

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*) yang diperoleh dari perkebunan di Tobelo, Halmahera Utara, Maluku Utara.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Kulit buah tanaman jeruk kalamansi yang berwarna hijau dengan tekstur mengkilap dan masih segar diambil secara acak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit jeruk kalamansi.

Variabel kedua penelitian ini adalah aktivitas antibakteri bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasi dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung sedang pengertian variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan pengaruh selain variabel bebas.

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi dari ekstrak kulit buah jeruk kalamansi.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah jeruk kalamansi, bakteri uji, pelarut (metanol), sterilisasi, suhu, kondisi peneliti, kondisi laboratorium, media dan metode penelitian.

Variabel terikat dari penelitian ini adalah aktivitas antibakteri kulit buah jeruk kalamansi dengan dilihat pertumbuhannya pada media uji.

3. Defenisi operasional variabel utama

Pertama, tanaman yang digunakan adalah jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*) pada bagian kulit buah. Jeruk kalamansi diambil dari perkebunan di Tobelo, Halmahera Utara, Maluku Utara.

Kedua, ekstrak kulit buah jeruk kalamansi menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol.

Ketiga, ekstrak kulit buah jeruk kalamansi dibuat menjadi fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air.

Keempat, ekstrak dan fraksi kulit buah jeruk kalamansi pada konsentrasi 100%, 80%, 60%.

Kelima, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dari laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Kontrol positif adalah antibiotik siprofloksasin. Kontrol negatif adalah DMSO 1%.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, penangas air, blender, ayakan mesh 40, kaca arloji, timbangan analitik, botol maserasi, batang pengaduk, cawan petri, *rotary evaporator*, *water bath*, oven, corong pisah, jarum ose, pinset, kapas steril, inkubator, autoklaf, mikropipet, mistar berskala dan alat fotografi.

2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini ekstrak kulit buah jeruk kalamansi yang diambil dari perkebunan di Tobelo, Halmahera Utara, Maluku

Utara. Bahan lain yang digunakan dalam uji antibakteri adalah pelarut metanol, n-heksan, etil asetat, aquadest, DMSO 1%, bakteri uji bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC dan *Escherichia coli* ATCC 25922, aquades steril, cakram siprofloksasin, kertas cakram, media MHA, media BHI, media BSA, BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*), Mc Farland 0,5, LDH, HCl pekat, serbuk magnesium, FeCl 1%, kertas saring, kertas label dan aluminium foil. Bahan untuk identifikasi bakteri digunakan media *Endo Agar* untuk *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vogel Johnson Agar* untuk *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pewarnaan Gram (kristal violet, lugs, iodine, etanol, safranin), media SIM, media LIA, media KIA.

D. Jalannya Penelitian

1. Persiapan Bahan

Jeruk kalamansi dari perkebunan di Tobelo, Halmahera Utara, Maluku Utara, kemudian dideterminasi di Universitas Setia Budi Surakarta. Kulit buah yang di ambil berasal dari buah yang masih segar.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi terhadap jeruk kalamansi ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi Surakarta. Determinasi dilakukan dengan tujuan untuk mengidentifikasi bahwa tanaman yang digunakan benar-benar tanaman jeruk kalamansi atau *Citrus microcarpa*.

3. Pengambilan bahan

Jeruk kalamansi diambil dari perkebunan di daerah Tobelo, Halmahera Utara dengan ciri-ciri buah yang masih segar dengan kulit buah yang mengkilap dikumpulkan dan dibersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel (sortasi basah), dicuci dengan air mengalir sampai bersih, kemudian dikupas dan diambil bagian kulit dari buah lalu dicuci kembali dan tiriskan untuk membebaskan kulit buah dari sisa-sisa air cucian.

4. Pembuatan serbuk kulit jeruk kalamansi

Kulit buah jeruk kalamansi yang telah bersihkan bebas dari sisa air cucian kemudian dikeringkan dalam oven dengan suhu 50-60 °C. Kulit buah jeruk kalamansi yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan mesin pembuat

serbuk, setelah menjadi serbuk kulit buah jeruk kalamansi di ayak menggunakan ayakan no.40 lalu disimpan dalam wadah bersih dan ditutup rapat.

5. Penetapan kadar lembab

Penetapan kadar lembab dilakukan dengan menggunakan *alat moisture balance*. Alat dinyalakan dengan menekan tombol on/off terlebih dahulu, kemudian piringan disimpan dibagian tengah dan penahan *punch* di atasnya. Setelah itu diatur akurasi maupun temperatur sesuai dengan jumlah simplisia yang diuji. Setelah semua sesuai *punch* disimpan diatas penyangga, kemudian ditara.

Ditimbang serbuk kulit buah jeruk kalamansi sebanyak 2 gram, kemudian serbuk kulit buah jeruk kalamansi disimpan diatas *punch* dengan jumlah yang telah disesuaikan dengan akurasi yang diinginkan. Serbuk diratakan sampai menutupi permukaan *punch*, lalu ditutup. Setelah proses selesai, maka persen kadar air dari serbuk akan tertera secara otomatis.

6. Pembuatan ekstrak kulit buah jeruk kalamansi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, sebanyak 340 gram serbuk kulit buah jeruk kalamansi dimasukan kedalam botol maserasi dengan pelarut metanol sebanyak 2550 ml, setelah itu direndam selama 5 hari dan diaduk 3 kali sehari. Hasil maserasi kemudian disaring menggunakan kain flanel steril dan semua maserat dikumpul dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50-60⁰C hingga diperoleh ekstrak kental.

7. Pembuatan fraksi kulit buah jeruk kalamansi

Kulit buah jeruk kalamansi dibuat menjadi fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air. Ekstrak kental kulit jeruk kalamansi hasil maserasi ditimbang 10 gram dilarutkan dengan aquadest 75 ml dicorong pisah dengan ditambahkan n-heksan 75 ml, dipartisi sebanyak 3 kali. Hasil fraksinasi yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan disebut sebagai fraksi n-heksan.

Residu dari fraksi n-heksan dipisahkan di corong pisah dengan ditambahkan etil asetat, dipartisi sebanyak 3 kali. Hasil fraksinasi yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* setelah itu ditimbang. Hasil ini kemudian disebut dengan fraksi etil asetat.

Residu dari fraksi etil asetat dipekatkan hingga mengental kemudian ditimbang, hasil merupakan fraksi air. Proses fraksinasi dapat dilihat pada gambar 2.

8. Uji fitokimia ekstrak kulit jeruk kalamansi

Uji fitokimia dilakukan secara kualitatif pada ekstrak kulit buah jeruk kalamansi untuk mengetahui adanya kandungan alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin dalam ekstrak yang berperan sebagai antibakteri.

8.1 Uji alkaloid. Sebanyak 500 mg ekstrak kulit buah jeruk kalamansi ditambah dengan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL akuades, lalu dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit setelah itu didinginkan dan disaring, kemudian dibagi dalam dua tabung reaksi. Pada tabung pertama dimasukkan pereaksi Mayer dan hasil dinyatakan positif bila terbentuk endapan putih. Pada tabung kedua dimasukkan pereaksi Bouchardat. Hasil dinyatakan positif bila terbentuk endapan coklat sampai hitam.

8.2 Uji flavonoid. Sejumlah 500 mg ekstrak kulit buah jeruk kalamansi ditambah dengan 100 mL air panas, kemudian dididihkan selama 5 menit lalu disaring sehingga diperoleh filtrat yang digunakan sebagai larutan percobaan. Sebanyak 5 mL larutan percobaan ditambahkan serbuk magnesium dan 1 mL HCl pekat. Selanjutnya ditambahkan dengan amil alkohol lalu dikocok dengan kuat dan dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah, kuning atau jingga dalam larutan amil alkohol menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid (Depkes, 1995).

8.3 Uji saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak kulit jeruk kalamansi dimasukan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah air panas 10 ml dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Kemudian diamkan 10 menit. Tambahkan 1 tetes HCl 2N dan amati jika terjadi reaksi positif yang ditunjukan dengan buih yang terbentuk setinggi 1-10 cm dan tidak hilang (Robinson, 1995).

8.4 Uji tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan memasukkan ekstrak kulit jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*) ke dalam tabung reaksi lalu ditambah aquadest panas sama banyak dan didinginkan lalu ditambahkan 5 ml FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu (Robinson 1995).

9. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri dalam biakan murni diambil masing-masing satu ose kemudian dimasukkan ke tabung yang berisi 10 mL media BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi yang didapat diencerkan dengan perbandingan 1:1000 dengan menggunakan NaCl fisiologis dengan pembanding menggunakan konsentrasi *Mc Farland* 0,5.

10. Identifikasi Bakteri

10.1 Media selektif. Bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasi secara merata dengan metode goresan menggunakan ose pada media Endo Agar (EA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, kemudian diamati koloni yang terbentuk. Bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinokulasi secara merata dengan metode goresan menggunakan ose pada media VJA lalu diinkubasi ±24 jam pada suhu 37°C media VJA (*Vogel Johnson Agar*), kemudian diamati koloni yang terbentuk.

10.2 Pewarnaan Gram. Identifikasi dilakukan dengan cara dibuat ulasan smear pada preparat setelah itu difiksasi 3-5 kali lalu ditetes kristal violet (gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, didiamkan selama kurang lebih 1 menit. Setelah 1 menit kemudian cuci preparat dengan air yang mengalir setelah itu preparat kembali ditetesi mordant (lugol, iodine/gram B) 1-2 tetes sebagai penguat warna dasar dan diamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dibilas kembali dengan air yang mengalir lalu dikeringkan dengan cara dianginkan. Setelah itu preparat dilunturkan dengan gram C (etanol/acetone) 1-2 tetes dan diamkan selama 30 detik lalu dibilas dengan air mengalir setelah itu ditetesi dengan gram D (safir) 1-2 tetes sebagai penutup dan diamkan selama kurang lebih 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Preparat dikering-anginkan diudara kemudian dilihat pada mikroskop 100x, bakteri Gram positif akan berwarna biru gelap atau ungu dan bakteri gram negatif akan berwarna merah muda.

10.3 Uji Biokimia.

a. Identifikasi Bakteri Gram Negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Uji SIM (*Sulfide Indol Motility*). Bakteri biakan ditanam pada media SIM dengan ditusuk kemudian diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Uji sulfida positif bila medium berwarna hitam, uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah pertumbuhan reagen erlich, uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri ada seluruh media.

Uji KIA (*Kliger Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi secara tusuk gores kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil yang diamati adanya warna kuning pada bagian media yang miring dan bagian dasar, perubahan adanya media pecah atau meningkat keatas menunjukkan adanya gas.

Uji LIA (*Lysin Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi dengan tusuk gores ada media LIA kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Diamati adanya perubahan warna merah coklat ungu atau kuning pada bagian lereng atau dasar media LIA. Perubahan warna hitam pada media LIA menunjukkan adanya sulfat.

Uji Citrat. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara diinokulasi goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Uji ini untuk mengidentifikasi apakah bakteri menggunakan citrat sebagai rantai karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru.

b. Identifikasi Bakteri Gram Positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)

Uji Koagulase. Koloni bakteri dipindahkan menggunakan ose steril kedalam tabung berisi BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*), diinkubasi pada suhu 37°C selama 20–24 jam. Ke dalam 0,1 ml biakan BHIB ditambahkan 0,3 ml plasma kelinci, diinkubasi pada suhu 37°C selama 4-6 jam. Bila terjadi penggumpalan menunjukkan hasil yang positif.

Uji Katalase. Koloni bakteri diambil satu ose secara aseptis dan diinokulasi pada *object glass*, kemudian 3% H₂O₂ diteteskan secukupnya pada *object glass* menggunakan pipet tetes. Diamati adanya gelembung untuk hasil positif dan tidak ada gelembung untuk hasil negatif.

10.4 Uji Aktivitas Antibakteri kulit buah jeruk kalamansi.

Uji Antibakteri. Ekstrak metanol hasil maserasi dari kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*) serta fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak metanol masing-masing dibuat larutan stok dengan berbagai konsentrasi yaitu 100, 80, dan 60%, dimana masing-masing bahan ditimbang dan diadd dengan DMSO 1% sampai volume 10 ml. Setelah dibuat larutan stok selanjutnya diuji secara mikrobiologi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Metode yang digunakan adalah metode difusi untuk menentukan luas zona diameter hambat terhadap bakteri uji dan metode dilusi untuk menentukan nilai KHM dan KBM.

Metode difusi dilakukan dengan cara menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat lalu ditekan-tekan pada pinggir tabung. Kemudian diinokulasi pada media MHA dengan metode ulas secara merata lalu media didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi kedalam media. Pada media tersebut diisi kertas cakram diameter 6 mm menggunakan pinset, kertas cakram sebelumnya telah diberi agen antimikroba yang berisi ekstrak metanol dan fraksi n-heksan, etil asetat dan air kulit jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*) dengan konsentrasi 100, 80, dan 60%. Siprofloksasin 25 µg sebagai kontrol positif dan DMSO 1% sebagai kontrol negatif.

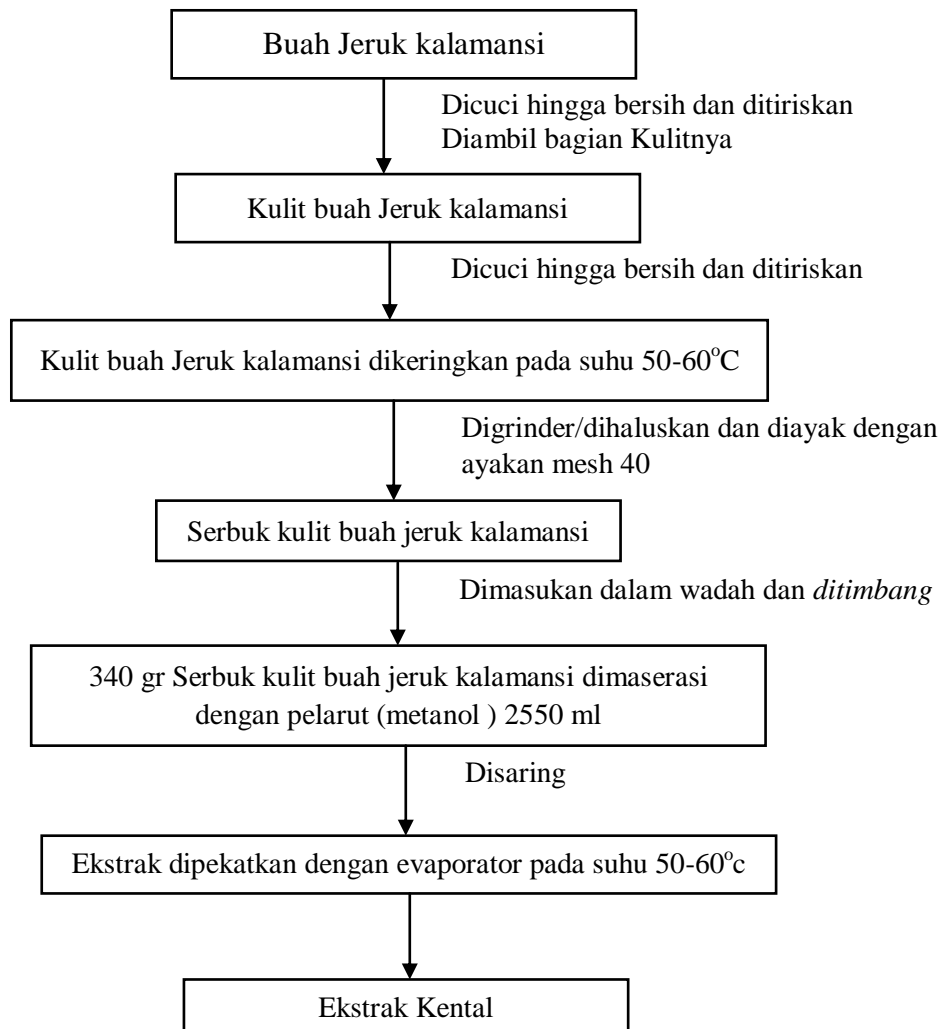
Media yang telah berisi kertas cakram diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasil lalu diukur diameter zona hambat sekitar kertas cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram menandakan bahwa ekstrak kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

Metode dilusi. Ekstrak dilakukan uji dilusi. Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 12 tabung steril. Masing-masing tabung tersebut terdiri dari beberapa konsentrasi. Secara aseptis dari larutan stok dibuat sederet konsentrasidibawahnya yaitu kontrol negatif (-) adalah larutan stok : 100 ; 50;

25;12,5 ; 6,25 ; 3,12 ; 1,56 ; 0,78 ; 0,39 ; dan 0,19%, kontrol positif adalah suspensi bakteri. Secara aseptis media BHI dimasukan 1 ml pada tiap tabung kecuali tabung 1. Kemudian dimasukan larutan stok dengan konsentrasi teraktif yang akan diuji pada tabung 1, kemudian 1 ml pada tabung 2 dan 3, kemudian tabung 3 dipipet 1 ml dan dimasukan ke tabung 4 seterusnya hingga tabung 11 kemudian di buang. Biakan bakteri dimasukan sebanyak 1 ml ke tabung 2 sampai 11 dan tabung 12 dimasukan 2 ml. Seluruh tabung uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, lalu diamati kekeruhannya. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan cara mengamati tabung yang tampak jernih, atau tabung yang memberi hasil negatif, kemudian menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media *Vogel Johnson Agar* untuk bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29523 dan *Endo Agar* untuk bakteri *Escherichia coli* ATCC 29522, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24-48 jam, kemudian mengamati ada tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng KBM ditunjukan oleh konsentrasi terendah pada media VJA dan EA yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

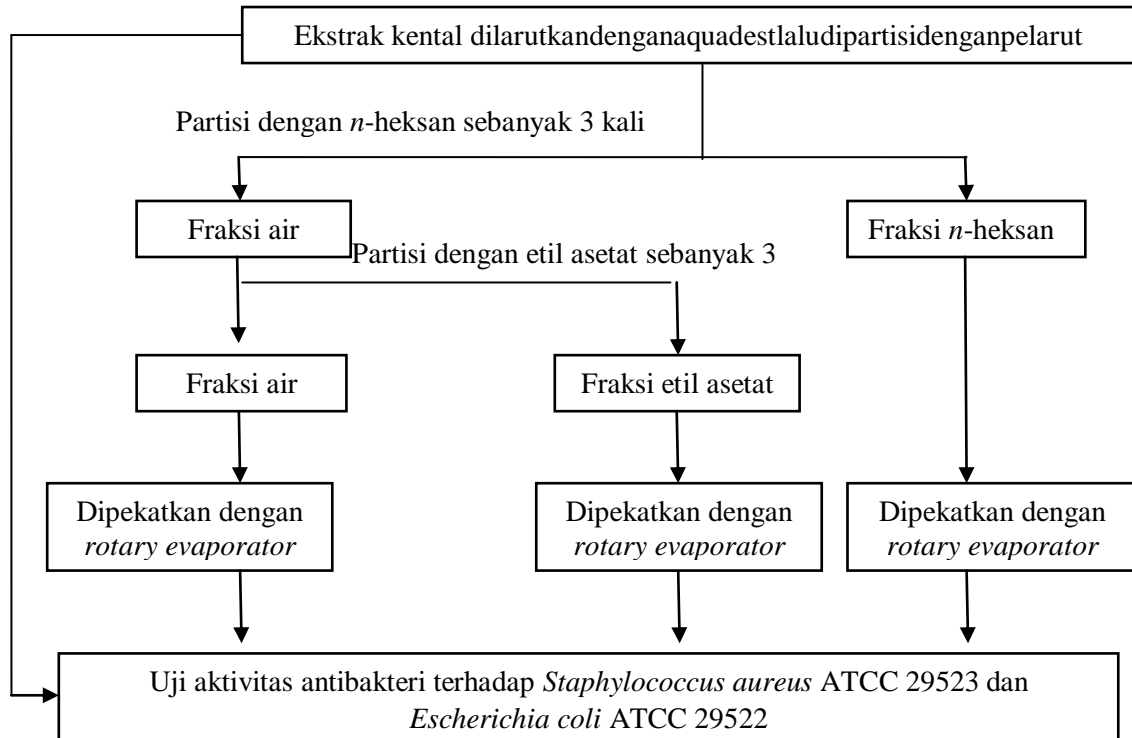
E. Alur Penelitian

1. Pembuatan ekstrak kulit jeruk kalamansi



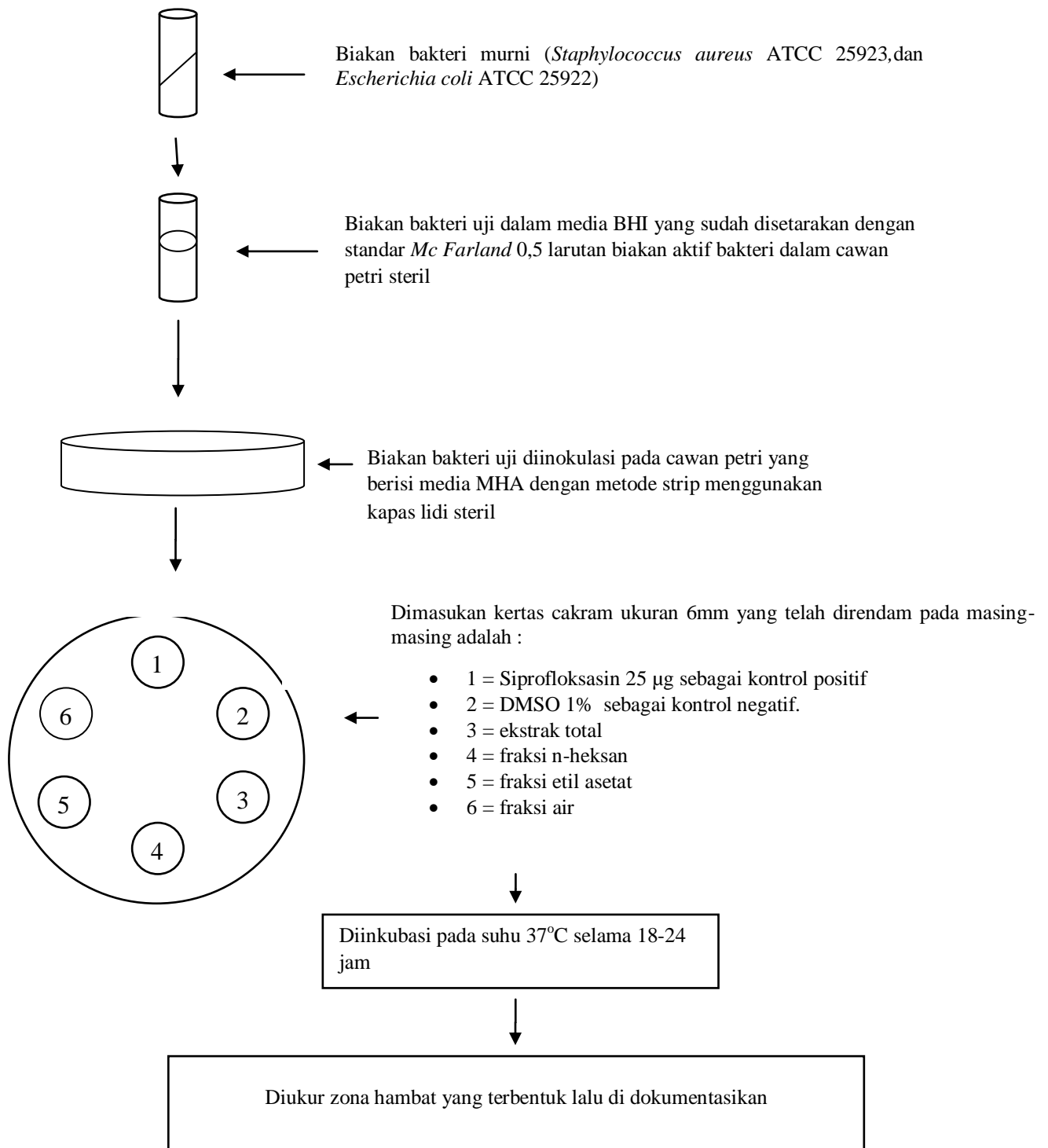
Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak kulit jeruk kalamansi

2. Pembuatan fraksi n-heksan, etil asetat dan air

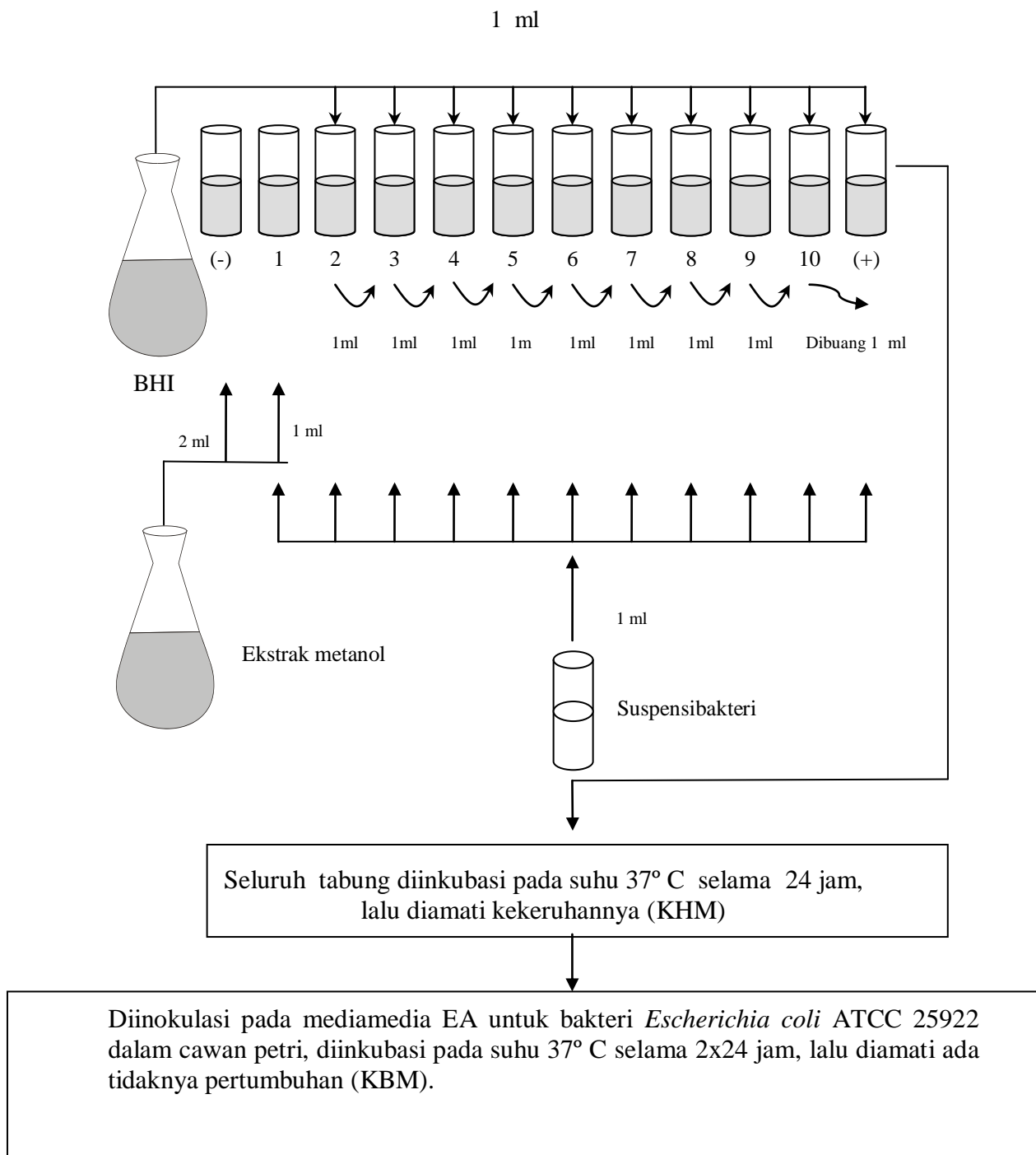


Gambar 2. Skema pembuatan fraksi kulit jeruk kalamansi

3. Uji aktivitas antibakteri



Gambar 3. Skema uji aktivitas antibakteri metode difusi



Gambar 4. Skema uji aktivitas antibakteri metode dilusi

4. Analisis Data

Pada penelitian ini menggunakan analisis statistik metode Two Way Anova. Analisis data untuk membandingkan aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air kulit jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.