

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Hasil identifikasi tanaman jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*)

1.1 Determinasi Tanaman. Tujuan determinasi tanaman adalah untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi tanaman jeruk kalamansi terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Hasil determinasi tanaman jeruk kalamansi berdasarkan Backer : Flora of Java : 1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-2b-24b-25-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32b-74a-75b-76a-77b-104b-106b-107b-186b-287b-288b-289b-298b-302a-303a. familia 133. Rutaceae. 1b-2a-3a.23.Citrus. 1b-4b-5a.*Citrus microcarpa* Bunge.

1.2 Deskripsi tanaman. Deskripsi tanaman jeruk kalamansi sebagai berikut : Habitus : perdu, sistem akar tunggang, percabangan monopodial, berkayu. Daun majemuk beranak daun satu, bentuk oval sampai lanset, ujung tumpul, panjang 4,2-7,8 cm, lebar 1,6-3,7 cm, tangkai daun 1-2,5 mm, seperti kulit dan permukaan licin. Bunga 1-3 di ujung atau di aksilar; daun kelopak 5, lk 1,5 mm, triangular, runcing; daun mahkota membulat, putih, benang sari 18-25. Bentuk buah bulat, memiliki kulit tebal, bila masak berwarna oranye kuning, sangat masam rasanya. Berdasarkan hasil determinasi dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*). Lampiran 1.

2. Pengumpulan bahan, pengeringan dan pembuatan serbuk kulit jeruk kalamansi

Buah jeruk kalamansi diambil secara acak dari daerah Tobelo, Halmahera Utara, Maluku Utara pada bulan September 2018. Buah jeruk kalamansi yang telah dikumpulkan kemudian diambil bagian kulitnya, dicuci dan dikeringkan. Pengeringan bahan dilakukan bertujuan untuk mengurangi kadar air serta mencegah tumbuhnya jamur dan mikroorganisme lain yang dapat

menyebabkan pembusukan dan mencegah perubahan kimia dari kandungan kulit jeruk kalamansi sehingga menyebabkan penurunan mutu. Hasil presentase dari bobot kering dan bobot basah dapat dilihat pada tabel 1.

Kulit jeruk kalamansi sebanyak 5000 gram bobot basah kemudian dikeringkan dan didapat bobot kering sebanyak 1200 gram, diperoleh randemen bobot kering terhadap bobot basah sebesar 24%. Perhitungan randemen bobot kering terhadap bobot basah dilihat pada lampiran 10.

Tabel 1. Presentase bobot kering terhadap bobot basah kulit jeruk kalamansi

| Bobot Basah (gr) | Bobot kering (gr) | Randemen (%) |
|-------------------------|--------------------------|---------------------|
| 5000 | 1200 | 24 |

3. Hasil pembuatan Ekstrak kulit jeruk kalamansi

Pembuatan ekstrak kulit jeruk kalamansi menggunakan metode maserasi. Maserasi adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara mengekstraksi bahan nabati yaitu direndam menggunakan pelarut bukan air (pelarut nonpolar) atau setengah air, misalnya etanol encer, selama periode waktu tertentu sesuai dengan aturan dalam buku resmi kefarmasian (Depkes RI, 1995). Keuntungan menggunakan metode maserasi dalam pembuatan ekstrak yakni, metode maserasi tidak menggunakan proses pemanasan sehingga mampu mencegah kerusakan senyawa dan komponen yang sifatnya tidak tahan panas seperti flavonoid tidak hilang atau tetap ada dalam ekstrak. Keuntungan lainnya juga yaitu cara pengerjaan yang mudah serta peralatan yang digunakan sederhana dan mudah didapat. Hasil dari pembuatan ekstrak kental kulit jeruk kalamansi dengan metode maserasi dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil pembuatan ekstrak kulit jeruk kalamansi

| Bobot serbuk (gr) | Bobot ekstrak (gr) | Randemen (%) |
|--------------------------|---------------------------|---------------------|
| 340 | 126,27 | 37,13 |

Hasil randemen ekstrak kulit jeruk kalamansi menggunakan metode maserasi adalah 37,13%. Semakin tinggi nilai randemen yang dihasilkan maka semakin tinggi nilai ekstrak yang dihasilkan tetapi juga semakin tinggi nilai randemen yang dihasilkan semakin rendah kualitas ekstrak yang dihasilkan. Perhitungan randemen dilihat pada lampiran 11.

4. Penetapan kadar lembab serbuk kulit jeruk kalamansi

Penetapan kadar lembab serbuk kulit jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*) menggunakan alat *Moisture balance*. Penetapan kadar lembab bertujuan untuk mengetahui prosentasi kadar air dalam kulit jeruk kalamansi. Kadar air suatu bahan mempengaruhi daya tahan dari bahan tersebut. Hasil penetapan kadar lembab kulit jeruk kalamansi dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil penetapan kadar lembab kulit jeruk kalamansi

| No | Bobot Bahan (gr) | Kadar Air (%) |
|------------------|------------------|---------------|
| 1 | 2,00 | 5,5 |
| 2 | 2,00 | 5,5 |
| 3 | 2,00 | 5,5 |
| Rata-rata | | 5,5 |

Kadar lembab dari kulit jeruk kalamansi didapat rata-rata sebesar 5,5%. Kadar lembab dikatakan memenuhi syarat apabila kadar lembab simplisia tidak lebih dari 10%. Kadar lembab simplisia yang kurang dari 10% memiliki ketahanan yang lebih lama atau awet dikarenakan sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif dan bakteri maupun jamur tidak tumbuh (Katno *et al.* 2008).

5. Fraksinasi ekstrak kulit jeruk kalamansi

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama kandungan dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawa yang dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa non polar akan terekstraksi dalam pelarut n-heksan, senyawa semi polar akan terekstraksi dalam pelarut etil asetat, dan senyawa polar akan terekstraksi dengan pelarut air. Bahan aktif yang sudah terekstraksi dalam masing-masing pelarut sesuai dengan kepolarannya akan mudah diperkirakan kandungan kimia yang dapat digunakan sebagai antibakteri (Mukhriani 2014; Tiwari *et al.* 2011)

5.1 Fraksi n-heksan. Randemen hasil fraksi n-heksan dapat dilihat dalam tabel 4.

Tabel 4. Hasil fraksi n-heksan

| No | Bobot Ekstrak (gr) | Bobot Fraksi (gr) | Randemen (%) |
|------------------|--------------------|-------------------|--------------|
| 1 | 10,41 | 1,43 | 13,74 |
| 2 | 10,14 | 1,39 | 13,71 |
| 3 | 10,28 | 1,44 | 14,01 |
| Rata-rata | | | 13,82 |

Berdasarkan tabel 4. Dapat dilihat bahwa perhitungan presentase rata-rata randemen fraksi n-heksan kulit jeruk kalamansi sebesar 13,82%. Hasil perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 13.

5.2 Fraksi etil asetat. Randemen hasil fraksi etil asetat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil fraksi etil asetat

| No | BobotEkstrak (gr) | BobotFraksi (gr) | Rendemen (%) |
|-----------|-------------------|------------------|--------------|
| 1 | 10,41 | 2,72 | 26,1 |
| 2 | 10,14 | 2,68 | 25,6 |
| 3 | 10,28 | 2,76 | 26,9 |
| Rata-rata | | | 26,2 |

Berdasarkan tabel 5. Hasil persentase rata-rata randemen fraksi etil asetat kulit jeruk kalamansi adalah 26,2%. Perhitungan hasil randemen dilihat pada lampiran 14.

5.3 Fraksi air. Residu yang didapat dari fraksi etil asetat adalah fraksi air kemudian dipekatkan menggunakan oven pada suhu dibawah 40°C. Randemen hasil fraksi air dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil fraksi air

| No | BobotEkstrak (gr) | BobotFraksi (gr) | Rendemen (%) |
|-----------|-------------------|------------------|--------------|
| 1 | 10,41 | 5,32 | 51,1 |
| 2 | 10,14 | 5,10 | 50,3 |
| 3 | 10,28 | 5,28 | 51,2 |
| Rata-rata | | | 50,9 |

Berdasarkan tabel 6. Dilihat bahwa presentase randemen fraksi air kulit jeruk kalamansi didapat sebesar 50,9%. Perhitungan randemen fraksi air dilihat pada lampiran 15. Hasil fraksi air didapat lebih banyak dibandingkan fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat karena sebagian besar senyawa dalam kulit jeruk kalamansi bersifat polar seperti flavonoid dan alkaloid. Randemen setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari tiap pelarut berbeda untuk menyari senyawa yang terkandung didalam ekstrak kulit jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*). Hasil ranremen tiap tiap pelarut juga tidak ada yang mendekati 100%, hal ini kemungkinan disebabkan ekstrak yang dihasilkan menempel pada wadah dan corong pisah dan kurangnya kekentalan ekstrak untuk proses fraksinasi.

6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak jeruk kalamansi

Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi jeruk kalamansi dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak kulit jeruk kalamansi

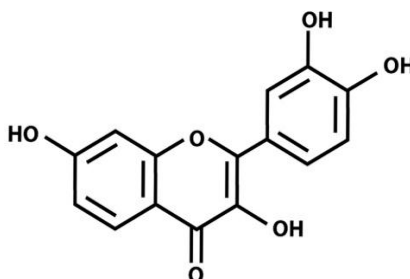
| Kandungan kimia | Hasil penelitian | Pustaka | Interpretasi hasil |
|-----------------|--|---|--------------------|
| Flavonoid | Warna jingga pada lapisan amil alkohol | Warna jingga pada lapisan amil alcohol (Depkes, 1955) | + |
| Tanin | Warna hijau violet | Terbentuk warna hijau violet (Depkes,1955) | + |
| Saponin | Buih tinggi 1-10 cm | Buih tinggi 1-10 cm (Robinson, 1955) | + |
| Alkaloid | Endapan warna coklat | Terbentuk kekeruhan atau endapan warna coklat (Depkes,1955) | + |

Berdasarkan hasil skrining fitokimia senyawa metabolit sekunder menunjukkan bahwa ekstrak kulit jeruk kalamansi positif mengandung tanin, alkaloid dan flavonoid, saponin. Kandungan kimia yang terdapat pada ekstrak dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan saat ekstraksi. Efektivitas suatu senyawa oleh pelarut sangat tergantung kepada kelarutan senyawa tersebut dalam pelarut (Anggitha, 2012). Pelarut yang digunakan merupakan pelarut metanol yang bersifat universal. Tabel 8.

Tabel 8. Hasil identifikasi kandungan kimia masing masing fraksi kulit jeruk kalamansi

| Kandungan kimia | Hasil | | | Pustaka | Interpretasi hasil | | |
|-----------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---|-------------------------|--------------------|------------|
| | Fraksi <i>n</i> -heksan | Fraksi etil asetat | Fraksi air | | Fraksi <i>n</i> -heksan | Fraksi etil asetat | Fraksi air |
| Flavonoid | Lapisan amil berwarna jingga | Lapisan amil berwarna jingga | Warna jingga pada lapisan amil | Warna jingga pada lapisan amil alcohol (Depkes, 1955) | + | + | + |
| Alkaloid | Terjadi kekeruhan | Endapan coklat | Terjadi kekeruhan | Terjadi kekeruhan atau endapan coklat (Depkes, 1955) | + | + | + |
| Saponin | Terbentuk 2 lapisan tanpa buih | Hijau kecoklatan tanpa buih | Buih tinggi 1-10 cm | Buih tinggi 1-10 cm (Depkes,1955) | - | - | + |
| Tanin | Warna hijau violet | Warna hijau violet | Warna hijau violet | Warna hijau violet (Depkes, 1955) | + | + | + |

Berdasarkan hasil identifikasi (tabel.8) didapatkan hasil dari masing masing fraksi dimana fraksi n heksan positif mengandung flavonoid, tanin, dan alkaloid, fraksi etil asetat positif mengandung flavonoid, tanin, alkaloid, dan fraksi air positif mengandung flavonoid, tanin, alkaloid, saponin. Pada identifikasi saponin didapat hasil negatif pada fraksi n heksan dan fraksi etil asetat, hal ini terjadi karena kelarutan saponin yaitu larut dalam air dan etanol, tetapi tidak larut dalam eter (Robinson 1995). Tingkat kepolaran senyawa dalam pelarut bergantung pada jenis dan golongan senyawa tersebut, misalkan senyawa alkaloid bersifat polar dan non polar sesuai golongannya seperti alkaloid bebas (pseudoalkaloid) yang bersifat nonpolar juga senyawa flavonoid yang bersifat nonpolar seperti isoflavon dan flavonon). Flavonoid adalah senyawa yang terdiri dari 15 atom karbon yang umumnya tersebar di dunia tumbuhan. Dimana dua cincin benzena (C6) terikat oleh rantapropena (C3).



Gambar 5. Struktur flavonoid

Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau sehingga dapat ditemukan pada setiap ekstrak tumbuhan (Markham, 1988). Pada identifikasi senyawa flavonoid, setelah ekstrak ditambahkan dengan logam magnesium, asam klorida (HCl) memberikan warna merah. Kemungkinan golongan flavonoid adalah flavanon, flavanonol, dan flavanol.

Berbeda dengan flavonoid, tanin adalah salah satu golongan senyawa polifeneol yang juga banyak dijumpai pada tumbuhan. Tanin didefinisikan sebagai senyawa polifenol dengan berat molekul yang sangat besar yaitu lebih dari 1000 g/mol serta dapat membentuk senyawa kompleks dengan protein. Tanin memiliki peranan biologis yang besar karena fungsinya sebagai pengendap protein dan penghelat logam. Oleh karena itu tanin dapat berperan sebagai antioksidan biologis. Pengujian tanin dilakukan dengan penambahan FeCl_3 10%

akan menghasilkan warna biru tua, biru kehitaman atau biru kehijauan. Perubahan warna tidak terjadi dengan penambahan FeCl_3 10% karena tidak adanya gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin (Sangi *et al.* 2013; Artini *et al.* 2013).

7. Identifikasi bakteri uji

7.1 Media selektif. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29523 menggunakan media selektif VJA (*Vogel Johnson Agar*). Diinokulasi pada media selektif VJA dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C . Hasil dari inokulasi didapat koloni yang kecil dan halus berwarna gelap karena bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29523 mereduksi telurit menjadi metalik, warna medium disekitar koloni juga berwarna kuning karena fermentasi manitol. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 29522 menggunakan media selektif Endo Agar diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C . Hasil dari inokulasi didapat koloni berwarna merah muda dan hijau metalik karena memfermentasi laktosa (Lampiran 6). Penggunaan media selektif dikarenakan media selektif adalah media yang mampu menumbuhkan bakteri tertentu (bakteri target atau bakteri yang kita inginkan) dan menghambat pertumbuhan bakteri lain.

7.2 Pewarnaan Gram. Pewarnaan *Staphylococcus aureus* ATCC 29523 menunjukkan hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti anggur dalam jumlah banyak. Hasil dilihat pada lampiran 7 gambar 21. Pewarnaan *Escherichia coli* ATCC 29522 menunjukkan hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah, berbentuk basil/batang (lampiran 7 gambar 20). Pewarnaan Gram dilakukan bertujuan untuk membedakan spesies bakteri menjadi dua kelompok besar, yaitu Gram positif dan Gram negatif, berdasarkan sifat kimia dan fisik dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif mempertahankan zat warna kristal warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan karena dinding bakteri Gram positif mengandung protein dan lapisan peptidoglikan lebih tebal. Pemberian alkohol pada pewarnaan bakteri menyebabkan terekstraksi lipid sehingga memperbesar permeabilitas dinding sel. Pewarnaan safranin masuk ke dalam sel sehingga sel menjadi berwarna merah pada bakteri Gram negatif sedangkan pada bakteri Gram positif dinding selnya terhidrasi dengan perlakuan alkohol menyebabkan pori-pori mengerut, daya

rembes dinding sel dan membran menurun sehingga pewarna safranin tidak dapat masuk untuk mempengaruhi pewarnaan kristal violet.

7.3 Uji biokimia.

Identifikasi bakteri Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922) secara biokimia dilakukan dengan uji KIA,LIA, SIM dan Citrat. Uji dilakukan untuk mengetahui karakteristik dari bakteri, terutama bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Untuk uji citrat, media yang digunakan adalah Simon citrat berisi indikator BTB (Brom tymol blue). Hasil yang diperoleh yaitu media citrat tetap berwarna hijau (-) yang menandakan bahan sumber citrat bukan merupakan sumber karbon hal ini dikarenakan bakteri tidak mempunyai enzim sitrat permease yaitu enzim spesifik yang membawa sitrat ke dalam sel (Ratna,2012). Untuk uji SIM (Sulfida Indol Motil), untuk sulfida hasilnya negatif tidak terbentuk endapan hitam artinya bakteri tidak menguraikan asam amino yang menguraikan sulfur dan untuk indol hasilnya positif dengan terbentuknya cincin merah karena bereaksi dengan kovak (DAB) dimana bakteri menghasilkan Triptonase lalu triptonase bereaksi menghasilkan Indol dan Asam Piruvat. Untuk motilitas hasilnya positif terlihat dengan adanya penyebaran yang berwarna putih seperti akar disekitar inokulasi. Hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagel (Burrows, 2004).

Untuk uji LIA dilihat hasil Media mengalami perubahan warna dimana lereng menjadi ungu, dasar ungu, tidak menghasilkan sulfida dan gas. Hal ini disebabkan karena kemampuan mikroorganisme dalam mendekarboli lisin membentuk amin kadaverin yang bersifat basa sehingga warna perbenihan yang mengandung indikator bromkresol ungu tetap berwarna ungu (reaksi positif). Untuk Uji KIA, Media KIA berisi 2 macam karbohidrat yaitu glukosa dan laktosa. Hasil yang diperoleh, pada dasar (butt) media berwarna kuning (bersifat asam) dan lereng (slant) berwarna kuning (bersifat asam) artinya bakteri memfermentasi semua karbohidrat.

a. Identifikasi bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

Tabel 9. Hasil identifikasi bakteri dengan uji katalase dan uji koagulase.

| Jenis uji | Prosedur | Hasil | Pustaka |
|---------------|--|--|--|
| Uji katalase | 1 ose bakteri alam objek glass+ tetes H ₂ O ₂ 3% | Terbentuk gelembung gas | Terbentuk gelembung gas (Jawetz <i>et al.</i> 2007) |
| Uji koagulase | Plasma kelinci 2 ml +1 ose biakan bakteri dan diinkubasi 1-4 jam suhu 37°C | Hasil reaksi positif terjadi penjendalan | Hasil reaksi positif terjadi penjendalan (Jawetz <i>et al.</i> 2007) |

Identifikasi bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) secara biokimia dilakukan dengan dua cara yaitu uji katalase dan uji koagulase. Pada uji katalase, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan hasil yang positif ditandai dengan adanya gelembung udara (lampiran 8) karena bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mempunyai enzim katalase sehingga pada penambahan H₂O₂ 3% terurai menjadi H₂O (air) dan O₂ (oksigen).

Pada uji koagulase menunjukkan hasil yang positif ditandai dengan adanya gumpalan putih membentuk aglutinasi (lampiran 8). Hasil identifikasi bakteri membuktikan bahwa bakteri yang digunakan pada penelitian ini merupakan positif bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

8. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29523 dan *Escherichia coli* ATCC 29522 dalam biakan murni diambil masing-masing satu ose kemudian dimasukan 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. Pengenceran suspensi bakteri yang diperlukan kemudian disetarakan kekeruhan dengan standar *Mc Farland* 0,5 yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Tujuan pembuatan suspensi bakteri untuk standarisasi atau pengendalian jumlah sel bakteri agar bakteri tidak terlalu padat.

9. Uji aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi n-Heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari kulit jeruk kalamansi secara difusi.

Uji 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, pengujian menggunakan metode difusi dengan konsentrasi yang dibuat yaitu

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 menunjukkan adanya daya hambat. Daya hambat dibuktikan dengan tidak tumbuhnya bakteri pada sekitar cakram. Pada tabel 10 dapat dilihat bahwa yang memiliki daya hambat paling efektif adalah ekstrak 100% dari kulit jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dibandingkan dengan semua fraksi dan konsentrasi dan terhadap *Staphylococcus aureus* dikarenakan diameter rata-rata daerah daya hambat lebih besar dihasilkan yaitu 31 mm . Perbedaan daerah hambat yang terjadi dikarenakan senyawa yang terkandung dalam ekstrak maupun fraksi yang memiliki kemampuan aktivitas antibakteri yang berbeda-beda tergantung tingkat kepolarannya. Pada ekstrak 100% menggunakan pelarut methanol yang dapat mengikat berbagai senyawa polar dimana senyawa flavonoid sebagai senyawa antibakteri paling baik terikat dalam pelarut methanol. Daya hambat suatu antimikroba dalam uji sensitifitas secara in vitro dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: populasi bakteri, konsentrasi antimikroba, komposisi media kultur, waktu inkubasi dan temperatur (Greenwood et al, 2007). Faktor-faktor tersebut secara keseluruhan dapat dikontrol saat prosedur pengujian berlangsung.

Konsentrasi mikroba dapat dikontrol dengan pemakaian inokulum standar dari suspensi bakteri yang secara kualitatif sama dengan kekeruhan warna larutan standar *Mac Farland* yaitu putih keruh, sedangkan konsentrasi antimikroba sengaja dibuat berbeda untuk melihat pengaruh konsentrasi antimikroba terhadap bakteri uji (Febrika, 2012). Pada penelitian yang telah dilakukan membuktikan bahwa kulit jeruk kalamansi memiliki sifat antibakteri pada bakteri Gram negatif *Escherichia coli* ATCC 25922 yang ditandai dengan ditemukannya zona bening pada agar yang telah diisolasi bakteri pada konsentrasi 100%. Ekstrak 100% lebih besar daya hambatnya dari pada fraksi dikarenakan memiliki semua senyawa yang dibutuhkan sebagai antibakteri seperti tanin, flavonoid, alkaloid, saponin, dan yang paling penting adalah favonoid.

Tanin bekerja dengan mengadakan kompleks hidrofobik dengan protein, menginaktivasi adhesin, enzim, dan protein transport dinding sel, sehingga

mengganggu pertumbuhan mikroorganisme (Hashem & El-Kiey, 2002). Tanin diduga sebagai senyawa antimikroba dikarenakan berefek spasmolitik. Efek spasmolitik dapat mengkerutkan dinding sel bakteri sehingga sel bakteri terganggu permeabilitasnya (Ajizah, 2004). Masduki (1996) menyatakan bahwa tanin juga mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasikan protein, karena diduga tanin mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolat.

Secara umum efek antibakteri tanin antara lain reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik bakteri. Menurut Okuda (2004) tanin berpotensi menjadi antibakteri, tanin mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Dalimunthe, 2009). Senyawa alkaloid yang terkandung diperkirakan mempengaruhi hambatan terhadap pertumbuhan bakteri. Alkaloid dapat mengganggu bakteri dengan cara mengganggu terbentuknya jembatan silang komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Pleczar dan Reid, 1972). Senyawa saponin dapat bekerja sebagai antimikroba. Senyawa saponin akan merusak membran sitoplasma dan membunuh sel (Assani, 1994). Senyawa flavonoid diduga mekanisme kerjanya mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi (Pelczar dkk., 2007).

Perbedaan dari hasil-hasil penelitian mungkin disebabkan karena perbedaan dinding sel bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel yang lebih sederhana dibandingkan Gram negatif memiliki dinding sel bakteri yang sangat kompleks. Dinding sel bakteri Gram positif yakni hanya terdiri dari peptidoglikan dan asam teikhoat, sedangkan bakteri Gram negatif terdiri dari peptidoglikan dan membran luar yang mengandung 3 komponen penting diluar peptidoglikan, yakni lipoprotein, lipolisakarida dan membran periplasma. Namun pada bakteri gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan dengan bakteri gram negatif (Brooks, 2008).

10. Uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*) secara dilusi terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Uji difusi ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air didapatkan hasil bahwa ekstrak kulit jeruk kalamansi lebih besar daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Pengujian dilanjutkan dengan metode dilusi untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dengan 3 kali replikasi. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%. Kontrol positif menggunakan suspensi bakteri dan kontrol negatif menggunakan bagian teraktif yaitu ekstrak metanol. Hasil pengujian secara difusi dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Hasil Konsentrasi Hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

| No | Konsentrasi | Replikasi | | |
|----|------------------------------------|-----------|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 100% | - | - | - |
| 2 | 50% | - | - | - |
| 3 | 25% | - | - | - |
| 4 | 12,5% | - | - | - |
| 5 | 6,25% | - | - | - |
| 6 | 3,12% | + | + | + |
| 7 | 1,56% | + | + | + |
| 8 | 0,78% | + | + | + |
| 9 | 0,39% | + | + | + |
| 10 | 0,19% | + | + | + |
| 11 | K(+) Suspensi bakteri | + | + | + |
| 12 | K(-) Ekstrak kulit jeruk kalamansi | - | - | - |

Berdasarkan tabel 11 dapat dilihat bahwa pengujian dilakukan replikasi 3 kali. Konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 ; 3,12 ; 1,56 ; 0,78 ; 0,39 ; dan 0,19%. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi hambat minimum (KHM) dilihat pada tabung tidak dapat diamati karena ekstrak terlalu pekat sehingga menghambat pengamatan dimana dilihat kekeruhannya. Maka dari itu nilai KHM yang diambil pada dengan konsentrasi terkecil tidak mengalami kekeruhan adalah 6,25% (lihat lampiran 11. Gambar 25). Pada konsentrasi terkecil yaitu 6,25% ekstrak sudah berpotensi sebagai antibakteri untuk menghambat pertumbuhan bakteri dikarenakan jumlah komponen senyawa yang terkandung didalam ekstrak dengan konsentrasi 100%, penggunaan konsentrasi ekstrak yang besar mempengaruhi besar konsentrasi KHM terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Setelah itu menentukan konsentrasi bunuh

minimum dengan diinokulasi ke media NA pada cawan petri dan dilihat bagian yang tidak ditumbuhi bakteri menunjukkan KBM terdapat pada konsentrasi 6,25%.

11. Hasil Analilis Data

Perhitungan statistik yang digunakan adalah anova *two way*, digunakan anova *two way* untuk membandingkan kontrol positif, ekstrak, fraksi n-heksan, etil asetat dan air dari kulit jeruk kalamansi pada setiap konsentrasi dan pada setiap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Dari tabel descriptif statistik untuk mengetahui deskripsi hasil dari diameter hambat untuk jenis bakteri pada setiap konsentrasi. Levene's test menunjukkan homogenitas data dimana diperoleh nilai 0,911 atau nilai sig > 0,05 (syarat homogenitas), artinya sampel sudah memenuhi syarat. Dilanjutkan pada Test of between-subjects effects dimana dari tabel terlihat bahwa nilai F 7,54 dan nilai signifikan yang diperoleh 0,00 artinya ada interaksi antara konsentrasi dan bakteri sehingga perlu dilkakukan uji lanjutan yaitu post hoc. Pada hasil uji dengan post hoc tukey dilihat adanya tanda * yang artinya mode tersebut berbeda secara signifikan. Perbedaan signifikan yaitu pada konsentrasi seluruh konsentrasi ekstrak maupun fraksi dimana ekstrak dengan konsentrasi 100% memiliki daya hambat tertinggi terhadap *Escherichia coli*. Dapat dilihat pada lampiran 16.