

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri air perasan buah jeruk purut, air perasan buah jeruk nipis, dan air perasan buah jeruk lemon terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* digunakan suatu metode eksperimental dimana peneliti akan melakukan beberapa rangkaian eksperimen untuk mendapatkan suatu data hasil pengujian yang dilakukan dengan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK) dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali pada tiap kelompoknya.

Adapun tahap penelitian meliputi pengumpulan buah jeruk, pembuatan air perasan dari buah jeruk, peremajaan bakteri *Streptococcus pyogenes*, pengujian aktivitas antibakteri air perasan buah jeruk terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*, dan pengujian metabolit sekunder serta kadar asam sitrat air perasan buah jeruk.

#### **3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi dalam penelitian ini adalah buah jeruk purut, buah jeruk nipis, dan buah jeruk lemon yang didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) Probolinggo, Jawa Timur. Sampel dalam penelitian ini adalah sebagian air perasan buah jeruk purut, air perasan buah jeruk nipis, dan air perasan buah jeruk lemon yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) di daerah Probolinggo, Jawa Timur.

### **3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Untuk pengambilan bahan baku di lokasi Balitjestro Probolinggo sedangkan untuk pelaksanaan penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Waktu penelitian akan dilaksanakan mulai tahap penyusunan proposal hingga tahap analisa data yaitu pada bulan November 2018 sampai dengan bulan Mei 2019.

### **3.4 Definisi Operasional Variabel**

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini terdiri atas variabel bebas dan variabel terikat. Dimana variabel bebas yang digunakan adalah air perasan buah jeruk purut, air perasan buah jeruk nipis, dan air perasan buah jeruk lemon. Sedangkan variabel terikat yang digunakan adalah aktivitas antibakteri yang ditandai dengan terbentuknya diameter zona bening pada masing-masing perlakuan, kandungan senyawa metabolit sekunder, dan kadar asam sitrat yang terkandung pada masing-masing air perasan buah jeruk.

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Bebas: air perasan buah jeruk purut, nipis, dan lemon	Sejumlah air jeruk purut, nipis, dan lemon yang didapatkan dari proses pemerasan	<i>Beaker glass</i>	Volume	Nominal
2.	Terikat : Hasil uji metabolit sekunder air perasan buah jeruk purut, nipis, dan lemon	Serangkaian uji untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung meliputi alkaloid, saponin, tanin, dan flavonoid	Tabung reaksi	Alkaloid: pereaksi Dragendorff (↓ jingga). Saponin: busa stabil. Tanin: warna hijau-cokelat. Flavonoid: kuning jingga-merah	Ordinal
	Hasil uji kadar asam sitrat	Suatu senyawa asam sitrat yang terkandung dalam air perasan buah jeruk dengan metode titrasi asam basa	Buret	Prosentase	Nominal
	Hasil uji aktivitas antibakteri	Kemampuan suatu bahan antibakteri dalam menghambat dan atau membunuh bakteri yang ditandai adanya zona hambat yang terbentuk.	Jangka sorong	Diameter zona hambat	Nominal

### 3.5 Alat dan Bahan Penelitian

Pada tahap ini, peneliti melakukan persiapan seluruh bahan dan alat yang akan digunakan. Bahan – bahan yang digunakan antaralain buah jeruk purut, buah jeruk nipis, dan buah jeruk lemon yang diperoleh dari Balitjestro Probolinggo, media MHA, bakteri *Streptococcus pyogenes* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, larutan NaCl 0,9%,

larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%, larutan  $\text{BaCl}_2$  1%,  $\text{FeCl}_3$ , pereagen Dragendorff, serbuk magnesium (Mg), HCl, alkohol 70%, larutan NaOH 0,1 N, larutan  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  0,1 N, indikator PP dan aquades.

Sedangkan untuk alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini antarlain autoklaf, oven, inkubator merek Tech Inki, jangka sorong, bunsen, gelas ukur berukuran 10 mL dan 100 mL merek Tech Inki, alat pemeras jeruk, cawan petri, tabung reaksi merek Pyrex, corong gelas dengan ukuran 50 mL merek Pyrex, batang pengaduk, beaker glass ukuran 100 mL merek Pyrex, kawat oase, *blue tip*, mikropipet, LAF, buret, klem, statif, dan pipet.

### **3.6 Prosedur Penelitian**

Adapun beberapa tahapan dan prosedur penelitian yang dilakukan dalam melaksanakan penelitian ini diantaranya:

#### **3.6.1 Pembuatan air perasan buah jeruk**

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk mendapatkan air perasan buah jeruk adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan buah jeruk purut, buah jeruk nipis, dan buah jeruk lemon
2. Mencuci buah jeruk dengan air mengalir untuk membersihkan buah jeruk dari kotoran yang berasal dari lingkungan
3. Memotong buah jeruk menjadi dua bagian kemudian diperas buah jeruk sampai didapatkan air perasan masing – masing buah sebanyak 50 mL (Haq, *et al.* 2010).

### 3.6.2 Pembuatan media MHA

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk membuat media MHA (preparasi 38 g/1000 mL) adalah sebagai berikut:

1. Menimbang 11,4 gram media MHA pada neraca analitik dan dimasukkan pada erlenmeyer
2. Melarutkan media dengan aquades sebanyak 300 mL dan dipanaskan media di atas api bunsen sambil diaduk, dan ditunggu sampai mendidih
3. Menutup mulut erlenmeyer menggunakan kapas dan dilakukan sterilisasi media pada autoklaf dengan tekanan 1 atm, suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit (Bowen, *et al.* 2012).

### 3.6.3 Peremajaan dan pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes*

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk melakukan peremajaan bakteri adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan bakteri *Streptococcus pyogenes* yang akan diremajakan, kemudian disiapkan media miring sebanyak 5 tabung
2. Melakukan peremajaan menggunakan kawat oase dengan menyentuh ujung kawat oase pada inokulum bakteri dan diremajakan dengan menggunakan teknik streak pada media miring.
3. Menginkubasi bakteri dalam inkubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 – 48 jam (Bowen, *et al.* 2012).

Untuk pembuatan suspensi bakteri rangkaian prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Mengambil biakan bakteri menggunakan kawat oase dan dilarutkan dalam 25 mL larutan NaCl 0,9%.

2. Melihat dan menyetarakan kekeruhan suspensi bakteri menggunakan spektrofotometer dengan metode *Mc Farland* dengan larutan standar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% dan BaCl<sub>2</sub> 1% setara dengan jumlah sel 10<sup>8</sup> CFU/mL yang sesuai dengan tabel larutan standar (terlampir dalam lampiran 6 dan 7). Menurut Brooks (2008) jumlah rata-rata bakteri untuk menimbulkan infeksi klinis pada manusia adalah 10<sup>5</sup> - 10<sup>8</sup> (Mchan. 2014).

#### 3.6.4 Inokulasi bakteri *Streptococcus pyogenes*

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk melakukan inokulasi bakteri adalah sebagai berikut:

1. Menginokulasi suspensi bakteri sebanyak 1 ml pada masing-masing cawan
2. Memasukkan media MHA ke dalam masing-masing cawan petri menggunakan metode *pour plate* sebanyak kurang lebih 15 mL kemudian ditunggu hingga media memadat (Berlian. 2016).

#### 3.6.5 Pengujian Senyawa Metabolit Sekunder

Prosedur pengujian senyawa metabolit sekunder dari air perasan buah jeruk purut, jeruk nipis, dan jeruk lemon meliputi: (Ergina, *et al.* 2014 dan Sakka. 2018)

##### 3.6.5.1 Uji Alkaloid

1. Mengambil sebanyak 2 mL untuk setiap sampel air perasan buah jeruk dan diletakkan pada tiga tabung reaksi yang berbeda.
2. Menetesi sebanyak 5 tetes pereagen dragendorff pada masing-masing air perasan, jika masing-masing larutan terbentuk endapan jingga maka positif mengandung alkaloid (Ergina, *et al.* 2014).

#### 3.6.5.2 Uji Saponin

1. Mengambil 2 mL untuk masing-masing sampel air perasan buah jeruk dan diletakkan pada tiga tabung reaksi yang berbeda.
2. Menambahkan 10 mL air dan dikocok dengan kuat selama 10 menit. Jika pada larutan terbentuk buih atau busa yang stabil dan bertahan lebih dari 10 menit, maka sampel positif mengandung saponin (Sakka. 2018).

#### 3.6.5.3 Uji Tanin

1. Mengambil sebanyak 2 mL masing-masing sampel air perasan buah jeruk yang diletakkan pada 3 tabung reaksi yang berbeda
2. Memanaskan kurang lebih selama 5 menit. Setelah dipanaskan, pada masing-masing sampel ditambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$  1% , jika masing-masing larutan terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman maka sampel positif mengandung tanin (Sakka. 2018).

#### 3.6.5.4 Uji Flavonoid

1. Mengambil sebanyak 2 mL setiap sampel air perasan buah jeruk yang diletakkan pada 3 tabung reaksi yang berbeda
2. Memanaskan kurang lebih selama 5 menit.
3. Setelah dipanaskan, masing-masing sampel ditambahkan dengan 0,1 gram serbuk magnesium (Mg) dan 5 tetes asam klorida pekat, jika masing-masing larutan terbentuk warna kuning jingga sampai merah, maka sampel positif mengandung flavonoid (Ergina, *et al.* 2014).

#### **3.6.6 Pengujian kadar asam sitrat**

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk melakukan pengujian kandungan asam sitrat masing-masing buah jeruk adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan air perasan buah jeruk masing-masing 30 mL untuk tiga kali pengulangan.
2. Melakukan pembakuan larutan NaOH dengan cara disiapkan 10 mL larutan  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  0,1 N dan ditambahkan 2-3 tetes indikator PP kedalam erlenmeyer.
3. Memasukkan larutan NaOH ke dalam buret dan dilakukan titrasi sampai terdapat perubahan warna violet muda dan direplikasi sebanyak tiga kali
4. Melakukan penetapan kadar asam sitrat air perasan buah jeruk dengan cara dititrasi sampel air perasan jeruk yang ditambahkan 2-3 tetes indikator PP dengan larutan NaOH sampai didapatkan perubahan warna violet muda serta dilakukan replikasi pengujian sebanyak tiga kali (Haq, *et al.* 2010).

#### 3.6.7 Pengujian aktivitas antibakteri

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk melakukan pengujian aktivitas antibakteri air perasan buah jeruk terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan cawan petri steril sebanyak 11 buah (9 untuk dilakukan uji, 1 sebagai kontrol media, dan 1 sebagai kontrol bakteri).
2. Membuat lubang sumuran pada 9 buah cawan petri menggunakan bor sumuran pada tengah-tengah cawan.
3. Melakukan uji aktivitas antibakteri dengan cara dimasukkan masing-masing air perasan jeruk purut, nipis, dan lemon sebanyak 250  $\mu\text{L}$  ke dalam lubang sumuran berdiameter 8,02 mm dan direplikasi sebanyak 3 kali
4. Menginkubasi dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam. Setelah itu dilakukan pengamatan dan pengukuran zona bening yang terbentuk pada



masing-masing cawan petri dengan menggunakan jangka sorong (Bowen, *et al.* 2012).

### 3.7 Analisis Data

Dalam suatu penelitian ilmiah terutama yang bersifat eksperimental, peran statistika sangat penting dalam menetapkan sebuah keputusan atau penarikan kesimpulan, salah satunya adalah ANOVA. Uji ANOVA (*Analysis of Variances*) merupakan jenis uji statistika yang bertujuan untuk menganalisa apakah sampel-sampel yang dimiliki memiliki rata-rata yang sama dengan syarat data harus homogen dan terdistribusi normal yang ditandai dengan adanya nilai  $\text{sig} > 0,05$  (Kusnendi. 2016).

Data dari hasil penelitian ini akan diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan analisis data dengan menggunakan sistem komputerisasi dengan program SPSS versi 23,0. Selanjutnya data yang telah homogen akan dilakukan uji ANOVA dengan ketentuan jika nilai  $\text{sig} < 0,05$  maka  $H_0$  ditolak, begitu sebaliknya. Apabila telah dilakukan uji statistik ANOVA mendapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan maka dapat dilanjutkan dengan uji lanjutan menggunakan Uji LSD (*Least Significant Differences*) atau BNT (Beda Nyata Terkecil) dimana uji ini cocok digunakan pada sampel dengan jumlah yang besar dan dapat mengidentifikasi perbedaan dengan ketelitian yang cukup tinggi. Hasil pengujian uji LSD dapat diketahui dengan melihat adanya tanda \*) pada tabel yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada sampel uji.