

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif *eksperimental* laboratorium dengan pendekatan *the post test only control group design* yaitu suatu metode yang melakukan pengamatan atau pengukuran setelah perlakuan dan hasilnya dibandingkan dengan kontrol. Penelitian menggunakan metode difusi sumuran guna mengetahui adanya aktivitas antibakteri pada berbagai konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) terhadap pertumbuhan *lactobacillus acidophilus* secara *in vitro*.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan maret 2024 – juli 2024

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi STIKES Panti Waluya Malang pada bulan Maret 2024 sampai Juni 2024

3.3 Sampel Penelitian

3.3.1 Sampel *Lactobacillus acidophilus*

Sampel penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur murni bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi STIKES Panti Waluya Malang kota malang. Kriteria inklusi yakni koloni murni dari *Lactobacillus acidophilus* yang tumbuh pada media nutrisi agar. Kriteria eksklusi yakni koloni *Lactobacillus acidophilus* yang tumbuh pada media nutrisi agar disertai dengan pertumbuhan jamur atau terdapat kontaminan lain.

3.3.2 Sampel Kulit Buah Jeruk Purut

Sampel kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) pada penelitian ini diambil dari Kabupaten Malang, Jawa Timur. Kriteria inklusi : kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) memiliki bentuk bulat telur, kulitnya hijau tua dengan ciri khas permukaan kulit yang berkerut, berbenjol-benjol tidak rata. Kriteria eksklusi : kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) berwarna kuning, kecoklatan, berlubang, terdapat hama dan atau bekas hama.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah

- | | |
|-----------------------------|-----------------------|
| a. <i>Oven</i> | l. Bunsen |
| b. <i>Autoclave</i> | m. Pipet |
| c. Blender | n. Mikropipet |
| d. Cawan petri | o. Rak tabung reaksi |
| e. Corong Kaca | p. Gelas piala |
| f. <i>Rotary evaporator</i> | q. <i>Incubator</i> |
| g. Erlenmeyer | r. Jangka sorong |
| h. Wadah maserasi | s. Ose bulat |
| i. Gelas ukur | t. Sduit 1 ml |
| j. Labu ukur | u. Tabung reaksi |
| k. <i>Colony Counter</i> | v. Timbangan analitik |

3.4.2 Bahan

- Kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.),
- Etanol 96%,
- Kultur murni bakteri *Lactobacillus acidophilus*,
- Nutrient Agar* (NA),
- Nutrient Broth* (NB),
- Mueller Hinton Agar (MHA),
- Serbuk klindamisin.
- Aquadest

3.5 Definisi Operasional Variabel

3.5.1 Definisi Operasional

1. Ekstrak adalah sediaan kental berasal dari simplisia nabati yang telah diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, yang kemudian dipekatkan dengan bantuan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan kecepatan 80 rpm dan dilakukan penguapan pada *waterbath* hingga diperoleh ekstrak yang kental.
2. Maserasi adalah sebuah metode pemisahan senyawa dengan cara merendaman sampel menggunakan pelarut organik etanol 96% pada suhu ruang dan wadah tertutup selama 3 X 24 jam.
3. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri golongan gram positif dan tidak membentuk spora. Bakteri ini berbentuk batang panjang serta bersifat anaerob fakultatif dan katalase negatif. *L. acidophilus* termasuk dalam golongan probiotik *Lactobacillus* dengan media selektif berupa MRSA.
4. Zona hambat adalah daerah bening yang terlihat disekitar cakram dimana hal ini menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus* karena pengaruh dari ekstrak kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix* DC). Zona hambat diukur dengan satuan mm dengan kontrol positif menggunakan klindamisin.
5. Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC) adalah bagian terluar dari buah, kulitnya buah berwarna hijau dengan ciri khas permukaan kulit yang berkerut, berbenjol tidak rata, rasanya asam agak pahit.

3.5.2 Variabel

1. Variabel Bebas

Penelitian ini menggunakan variabel bebas berupa konsentrasi ekstrak (30%, 40%, dan 50%) ekstrak etanol 96% dari kulit buah jeruk purut yang kemudian diujikan terhadap bakteri *Lactobacillus acidophilus*.

2. Variabel Terikat

Penelitian ini menggunakan variabel terikat berupa zona hambat yang dilakukan oleh ekstrak kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix DC*) hasil maserasi terhadap bakteri *Lactobacillus acidophilus*.

3. Variabel Terkontrol

Penelitian ini menggunakan variabel terkontrol berupa waktu maserasi, media pertumbuhan dan waktu inkubasi dari bakteri pada pengujian yang dilakukan

3.6 Metode Analisa Data dan Pengujian Hipotesa

3.6.1 Metode Analisa

1. Zona Hambat dan perbandingan

Pengukuran zona hambat bakteri dilakukan setelah Pengamatan yang dilakukan 1x24 jam masa inkubasi. Daerah pada sekitaran sumuran muncul kepekaan dan respon dari mikroba uji terhadap adanya antibiotik atau bahan antimikroba yang digunakan sebagai bahan uji. Daerah ini dinyatakan sebagai diameter zona hambat atau zona bening. Diameter zona hambat diukur dalam satuan millimeter (mm) menggunakan jangka sorong dengan cara mengukur jarak dari tepi sumur uji ke batas lingkaran zona hambat. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya anti bakterinya berdasarkan penggolongan davis and stout (1971).

Menurut (Abubakar *et al.*, 2019) Kekuatan daya hambat bakteri dikategorikan berdasarkan Davis dan Stout yaitu,

Tabel 3. 1 Klasifikasi daya hambat bakteri

Diameter zona bening	Kategori
>20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
<5 mm	Lemah

3.6.2 Prosedur Kerja

1. Pengambilan dan determinasi sampel

Pengambilan Sampel Kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.), diperoleh di Kabupaten Malang, Jawa Timur. Pengambilan sampel ini dilakukan pada pagi hari. Sampel diambil saat ukuran buah sedang dan kondisi buah bagus. Buah yang diambil adalah Buah yang sudah tua, tidak berwarna kuning dan tidak di tumbuhi jamur, kondisi kulit buah baik tidak berlubang. Determinasi sampel kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dilakukan di UPT Laboratorium Materia Medika Batu.

2. Pembuatan serbuk simplisia

Pengolahan sampel ekstrak etanol kulit buah jeruk purut, Kulit buah jeruk purut yang telah dipisahkan dengan daging buahnya, dicuci hingga bersih dan dikeringkan dengan cara diangin - anginkan tanpa sinar matahari langsung kemudian sampel dikeringkan di dalam lemari pengering dengan suhu 50°C selama 3 X 24 jam. Simplisia kering diserbukkan dengan blender, kemudian diayak dengan ayakan *mesh* 100 untuk memperoleh besaran partikel sampel yang sama sehingga memaksimalkan

proses ekstraksi senyawa aktif antibakteri pada sampel uji. Hasil dari proses pengayakan disimpan pada tempat yang sesuai dan siap di ekstraksi.

3. Ekstraksi kulit buah jeruk purut

Sampel kulit buah jeruk purut yang telah dihaluskan dan diayak ditimbang sebanyak 200 gram dimasukkan ke dalam wadah maserasi, Selanjutnya ditambah dengan 600 ml pelarut etanol 96% dengan rasio bahan dengan pelarut sebesar 1:3. Wadah maserasi ditutup dan disimpan selama 24 jam di tempat yang tanpa pemaparan sinar matahari sambil sesekali diaduk, selanjutnya sampel disaring, untuk memisahkan antara ampas dan filtrat. Ampas diekstraksi kembali dengan pelarut etanol. Hal ini dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan sehingga total pelarut etanol 96% yang digunakan adalah sebanyak 1800 ml. Filtrat yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak etanol kental dengan bantuan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan kecepatan 80 rpm kemudian dilanjutkan dengan proses penguapan pada *waterbath* untuk menguapkan sisa pelarut yang tersisa hingga didapatkan ekstrak kental kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix* DC).

4. Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi alat dilakukan dengan mencuci dan mengeringkan alat yang akan digunakan dalam penelitian. Alat dibungkus dengan kertas *samson* atau *aluminium foil*. Pastikan semua alat berada pada kondisi aman dan tidak ada keretakan. Selanjutnya alat dimasukan dimasukan *autoclave* dan atur pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15-20 menit.

5. Pembuatan media

a. Media *nutrient agar*

Sebanyak 14 gram NA dilarutkan dengan pemanasan dalam 500 mL aquadest (28 g/1000ml). lakukan pemanasan dan pengadukan pada *hot plate* dan menggunakan *magnetik stirer* hingga larutan menjadi bening, larutan disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Masukkan larutan kedalam tabung reaksi yang telah disterilkan sebanyak ± 5 ml, sumbat tabung reaksi menggunakan kapas steril dan letakan dengan posisi kemiringan $\pm 45^\circ$ C tunggu hingga memadat.

b. Pembuatan media *Nutrient broth*

Nutrient broth yang digunakan pada penelitian ini menggunakan campuran 0,4 gram *nutrient broth* serbuk dilarutkan dalam 50 ml aquadest (8 gram/L)

c. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar*

Media *Mueller Hinton Agar* dibuat dengan cara melarutkan 7,4 gram serbuk MHA dalam 200 ml aquadest (37 gram/1L). Proses dilakukan dengan pemanasan dan pengadukan pada *hot plate* hingga larutan menjadi bening, untuk kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit.

d. Peremajaan biakan bakteri

Peremajaan bakteri *Lactobacillus acidophillus* yang dilakukan menggunakan biakan murni, masing -masing diambil satu ose dengan menggunakan ose steril kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada agar miring *nutrient agar* dengan cara silang (*zig-zag*), selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam

6. Pembuatan larutan kontrol

Kontrol negatif menggunakan aquadest sedangkan kontrol positif berupa klindamisin. Penggunaan klindamisin sebagai kontrol positif pada pengujian terhadap *Lactobacillus acidophilus* sangat sedikit dilakukan oleh karena itu peneliti menggunakan konsentrasi 0,025% b/v untuk memberikan gambaran baru terkait zona hambat yang dihasilkan pada konsentrasi tersebut. Konsentrasi 0,025% b/v diperoleh dengan melarutkan 25 mg serbuk klindamisin kedalam labu ukur 100 ml kemudian di tambah aquadest hingga tanda batas homogenkan.

7. Pembuatan larutan sampel uji

Larutan uji dibagi menjadi 3 konsentrasi berbeda dengan menggunakan prinsip pengenceran. Pembuatan konsentrasi uji dimulai dari pembuatan konsentrasi 50% diperoleh dari pencampuran 10 gram ekstrak pekat kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) di larutkan dengan 20 mL aquadest. Untuk pembuatan sampel uji dengan konsentrasi 30% dan 40% dilakukan sebagai berikut yakni :

Tabel 3. 2 Pembuatan Sampel Uji

Konsentrasi	Cara pembuatan
30 %	Ambil 6 mL larutan konsentrasi 50% ditambahkan dengan aquadest ad 10 mL
40 %	Ambil 8 mL larutan konsentrasi 50% ditambahkan dengan aquadest ad 10 mL
50 %	10 gram ekstrak pekat kulit buah jeruk purut di masukkan kedalam 20 mL aquadest

8. Pengujian antibakteri

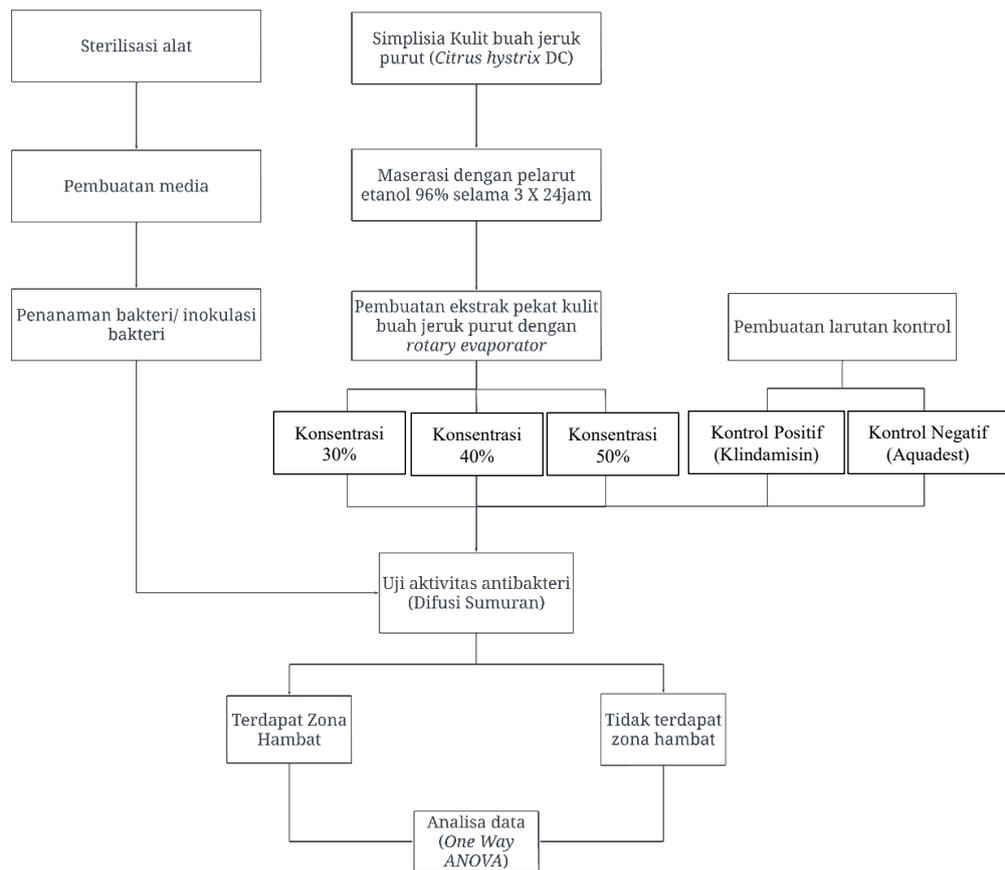
Pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi sumuran dilakukan dengan *pour plate* yakni dimulai dengan mengambil 1 mL bakteri *Lactobacillus acidophilus* dalam biakan *nutrient broth* dan di tuangkan ke dalam cawan petri steril dengan merata pada area cawan petri dan tambahkan dengan 18 mL media MHA kemudian diratakan dengan menggoyangkan cawan petri membentuk angka delapan selanjutnya ditunggu hingga padat. Campuran MHA dan bakteri yang telah memadat selanjutnya dilubangi dengan tabung/ *cork borer* dengan jumlah 3 lubang tiap cawan petri masing-masing berisi kontrol positif klindamisin, kontrol negatif aquadest dan kelompok perlakuan ekstrak etanol kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dengan beberapa konsentrasi (30%, 40%, dan 50%). Setiap lubang sumuran di isi masing-masing sebanyak 0,1 ml kemudian diteteskan pada lubang sumuran. Selanjutnya Cawan petri diinkubasi ke dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil dari proses inkubasi selama 1x24 jam dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat dihitung dari tepi (*breakpoint*) ke tepi yang bersebrangan melewati pusat lubang sumuran. Apabila tidak terdapat zona hambat disekitar lubang sumuran, maka dinyatakan diameter zona hambatnya adalah 0 mm. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan Davis and Stout (1971).

9. Analisa data

Data hasil pengujian aktivitas ekstrak etanol Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC) terhadap diameter zona hambat pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* dianalisa secara statistik dengan menggunakan metode *One Way ANOVA* (analisa varian

satu arah) dengan program *Statistical Product Services Solution* (SPSS)

10. Kerangka Pemecahan Masalah



Gambar 3. 1 Kerangka Pemecahan Masalah