

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan eksperimental. Metode eksperimental adalah penelitian yang bersifat membuktikan tidak diketahui hasil akhir. Metode penelitian ekperimental ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum ekstrak kulit jeruk nipis terhadap bakteri *staphylococcus aureus*.

Tahap pelaksanaan terdiri dari pengambilan kulit jeruk nipis, pencucian, perajangan, pengeringan, pembuatan simplisia, pembuatan sampel ekstrak, uji skrining fitokimia, pemberian sampel pada objek penelitian dan pengamatan daya hambat bakteri. Tahap akhir yaitu melakukan analisa data yang diperoleh dari hasil penelitian.

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

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Sampelnya adalah ekstrak kulit jeruk nipis dengan konsentrasi 10%, 15%, 20% dan 25%.

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

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Akademi Putra Indonesia Malang pada Desember-Juni 2018 ( untuk pengambilan dilakukan di balai jestro).

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

Pada penelitian ini terdapat dua variabel, yaitu variabel independent dan variabel dependen. Variabel independen (bebas) dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak dari kulit jeruk nipis dan variabel dependen (terikat) adalah aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah zona hambat pada area sumuran.

**Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel**

<b>Variabel Penelitian</b>	<b>Definisi Operasional</b>	<b>Hasil Ukur</b>	<b>Alat Ukur</b>	<b>Skala Ukur</b>
Ekstrak kulit jeruk nipis dengan variasi konsentrasi 10%, 15%, 20% dan 25%	Hasil proses ekstraksi kulit jeruk nipis yang diperoleh melalui metode ekstraksi maserasi dengan etanol 70% dan di encerkan dengan variasi konsentrasi 25%, 20%, 15% dan 10%	Ekstrak kulit jeruk nipis 10%, 15%, 20% dan 25%	Timbangan	Nominal
Aktivitas antibakteri	Kemampuan suatu senyawa dapat memberikan efek bagi mikroorganisme.	Diameter zona hambat disekitar sumuran (mm)	Jangka sorong	Nominal

### 3.5 Instrumen Penelitian

### 3.5.1 Bahan

Dalam penelitian ini bahan yang digunakan meliputi, Kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), bakteri *Staphylococcus aureus*, *Manitol Salt Agar* (MSA), ethanol 70% larutan NaCl 0,9%, aquadest

### 3.5.2 Alat

Alat yang yang digunakan adalah alat sentrifuge, gelas ukur (Iwake Pyrex), neraca analitik (OHAUS), tabung reaksi, mikro pipet (Transferpet tes), beaker glass (Iwake Pyrex), labu ukur, corong (Herma), cawan petri, bunsen, inkubator (Memmart), autoklaf (All American), oven(Memmart), jarum ose, bor sumuran ukuran, vortex (Maxi Mix II), erlenmeyer (Iwake Pyrex).

## 3.6 Prosedur Penelitian

### 3.6.1 Pengumpulan Sampel Jeruk Nipis

Jeruk nipis diperoleh dari perkebunan Balit Jestro, Probolinggo, JawaTimur.

### 3.6.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Nipis

Pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis dilaksanakan di Laboratorium Farmakog Academi Farmasi Putra Indonesia Malang. Bahan baku yang dipakai berupa buah jeruk nipis dibersihkan, dikupas kulitnya sehingga yang tersisa kulit jeruk nipis. Selanjutnya kulit jeruk nipis diiris halus dan diperoleh bahan baku kulit jeruk nipis, kemudian dikeringkan di oven selama 24jam pada suhu 50-55°C (Triana, 2013).

Kulit jeruk yang telah kering kemudian ditimbang kembali, kemudian diambil 100 gram untuk diblender sampai menjadi serbuk simplisia, Maserasi sampel dengan cara merendam 100 gram serbuk kulit jeruk nipis dimaserasi dengan 300 mL pelarut etanol 70% pada temperatur kamar atau 25°C selama 3 hari.

Kemudian disaring dan diambil filtratnya, setelah itu dimasukkan kedalam botol tidak tembus cahaya. Hasil maserasi dipekatkan dengan bantuan alat penguap *rotary evaporator* pada suhu tidak lebih dari 40°C sampai diperoleh ekstrak kental. (Wang dan Chau-jong, 2008)

### 3.6.3 Uji Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

#### 3.6.3.1 Uji Alkaloid

##### 3.6.3.1.1. Reaksi Pengendapan

Larutan percobaan untuk pengendapan alkaloid dibagi menjadi 4 golongan sebagai berikut :

1. Golongan I : Larutan Percobaan dengan alkaloid membentuk garam yang tidak larut, asam silikowolframat LP, asam fosfomolibdat LP dan asam foswolframat LP.
2. Golongan II : Larutan percobaan yang dengan alkaloid membentuk senyawa kompleks bebas, kemudian membentuk endapan: Bouchardat LP dari Wagner LP.
3. Golongan III : Larutan percobaan yang dengan alkaloid membentuk senyawa adis yang tidak larut: Mayer LP, Dragendorff LP dan Marme LP.
4. Golongan IV : Larutan percobaan yang dengan alkaloid membentuk ikatan asam organik dengan alkaloid: Hager LP.

## 2. Pengujian Senyawa Alkaloid

Timbang 500mg serbuk simplisia, tambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL, panaskan di atas tangas air selama 2 menit, dinginkan dan saring. Pindahkan 3 tetes filtrat pada kaca arloji, tambahkan 2 tetes Bouchardat LP. Jika pada kedua percobaan tidak terjadi endapan, maka serbuk tidak mengandung alkaloid.

Jika dengan Mayer LP terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam metanol P dan dengan Bouchardat LP terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, maka ada kemungkinan terdapat alkaloid.

Lanjutkan percobaan dengan mengocok sisa filtrat dengan 3 mL amonia pekat P dan 10 mL campuran 3 bagian volume eter P dan 1 bagian volume kloroform P. Ambil fase organik, tambahkan natrium sulfat anhidrat P, saring. Uapkan filtrat di atas tangas air, larutkan sisa dalam sedikit asam klorida 2N. Lakukan percobaan dengan keempat golongan larutan percobaan, serbuk mengandung alkaloid jika sekurang-kurangnya terbentuk endapan dengan menggunakan 2 golongan larutan percobaan yang digunakan. (Depkes RI, 1989)

#### 3.6.3.2 Uji Saponin

Masukkan 0,5g serbuk yang diperiksa ke dalam tabung reaksi, tambahkan 10mL air panas, dinginkan dan kemudian kocok kuat-kuat selama 10detik. (Jika zat yang diperiksa berupa sediaan cair, encerkan 1mL sediaan yang diperiksa dengan 10mL air dan kocok kuat-kuat selama 10 menit), terbentuk buih yang maniap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes asam klorida 2N, buih tidak hilang. (Depkes RI, 1989)

#### 1.6.3.3 Uji Flavonoid

##### 1. Larutan Percobaan

Sari 0,5g serbuk yang diperiksa atau sisa kering 10 mL sediaan berbentuk cairan, dengan 10 mL metanol p, menggunakan alat pendingin balik selama 10 menit. Saring panas melalui kertas saring kecil berlipat, encerkan filtrat dengan 10 mL air. Setelah dingin tambahkan 5 mL eter minyak tanah P, kocok hati-hati, diamkan. Ambil lapisan metanol, uapkan pada suhu 40° dibawah tekanan. Sisa dilarutkan dalam 5 mL etil asetat P, saring.

## 2. Pengujian Senyawa Flavonoid

Uapkan hingga kering 1 mL larutan percobaan, sisa dilarutkan dalam 1 mL sampai 2 mL etanol (95%) P, tambahkan 0,5g serbuk seng P dan 2 mL asam klorida 2 N, diamkan selama 1 menit. Tambahkan 10 tetes asam klorida pekat P, jika dalam waktu 2 sampai 5 menit terjadi warna merah intensif, menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol).

Uapkan hingga kering 1 mL larutan percobaan sisa dilarutkan dalam 1 mL etanol (95%) P, tambahkan 0,1g serbuk magnesium P dan 10 tetes asam klorida pekat P, jika terjadi warna merah jingga sampai merah ungu, menunjukkan adanya flavonoid, jika terjadi warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan autron.

Uapkan hingga kering 1 mL larutan percobaan, basahkan sisa dengan aseton P, tambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan serbuk halus asam oksalat P, panaskan hati-hati diatas tangas air dan hindari pemanasan yang berlebihan. Campur sisa yang diperoleh dengan 10 mL eter P. Amati dengan sinar ultraviolet 366 nm, larutan berfluorosensi kuning intensif, menunjukkan adanya flavonoid.

### 1.6.3.4 Uji Tanin

Lebih kurang 2g serbuk yang ditimbang saksama panaskan dengan 50 mL air mendidih diatas tangas air selama 30 menit sambil diaduk. Diamkan selama beberapa menit enap tuangkan melalui segumpal kapas kedalam labu takar 250 mL. Sari sisa dengan air mendidih, saring larutan kedalam labu takar yang sama. Ulangi penyarian beberapa kali hingga larutan bila direaksikan dengan besi (III) amonium sulfat tidak menunjukkan adanya tanin. Dinginkan cairan dan tambahkan air secukupnya hingga 250 mL. Pipet 25 ml larutan kedalam labu 1000 mL tambahkan 750 mL air dan 25 mL asam indigo sulfonat LP, titrasi dengan

kalium permanganat 0,1 N hingga larutan berwarna kuning emas, 1 mL kalium permanganat 0,1 N hingga berwarna kuning emas 1 mL kalium permanganat 0,1 N setara dengan 0,004157g tanin. Lakukan percobaan blangko.

Larutkan 1g indogo karmin P dalam 25 mL asam sulfat P, tambahkan 25 mL asam sulfat P lagi dan encerkan dengan air secukupnya hingga 1000 mL. (Pengenceran dilakukan dengan menuangkan larutan kedalam sebagian besar air, kemudian encerkan dengan secukupnya hingga 1000 mL)

#### 3.6.4 Sterilisasai alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri ini, disterilkan terlebih dahulu sebelum dipakai. Alat-alat glass wax dan media disterilkan didalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### 3.6.5 Pengenceran Ekstrak Kulit Jeruk Nipis

Metode Ferdinan Pasaribu (2017), Ekstrak kulit jeruk nipis ditimbang menggunakan *Electronic balance*. Disediakan delapan buah tabung pada tabung pertama diisi 10 ml ekstrak kulit jeruk nipis sehingga diperoleh ekstrak kulit jeruk nipis dengan konsentrasi 100%. Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan cara mengambil 5ml ekstrak kulit jeruk nipis konsentrasi 100% menggunakan mikropipet dan diletakkan pada tabung ke-2 untuk mendapatkan ekstrak kulit jeruk nipis 50% (pengenceran ganda), seterusnya sampai didapatkan konsentrasi 10%, 15%, 20% dan 25%. Tabung-tabung tersebut kemudian diberi label sesuai konsentrasinya.

### 3.6.6 Pembuatan media MSA

#### 3.6.6.1 Kontrol Media

Dimasukkan media MSA sebanyak 15 mL ke dalam cawan petri dan ditunggu hingga memadat. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 24 jam.

#### 3.6.6.2 Kontrol Bakteri

Dimasukkan suspensi bakteri ke dalam cawan petri sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet Kemudian dimasukkan media MSA sebanyak 15 mL lalu digoyang-goyangkan sesuai angka 8 dan biarkan memadat. Lubang sumuran dibuat pada media MSA yang telah berisi bakteri *staphylococcus aureus*. kemudian dibungkus dengan kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 24 jam.

### 3.6.7 Prosedur Pembuatan Suspensi Bakteri

Masing-masing bakteri yang telah dibiakkan secara murni pada media MSA yang telah disiapkan pada prosedur sebelumnya dalam suasana aerob. Diambil sebanyak 1-2 ose dari biakan murni bakteri uji yang telah dikultur disuspensikan dengan menggunakan larutan NaCl 0,9 % 10 mL sampai diperoleh kekeruhan sesuai standard 0,5 *Mc Farland* atau sebanding dengan jumlah bakteri 1 x 10<sup>8</sup> CFU/ml.

### 3.6.8 Uji Aktifitas Bakteri Dengan Metode Sumuran

Disiapkan 4 cawan petri dituangkan media MSA sebanyak 25 mL kemudian suspense bakteri *Stapilococcus aureus* diinokulasi kedalam cawan petri 4 cawan petri meliputi 4 perlakuan yakni ekstrak etanol 70% kulit jeruk nipis dengan varian konsentrasi yaitu 10%, 15%, 20% dan 25%, Dibiarkan media sampai



memadat. Pada setiap lempeng MSA yang telah diinokulasi bakteri *Stapilococcus aureus* dibuat 1 lubang sumuran menggunakan borer steril dengan diameter 8,02 cm dan dimasukan 250 microlit menggunakan blue tip pada lubang sumuran dengan konsentrasi 10%, 15%, 20% dan 25%, dan di replikasi sebanyak 3 kali.

Media yang sudah diberi perlakuan dimasukan dalam inkubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat diukur diameternya menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan 6 kali pengulangan.

### **3.7 Analisis Data**

Data dari hasil penelitian ini akan diolah dan disatukan dalam bentuk tabel dan dianalisis data dengan menggunakan One Way ANOVA untuk mengetahui perbedaan pada ekstrak kulit jeruk nipis dengan varian konsentrasi yaitu 10%, 15%, 20% dan 25%. Kemudian dilanjutkan dengan post Hoc LSD untuk mengetahui perbedaan secara signifikan dari varian konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis