

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antifungi ekstrak 70% kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap jamur *Candida albicans*. Tahap penelitian ini meliputi persiapan alat dan bahan, pengumpulan kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dari Balijestro Probolinggo, pengeringan, pembuatan serbuk simplisia, melakukan ekstraksi menggunakan etanol 70%, pengenceran dengan konsentrasi 50%, 35%, 25%, 15%, peremajaan jamur *Candida albicans*, pembuatan suspensi, pengukuran transmitan, pengujian antibiotik dengan metode difusi sumuran, analisis data.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi

Populasi merupakan keseluruhan dari objek yang akan diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang diambil di Balitjestro Probolinggo.

3.2.2 Sampel

Sampel merupakan bagian dari populasi yang diteliti. Sampel yang digunakan adalah sebagian ekstrak etanol 70% kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).

3.3 Lokasi dan Waktu

3.3.1 Lokasi

Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Pengumpulan bahan dilakukan di Balitjestro Probolinggo.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai tahap penyusunan proposal hingga tahap analisis data yaitu pada bulan Desember 2018 sampai dengan bulan Mei 2019

3.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional dalam penelitian ini dari variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada peneliti ini ekstrak konsentrasi 15%, 25%, 35%, dan 50% kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antifungi ekstrak etanol 70% kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap jamur *Candida albicans*.

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variable

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Indikator/ Hasil Ukur	Alat Ukur	Skala Ukur
Bebas Ekstrak etanol 70% kulit jeruk nipis	: Ekstrak etanol 70% dengan konsentrasi kulit jeruk nipis 50%, 35%, 25%, 15%.	Gram	Neraca analitik	Nominal
Terikat skrining fitokimia ekstrak etanol 70% kulit jeruk nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>)	: Uji metabolit sekunder ekstrak meliputi flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonoid : Ungu • Tanin : Biru hitam • Saponin : Berbusa • Alkaloid : Endapan putih 	Warna	Ordinal
Aktivitas antifungi	Uji daya hambat yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening.	5-10mm = Sedang 10-19mm = Kuat > 20 = Sangat Kuat	Jangka sorong	Nominal

3.5 Alat dan Bahan

Instrumen penelitian adalah semua alat dan bahan yang digunakan untuk pengumpulan data. Adapun alat dan bahan yang digunakan adalah sebagai berikut.

3.5.1 Alat

Dalam penelitian itu alat yang digunakan meliputi., timbangan analitik merk OHAUS, oven merk MEMMERT, pisau, beaker glass merk Iwake Pyrex, batang pengaduk, gelas ukur merk Iwake Pyrex, kaki tiga, kawat kassa, lampu spriritus, erlemeyer merk Iwake Pyrex, tabung reaksi, rak tabung reaksi, alumunium foil, jarum ose, cawan petri, mikro pipet merk Trans Ferpettes, bluetip, laminar air flow

merk Mas Cotte (Model LH-S), inkubator merk MEMMERT, autoklaf merk Allamerican, corong merk Herma, Vortex merk Maxi Mix II, kapas, jangka sorong, bor (pelubang sumuran), penggaris, kertas coklat, spidol.

3.5.2 Bahan

Dalam penelitian ini bahan yang digunakan meliputi,. Kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), fungi *Candida albicans* yang diperoleh dari laboratorium Universitas Brawijaya, *Saboroud Dextrose Agar* (SDA), ethanol 70% larutan NaCl 0,9%, FeCl₃, aquadest.

3.6 Prosedur Penelitian

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

3.6.1 Pengambilan Sampel Kulit Jeruk Nipis

1. Mengambil kulit buah jeruk nipis di Balijestro Probolinggo.
2. Membersihkan dari kotoran, lalu dicuci menggunakan air bersih mengalir kemudian ditiriskan.

3.6.2 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% yaitu sebagai berikut :

1. Meniimbang serbuk simplisia sebanyak 56,2 gram, lalu dimasukkan ke dalam botol coklat
2. Merendam serbuk simplisia dengan etanol 70% sebanyak 2670 mL dan disimpan 3 hari.
3. Menyimpan selama 3 hari, dilakukan penyaringan dengan corong Buchner untuk memperoleh ekstrak dari simplisia.

4. Ekstrak yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 70°C sampai diperoleh ekstrak kental
5. Melakukan uji organoleptis (bentuk, bau, warna). Kemudian dibuat 4 varian dosis dengan konsentrasi 50%, 35%, 25%, 15%.

3.6.3 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

3.6.3.1 Uji Flavonoid

1. Mengambil masing-masing konsentrasi sebanyak 2mL sampel ekstrak etanol 70% kulit jeruk nipis
2. Memanaskan kurang lebih 5 menit. Setelah dipanaskan masing-masing ditambahkan dengan 5 tetes HCl pekat.
3. Jika masing-masing larutan terbentuk warna kuning jingga sampai merah, maka positif menandung flavonoid (Kurniawan *et al.*, 2008)

3.6.3.2 Uji Tanin

1. Mengambil masing-masing konsentrasi sebanyak 2mL sampel ekstrak etanol 70% kulit jeruk nipis.
2. Memanaskan kurang lebih 5 menit. Setelah dipanaskan masing-masing ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1%.
3. Jika masing-masing larutan terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman maka positif mengandung Tanin (Kurniawan *et al.*, 2008)

3.6.3.3 Saponin

1. Mengambil ekstrak etanol 70% sebanyak 1 mL ditambahkan aquadest 10 mL dan dikocok selam 10 menit sampai muncul busa.
2. Tabung reaksi diletakkan dalam posisi tegak selama 20 menit.

3. Apabila masih terdapat busa, maka kemungkinan mengandung saponin. Untuk memastikan bahwa busa yang terbentuk berasal dari saponin maka dipastikan terdapat saponin (Sakka, 2018)

3.6.3.4 Alkaloid

1. Mengambil masing-masing konsentrasi sebanyak 2mL sampel ekstrak etanol 70% kulit jeruk nipis.
2. Setelah itu masing-masing ekstrak ditambahkan dengan 5 tetes reagen dragendroff. Jika masing-masing terbentuk endapan jingga maka positif mengandung alkaloid.
3. Selanjutnya untuk uji alkaloid menggunakan reagen mayer dilakukan dengan cara mengambil ekstrak etanol 70% kulit jeruk nipis sebanyak 2 mL kedalam 2 tabung reaksi.
4. Setelah itu masing-masing ekstrak ditambahkan 3 tetes asam klorida pekat dan tambahkan 3 tetes reagen mayer. Jika larutan terbentuk endapan putih maka sampel positif mengandung alkaloid (Kurniawan *et al.*, 2008)

3.6.4 Sterilisasi Alat dan Bahan

1. Menyiapkan terlebih dahulu alat dan bahan yang akan digunakan seperti cawan petri, tabung reaksi, erlemeyer, beaker glass, dan bluetip.
2. Menyiapkan 14 cawan petri kosong, 10 bluetip dimasukkan dalam beaker glass 100 ml, 12 tabung reaksi, dan dibungkus kertas coklat.
3. Semua alat dan bahan disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121⁰C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (Ardelia *et al.*, 2017)

3.6.5 Pembuatan Media

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk membuat media SDA (preparasi 65/1000 mL) adalah sebagai berikut :

1. Menimbang 18,2 gr SDA dan dilarutkan dengan 280 mL aquadest dalam erlemeyer dipanaskan sampai mendidih
2. Media kemudian ditutup dengan kertas coklat lalu disterilkan didalam autoklaf selama 15 menit, pada suhu 121⁰C pada 1 atm.
3. Setelah steril media dituangkan ke 10 tabung reaksi dan miringkan sampai memadat (Rosidah *et al.*, 2014)

3.6.6 Peremajaan Fungi

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk peremajaan jamur adalah sebagai berikut :

1. Inokulasi I ose *Candida albicans* dari biakan murni kedalam 10 tabung reaksi yang berisi media SDA (*Sabouroud Dextrose Agar*)
2. Setelah itu, Meinkubasi pada suhu 37⁰C selama 2-3 x 24 jam (Sari *et al.*, 2017)

3.6.7 Pembuatan Suspensi jamur *Candida albicans*

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk pembuatan suspensi adalah sebagai berikut :

1. Mengambil dengan satu ose biakan jamur *Candida albicans* dari kultur persediaan yang diinokulasikan pada media agar miring.
2. Mencampurkan kedalam tabung reaksi yang berisi cairan NaCl 0,9% sebanyak 10 mL.
3. Suspensi jamur dihomogenkan dengan dikocok selama kurang lebih 15 detik dengan cairan berubah menjadi keruh

4. Setelah itu, dituangkan ke dalam cuvet sebanyak 7 mL. Cuvet dimasukkan ke dalam spektrofotometri untuk diukur kekeruhannya dengan panjang gelombang 580 nm setara dengan standar *Mc Farland* 0,5 (1×10^6 CFU/mL)

3.6.8 Pembuatan Kontrol

3.6.8.1 Kontrol Media

1. Memasukkan media SDA sebanyak 15 mL ke dalam cawan petri steril
2. Megoyang-goyangkan sesuai dengan angka 8 sampai merata dan ditunggu hingga memadat. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. (Rosidah *et al.*, 2014)

3.6.8.2 Kontrol Fungi

1. Memasukkan suspensi fungi *Candida albicans* ke dalam cawan petri sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet.
2. Masukkan media SDA sebanyak 15 mL lalu digoyang-goyangkan sesuai angka 8 dan biarkan memadat dan dibungkus dengan kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rosidah *et al.*, 2014)

3.6.9 Pengujian Antimikroba

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Memasukkan suspensi mikroba kedalam cawan petri.
3. Menambahkan media SDA sebanyak 15 mL, digoyang-goyangkan sesuai angka delapan dan biarkan memadat. Selanjutnya dibuat sumuran pada cawan petri dengan menggunakan bor (pelubang) steril.
4. Setelah itu cawan petri yang telah dibuat lubang sumuran diisi 250 μ L ekstrak etanol 70% kulit jeruk nipis dengan masing-masing konsentrasi 50%, 35%, 25%, 15%, dilakukan didalam LAF (*Laminar Air Flow*).

5. Membungkus cawan petri dengan kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Dihitung zona bening atau zona hambat dengan menggunakan jangka sorong (Rohadi, 2015).
6. Melakukan replikasi sebanyak 3 kali pada tiap konsentrasinya.

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 aktivitas antifungi ekstrak kulit jeruk nipis dengan varian konsentrasi yaitu 15%, 25%, 35% dan 50%. Kemudian dilanjutkan dengan post Hoc LSD untuk mengetahui perbedaan secara signifikan aktivitas antifungi dari varian konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis