasi konsentrasi 40%, 60%, dan 80% dengan mengacu pada hasil perhitungan menggunakan rumus pengenceran $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ (Putri *et al.*, 2019).

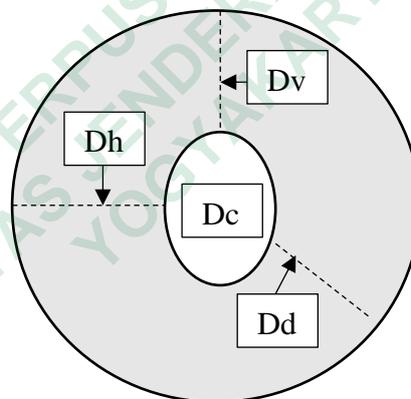
g. Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Buah dan Daun Jeruk Nipis

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di dalam BSC. Bakteri uji diambil menggunakan mikropipet sebanyak 0,1 mL atau 100 μ L, kemudian bakteri tersebut diinokulasikan pada media MHA dan di ratakan menggunakan batang L. Selanjutnya kertas cakram yang akan digunakan direndam pada DMSO 10 % dan larutan sampel pada masing-masing seri konsentrasi (40%, 60%, 80% dan 100%) selama 10 menit. Kloramfenikol (30 μ g/disc) digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini. Kertas cakram yang telah direndam selanjutnya dikering anginkan. Kertas cakram

diletakan pada permukaan media MHA secara aseptis menggunakan pinset. kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk di sekitar cakram kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong secara vertikal, diagonal dan horizontal. Hasil yang telah didapatkan kemudian di hitung nilai rata-ratanya dan ditentukan klasifikasi daya hambat bakteri (Tabel 2). Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali pada tiap kelompok uji.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Diameter zona hambat diukur dengan membalikkan cawan petri. Area bening di sekitar cakram menunjukkan kekuatan daya hambat dari senyawa uji. Zona hambat diukur secara vertikal, horizontal dan diagonal kemudian hasil dari pengukuran tersebut dirata-rata. Pengukuran dinyatakan dalam satuan milimeter (mm) (Magvirah *et al.*, 2019). Pengukuran diameter zona hambat secara vertikal, horizontal dan diagonal dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Diameter Zona Hambat

Keterangan:

-  = Zona hambat
- Dv = Diameter vertikal
- Dh = Diameter horizontal
- Dd = Diameter diagonal
- Dc = Cakram

Analisis data diameter zona hambat selanjutnya dianalisis secara statistika menggunakan program SPSS. Zona hambat yang terbentuk dari berbagai konsentrasi tersebut dianalisis untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan atau tidak. Uji statistika diawali dengan pengujian normalitas dan homogenitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Uji ini digunakan apabila data yang digunakan < 50 . Jika nilai signifikansi hasil pengujian $> 0,05$ maka data dapat dinyatakan terdistribusi normal. Uji selanjutnya yaitu uji homogenitas data. Uji homogenitas dilakukan untuk pengujian varian data kelompok dengan menggunakan uji *Lavene's*. Data dikatakan homogen apabila menghasilkan nilai signifikansi $> 0,05$. Data yang telah memenuhi syarat uji normalitas dan homogenitas, dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA*. Uji ini digunakan untuk menentukan apakah terdapat pengaruh konsentrasi terhadap zona hambat yang dihasilkan dengan dibuktikan melalui nilai signifikansi yang dihasilkan.