

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL KULIT JERUK LEMON ( *CITRUS LIMON BURM F.* )  
TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* SECARA IN VITRO**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Nama : Ario Wisanggeni Dewantoro

NIM : 135070100111044

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG**

**2018**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**TUGAS AKHIR**

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL KULIT JERUK LEMON ( *CITRUS LIMON BURM F.* )  
TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* SECARA IN VITRO**

**Oleh:**

**Nama : Ario Wisanggeni Dewantoro**

**NIM : 135070100111044**

Dinyatakan lulus pada:

Hari : Jum'at

Tanggal : 20 Juli 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I,

Dr. Dr. Wisnu Barlianto, Msi. Med, Spa(K)  
197307262005011008

Pembimbing I / Penguji II,

Pembimbing II / Penguji III,

Prof.Dr.dr. Sanarto Santoso, DTM&H,  
Sp.MK(K)

NIP. 1948112201980021002

Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes

NIP. 195909261984032003

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter,

dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)  
NIP. 196310221996012001



## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Ario Wisanggeni Dewantoro

NIM : 135070100111044

Program Studi : Program Studi Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 25 Juni 2018

Ario Wisanggeni Dewantoro  
NIM 135070100111044

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul "**Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Lemon (*Citrus Limon Burm F.*) Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa Secara In Vitro***". Tugas Akhir ini merupakan karya ilmiah yang disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked) di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada semua pihak yang terlibat membantu menyelesaikan Tugas Akhir ini, terutama kepada :

1. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah memberi penulis kesempatan untuk menuntuk ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K) selaku Ketua Jurusan Program Studi Kedokteran yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Dr.dr. Wisnu Barlianto, Msi, Med. Sp.A(K) sebagai dosen penguji yang bersedia meluangkan waktu beliau untuk menguji dan memberikan masukan yang positif dalam menyempurnakan Tugas Akhir ini
4. Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK(K) selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan banyak bantuan pada penelitian untuk Tugas Akhir ini, yang dengan sabar membimbing penulis untuk bisa menulis dengan baik, dan senantiasa memberikan semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.

5. Dr.dr. Masruroh Rahayu, M.Kes selaku dosen pembimbing II yang senantiasa membimbing penulis dalam pengerjaan Tugas Akhir ini, memberikan masukan, nasehat, dukungan, serta doa sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
6. Segenap tim pengelola Tugas Akhir FKUB yang telah membantu penulis dalam penyelesaian Tugas Akhir ini, khususnya Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si. yang telah membantu penulis dalam penyelesaian Proposal Tugas Akhir.
7. Kepala Laboratorium dan jajaran staff di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, khususnya bu Uchi selaku analis yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian untuk Tugas Akhir ini.
8. Kepada orang tua dan kedua saudara saya yang saya banggakan, dr.H. Idewan Budi Santoso, Msi dan Hj. Albertin Emy Susilowati, S.E., serta Bhisma dan Aqil yang selalu menjadi motivasi saya untuk dapat meraih prestasi.
9. Teman-teman seperjuangan saya, kelas PD-A 2014 serta teman-teman angkatan PD 2014 yang senantiasa mengisi hari-hari perkuliahan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya baik dalam suka maupun duka.
10. Teman-teman Pendidikan Dokter satu penelitian saya Aldi, Ilham, Archi, Naufal Hasan, Arabel, Haris, Danan dan Azka yang selalu hadir untuk bertukar pikiran mengenai tugas akhir.
11. Pendukung setia saya yang senasib dan selalu mendengarkan keluh kesah saya, Dani, Dody, Afandi, Vian, Ody, Stefanus, Yuko, Rius, Arbi, dan Agung.
12. Teman-teman dari MSCIA FKUB yang menjadi inspirasi saya.
13. Dan kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian tugas akhir ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan berkat kepada orang-orang yang telah memberikan dukungan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna, baik dalam isi maupun cara penyusunannya. Oleh karena itu, penulis membuka diri untuk kritik dan saran yang dapat membangun dari semua pihak demi perbaikan di masa yang akan datang. Semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 18 Juli 2018



Dewantoro, Ario Wisanggeni. 2017. *Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Jeruk lemon (Citrus limon burm f) terhadap Bakteri Pseudomonas Aeruginosa secara In Vitro*. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Pembimbing: (1) Prof. Dr.dr.Sanarto Santoso, DTM&H, Sp. MK (K) (2) Dr. Dr. Masruroh Rahayu, M.Kes

### Abstrak

Pneumonia nosokomial merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang didapatkan pada saat di rawat rumah sakit. Di Amerika Serikat, pneumonia nosokomial menduduki peringkat kedua sebagai penyebab tersering infeksi nosokomial dengan angka kematian sebesar 20-50% dan jenis penyakit yang banyak di jumpai penduduk negara berkembang, yaitu Indonesia. Angka tersebut meningkat apabila disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Berdasarkan hal tersebut, perlu dikembangkan antibiotik baru terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Kulit jeruk lemon memiliki kandungan tannin, minyak atsiri, folivenol, dan saponin yang memiliki efek sebagai antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari antimikroba ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) pada *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan metode difusi sumuran. Konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon yang digunakan berturut-turut adalah 25 %, 35%, 45%, 55%, dan 65 % dengan empat kali pengulangan. Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan zona inhibisi terbentuk pada seluruh konsentrasi uji tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perubahan konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon memberikan perbedaan efek yang bermakna pada terhadap zona inhibisi pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ( $p < 0.05$ ). Terdapat hubungan antar pemberian ekstrak dengan diameter zona hambat menunjukkan efek yang bermakna (Korelasi,  $R = 0,989$ ). Dari hasil analisis data, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk lemon memiliki potensi sebagai antimikroba terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

**Kata Kunci :** *Pseudomonas aeruginosa*, jeruk lemon, potensi antimikroba.

Dewantoro, Ario Wisanggeni. 2017. Influence of ethanol Extract orange peel the lemon (*Citrus limon burm f*) against *Pseudomonas aeruginosa* Bacteria In Vitro. Final assignment, Course Of Medicine Faculty Medicine University Of Brawijaya. Supervisors: (1) Prof. Dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK (2) Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes

### Abstract

Nosocomial pneumonia is a disease caused by the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* infections acquired at the time in the outpatient hospital. In the United States, nosocomial pneumonia was ranked second as a cause of nosocomial infection of tersering with a death rate of 20-50% and the most abundant type of illness suffered by residents of developing countries, including Indonesia. That number increased when caused by bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Based on this, need to be developed new antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. The skin of the lemon has a content of tannins, essential oil, saponins, and folivenol that have effect as antimicrobial. This research aims to know the influence of the ethanol extract antimicrobial skin lemon (*Citrus limon burm f*) in *Pseudomonas aeruginosa* by using sumuran diffusion method. Concentration of the extract of etanol lemon orange peel used in a row is 25%, 35%, 45%, 55%, and 65% with four repetitions. Based on hasil penelitian, obtained as a zone of inhibition is formed on all the test concentrations. *Kruskal-Wallis* test results shows that the concentration changes extract ethanol orange peel lemon gives a meaningful effect on the difference towards the zone of inhibition of growth of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ( $p < 0.05$ ). The results showed that the changes concentration extract ethanol orange peel lemon gives a meaningful effect on the difference towards the zone of inhibition of growth of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ( $p < 0.05$ ). There is a relationship between the granting of extracts with drag zone diameter indicates a meaningful effects (of correlation,  $R = 0.989$ ). From the results of data analysis, it was concluded that can extract of lemon orange peel ethanol has the potential as an antimicrobial against *Pseudomonas aeruginosa* in bacteria in vitro.

**Keywords :** *Pseudomonas aeruginosa*, lemon, antimicrobial potential.

## DAFTAR ISI

Judul.....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan .....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak .....	vii
Abstract .....	viii
Daftar Isi .....	ix
Daftar Tabel.....	xiii
Daftar Gambar .....	xiv
Daftar Lampiran.....	xv
Daftar Singkatan.....	xvi
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus .....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademik .....	4
1.4.2 Manfaat Praktis .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>

2.1 Jeruk lemon ( <i>Citrus limon burm f.</i> ).....	5
2.1.1 Taksonomi dan Morfologi.....	6
2.1.2 Kandungan Kulit Jeruk Lemon.....	6
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
2.2.1 Taksonomi dan Morfologi.....	9
2.2.2 Patogenitas.....	10
2.2.3 Persebaran Bakteri.....	11
2.3 Bahan Antimikroba.....	12
2.4 Uji Kepekaan Bakteri Sebagai Antimikroba .....	13
2.4.1 Metode Difusi Sumuran.....	13
2.4.2 Metode Difusi Cakram.....	14
2.4.3 Metode Dilusi Tabung .....	14
2.4.4 Metode Dilusi Agar.....	14
2.5 Pembuatan Ekstrak Etanol dengan Metode Maserasi.....	15
BAB III KERANGKA KONSEP PENELITIAN .....	16
3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	16
3.1.1 Penjelasan Kerangka Konsep .....	17
3.2 Hipotesis .....	18
BAB IV METODE PENELITIAN .....	19
4.1 Rancangan Penelitian .....	19
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian .....	19
4.3 Pengulangan .....	19



4.4 Variabel Penelitian .....	20
4.4.1 Variabel Bebas.....	20
4.4.2 Variabel Terikat.....	20
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	20
4.6 Definisi Operasional .....	20
4.7 Alat dan Bahan Penelitian .....	21
4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit jeruk lemon.....	21
4.7.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri .....	22
4.7.3 Alat dan Bahan untuk Metode Difusi Sumuran .....	23
4.7.4 Alat dan Bahan untuk Metode Maserasi.....	23
4.8 Prosedur Penelitian .....	24
4.8.1 Identifikasi Bakteri.....	24
4.8.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit jeruk lemon.....	31
4.8.3 Uji Sensitivitas Antimikroba .....	32
4.8.4 Pengamatan dan Pengukuran.....	33
4.8.5 Skema Prosedur Penelitian .....	33
4.9 Analisis Data .....	35
4.10 Jadwal Kegiatan.....	36
<b>BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA .....</b>	<b>37</b>
5.1 Hasil Penelitian .....	37
5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri .....	37
5.1.2 Hasil Ekstrak Etanol Kulit jeruk lemon .....	39
5.1.3 Hasil Penelitian Pendahuluan.....	40



5.1.4 Hasil Difusi Sumuran.....	40
5.1.5 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri.....	43
5.2 Analisis Data .....	45
BAB VI PEMBAHASAN .....	48
6.1 Keterbatasan Peneliti.....	52
BAB VII PENUTUP .....	53
7.1 Kesimpulan .....	53
7.2 Saran .....	53
DAFTAR PUSTAKA.....	54
LAMPIRAN.....	57



## DAFTAR TABEL

### Tabel 5.1

Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.....44



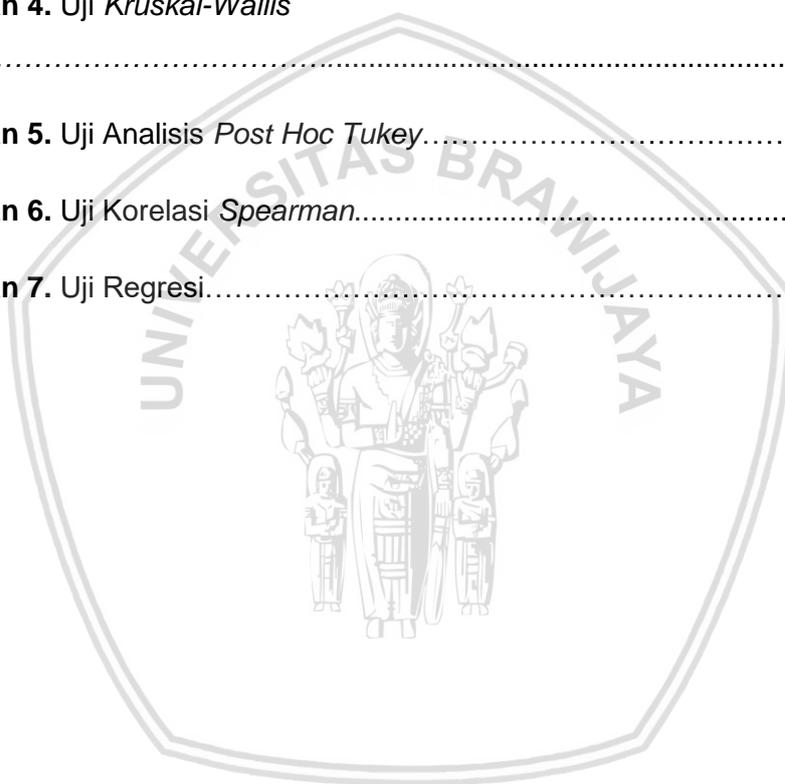
## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b> Jeruk Lemon.....	5
<b>Gambar 2.2</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada pewarnaan gram.....	9
<b>Gambar 3.1</b> Skema Kerangka Konsep Penelitian.....	16
<b>Gambar 4.1</b> Pengamatan Menggunakan Mikroskop Perbesaran Lensa Objektif 100x .....	26
<b>Gambar 4.2</b> Warna goresan menjadi ungu dalam waktu 10 detik pada tes oksidase (tes oksidase +).....	26
<b>Gambar 4.3</b> Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada media <i>Mueller Hinton Agar</i> .....	27
<b>Gambar 4.4</b> Hasil uji Microbact 12A/E-24E.....	30
<b>Gambar 4.5</b> Cara Pengukuran Diameter Zona Inhibisi.....	34
<b>Gambar 4.6</b> Skema alur uji antimikroba ekstrak etanol kulit jeruk lemon ( <i>Citrus limon burm f.</i> ) terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	35
<b>Gambar 5.1</b> Pengamatan Menggunakan Mikroskop Perbesaran Lensa Objektif 100x .....	37
<b>Gambar 5.2</b> Warna goresan menjadi ungu dalam waktu 10 detik pada tes oksidase (tes oksidase +).....	38
<b>Gambar 5.3</b> Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada media <i>Mueller Hinton Agar</i> .....	38
<b>Gambar 5.4</b> Hasil uji Microbact 12A/E-24E.....	39
<b>Gambar 5.5</b> Hasil Ekstrak Etanol Kulit jeruk lemon.....	40
<b>Gambar 5.6</b> Hasil Penelitian Pendahuluan Menggunakan metode difusi sumuran.....	42
<b>Gambar 5.7</b> Hasil Difusi Sumuran Konsentrasi Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Lemon 65%,55%,45%,35%,25%,dan 0%.....	43
<b>Gambar 5.8</b> Grafik Rerata Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada Ekstrak etanol kulit jeruk lemon.....	45



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b> Penelitian Pendahuluan.....	57
<b>Lampiran 2.</b> Alat dan Bahan Penelitian.....	58
<b>Lampiran 3.</b> Uji Normalitas dan Uji Homogenitas.....	59
<b>Lampiran 4.</b> Uji <i>Kruskal-Wallis</i> <i>Test</i> .....	59
<b>Lampiran 5.</b> Uji Analisis <i>Post Hoc Tukey</i> .....	60
<b>Lampiran 6.</b> Uji Korelasi <i>Spearman</i> .....	62
<b>Lampiran 7.</b> Uji Regresi.....	63



## DAFTAR SINGKATAN

- CFU : *Coloni Forming Unit*
- CFU/ml : *Coloni Forming Unit/mililiter*
- SPSS : *Statistical Product of Service Solution*
- K (-) : *Kontrol Negatif*



repository.ub.ac.id

Dewantoro, Ario Wisanggeni. 2017. *Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Jeruk lemon (Citrus limon burm f) terhadap Bakteri Pseudomonas Aeruginosa secara In Vitro*. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Pembimbing: (1) Prof. Dr.dr.Sanarto Santoso, DTM&H, Sp. MK (K) (2) Dr. Dr. Masruroh Rahayu, M.Kes

### Abstrak

Pneumonia nosokomial merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang didapatkan pada saat di rawat rumah sakit. Di Amerika Serikat, pneumonia nosokomial menduduki peringkat kedua sebagai penyebab tersering infeksi nosokomial dengan angka kematian sebesar 20-50% dan jenis penyakit yang banyak di jumpai penduduk negara berkembang, yaitu Indonesia. Angka tersebut meningkat apabila disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Berdasarkan hal tersebut, perlu dikembangkan antibiotik baru terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Kulit jeruk lemon memiliki kandungan tannin, minyak atsiri, folivenol, dan saponin yang memiliki efek sebagai antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari antimikroba ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) pada *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan metode difusi sumuran. Konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon yang digunakan berturut-turut adalah 25 %, 35%, 45%, 55%, dan 65 % dengan empat kali pengulangan. Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan zona inhibisi terbentuk pada seluruh konsentrasi uji tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perubahan konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon memberikan perbedaan efek yang bermakna pada terhadap zona inhibisi pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ( $p < 0.05$ ). Terdapat hubungan antar pemberian ekstrak dengan diameter zona hambat menunjukkan efek yang bermakna (Korelasi,  $R = 0,989$ ). Dari hasil analisis data, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk lemon memiliki potensi sebagai antimikroba terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

**Kata Kunci :** *Pseudomonas aeruginosa*, jeruk lemon, potensi antimikroba.

repository.ub.ac.id

Dewantoro, Ario Wisanggeni. 2017. Influence of ethanol Extract orange peel the lemon (*Citrus limon burm f*) against *Pseudomonas aeruginosa* Bacteria In Vitro. Final assignment, Course Of Medicine Faculty Medicine University Of Brawijaya. Supervisors: (1) Prof. Dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK (2) Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes

### Abstract

Nosocomial pneumonia is a disease caused by the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* infections acquired at the time in the outpatient hospital. In the United States, nosocomial pneumonia was ranked second as a cause of nosocomial infection of tersering with a death rate of 20-50% and the most abundant type of illness suffered by residents of developing countries, including Indonesia. That number increased when caused by bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Based on this, need to be developed new antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. The skin of the lemon has a content of tannins, essential oil, saponins, and folivenol that have effect as antimicrobial. This research aims to know the influence of the ethanol extract antimicrobial skin lemon (*Citrus limon burm f*) in *Pseudomonas aeruginosa* by using sumuran diffusion method. Concentration of the extract of etanol lemon orange peel used in a row is 25%, 35%, 45%, 55%, and 65% with four repetitions. Based on hasil penelitian, obtained as a zone of inhibition is formed on all the test concentrations. *Kruskal-Wallis* test results shows that the concentration changes extract ethanol orange peel lemon gives a meaningful effect on the difference towards the zone of inhibition of growth of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ( $p < 0.05$ ). The results showed that the changes concentration extract ethanol orange peel lemon gives a meaningful effect on the difference towards the zone of inhibition of growth of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ( $p < 0.05$ ). There is a relationship between the granting of extracts with drag zone diameter indicates a meaningful effects (of correlation,  $R = 0.989$ ). From the results of data analysis, it was concluded that can extract of lemon orange peel ethanol has the potential as an antimicrobial against *Pseudomonas aeruginosa* in bacteria in vitro.

**Keywords :** *Pseudomonas aeruginosa*, lemon, antimicrobial potential.



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk negara berkembang, termasuk Indonesia (Radji, 2011). Penyakit infeksi merupakan penyakit yang patogen atau agennya memiliki kemampuan untuk masuk, bertahan, dan berkembang biak di dalam tubuh (Timmreck, 2005). Infeksi disebabkan oleh bakteri, virus, jamur, protozoa, atau beberapa kelompok minor lain (mikroplasma, riketsia, dan klamidia) (Gould dan Brooker, 2003). Salah satu penyebab infeksi yang menjadi perhatian saat ini adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Selain itu *Pseudomonas aeruginosa* juga merupakan penyebab infeksi nasokomial di rumah sakit (Jawetz dkk. 2005).

*Pseudomonas aeruginosa* menyebabkan kontaminasi pada perlengkapan anestesi dan terapi pernafasan, cairan intravena, bahkan air hasil proses penyulingan. Suatu penelitian di AS membuktikan bahwa dari 414 pasien menjalani prosedur bronkoskopi didapati 9,4% infeksi saluran nafas atas dan bawah serta infeksi lewat aliran darah, dan pada 66,7% dari infeksi tersebut didapati *Pseudomonas aeruginosa* sesudah dilakukan kultur (Todar, 2004; Srinivisan A, 2003).

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri gram negative berbentuk batang yang dapat menimbulkan penyakit kepada hewan dan tanaman, termasuk manusia. Bakteri pseudomonas juga terdapat di tubuh manusia sebagai normal flora. Bakteri ini dapat menjadi patogen jika berada pada tempat dengan daya tahan tidak normal (Jawetz dkk., 2005). Bakteri ini menyebabkan beberapa penyakit infeksi seperti dermatitis, folikulitis, otitis media dan eksterma, infeksi mata, selain itu bakteri ini juga dapat menyebabkan infeksi saluran nafas bagian bawah, saluran kemih, dan organ lain (Jawetz, *et al.*, 2001).

Upaya penanggulangan penyakit infeksi dapat dilakukan dengan antibiotik (Radji, 2011). Siprofloksasin merupakan salah satu obat antibiotik pilihan pertama untuk penanganan terhadap infeksi *Pseudomonas aeruginosa* (Goodman dan Gilman, 2008). Antibiotik ini bekerja dengan cara menghambat enzim gyrase DNA (Tambayong, 2002). Hasil uji sensitivitas siprofloksasin menunjukkan bahwa rata-rata diameter zona hambat *Pseudomonas aeruginosa* (4,72 cm) lebih tinggi dibandingkan terhadap *Staphylococcus aureus* (3,73 cm) dengan konsentrasi siprofloksasin sebesar 0,3%. Sehingga siprofloksasin lebih poten dalam menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. (Ikonne and Odozor, 2009).

Pada saat ini hampir disuluruh dunia yang menjadi masalah utama pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ini adalah berkembangnya mikroorganisme yang resisten terhadap berbagai jenis antibiotika selain siprofloksasin (MDRPA) (Nazhifah, *et al.*, 2013). Multi Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRPA) adalah kondisi dimana bakteri resisten terhadap tiga atau lebih kelas antibiotik seperti penisilin, sefalosporin, monobaktam, karbapenem, aminoglikosida, fluorokuinolon, dan lain lain (Sjahjadi, *et al.*, 2014).

Bangsa Indonesia terdiri dari berbagai sukubangsa yang memiliki keanekaragaman obat tradisional yang dibuat dari bahan-bahan alami bumi Indonesia, termasuk tanaman obat (Anonim, 1992). Di Indonesia terdapat sekitar 30.000 jenis tanaman dan 7000 diantaranya memiliki khasiat obat. Keanekaragaman sumberdaya hayati Indonesia diperkirakan menempati urutan kedua setelah Brasil (Fellows, L., 1992).

Salah satu jenis tanaman yang terkenal di masyarakat adalah buah jeruk dengan berbagai varietasnya. Buah jeruk juga terkenal sebagai obat tradisional dari berbagai macam penyakit seperti batuk, sakit tenggorokan, demam, antiinflamasi, antikanker, antibakteri, dan antifungi (Khuswaha *et al.*, 2012). Jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terdapat kandungan kimia flavonoid (flavones) dan tanin (Sutriningsih, 2005). Flavonoid merupakan senyawa polifenol mempunyai sifat khas sebagai pengendap protein dan mudah terurai dalam asam (Manitto, 1992 dalam Windyaanita, 2006). Sebagai zat antibakteri, flavonoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan merusak dinding sel dan membran sitoplasma bakteri serta

mencegah pembelahan bakteri sehingga menyebabkan bakteri tidak dapat berkembang biak (Robinson, 1995). Tanin adalah penghambat pertumbuhan bakteri yang baik karena memiliki senyawa asam tanic.. Selain itu, tanin juga bekerja dengan melarutkan lapisan lipid dinding bakteri sehingga menyebabkan kebocoran sel (Bylka *et al.* , 2004).

Dengan adanya efek anti bakteri tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dicantumkan di atas untuk mengetahui uji ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, adalah untuk mengatasi permasalahan yang akan kita bahas sebagai berikut :

Apakah ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara In Vitro?

## 1.3 Tujuan Penulisan

### A. Tujuan umum

Tujuan umum dalam melakukan penulisan ini sebagai berikut:

Mengetahui efek hambat ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara In Vitro.

### B. Tujuan khusus

Mengetahui kadar hambat minimum (KHM) ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

## 1.4 Manfaat

### A. Manfaat untuk akademik

Dapat dijadikan sebagai ilmu pengetahuan tambahan dalam bidang kedokteran tentang kegunaan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

### B. Manfaat untuk praktik

Memanfaatkan limbah kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) yang sebagian besar dibuang, sehingga dapat digunakan sebagai inovasi baru di masa depan.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*)

Jeruk atau limau merupakan tanaman buahan berbunga anggota genus *Citrus* dari family *Rutaceae*. Anggotanya berbentuk pohon dengan buah yang berdaging dengan rasa asam yang segar, meskipun banyak di antaranya yang memiliki rasa manis. Rasa asam berasal dari asam sitrat yang terkandung pada semua jeruk (Marwanto, 2014). Jeruk (*Citrus*) adalah sejenis jeruk yang buahnya biasa dipakai sebagai penyedap dan penyegar dalam banyak tataboga di dunia. *Citrus* dibudidayakan di Spanyol, Portugal, Argentina, Brasil, Amerika Serikat, dan negara-negara lainnya di sekitar laut Tengah. Tanaman ini cocok untuk daerah beriklim kering dengan musim dingin yang relative hangat (Marwanto, 2014). Jeruk lemon (*Citrus limon*) merupakan tanaman asli di Asia Tenggara termasuk Indonesia (Manner et al, 2006). Bagian dari tanaman jeruk lemon (*Citrus limon*) yang sering dimanfaatkan adalah kulit buah, bunga, daun, air perasan (Sauls, 1998).



Gambar 2.1 Jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) (Morton,1987)

### 2.1.1 Taksonomi dan Morfologi

Kingdom : Plantae

Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida-Dicotyledons

Sub Kelas : Rosidae

Ordo : Sapinales

Famili : Rutaceae

Genus : *Citrus*

Spesies : *Citrus limon burm f.* ( Manner et al, 2002)

Jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) termasuk salah satu jenis tumbuhan perdu yang banyak memiliki dahan dan ranting dengan tinggi maksimal mencapai 10 sampai 15 kaki (3-6 m). Citrus limon memiliki batang berduri, daun hijau dan lonjong, bunga berbentuk oval dan berwarna putih dengan garis-garis ungu di dalamnya. Kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) berwarna kuning terang, kadang terdapat garis berwarna hijau atau putih dan mempunyai tebal sekitar 6-10 mm (Morton, 1987).

### 2.1.2 Kandungan Kulit Jeruk Lemon

*Citrus limon* mengandung sejumlah asam sitrat (3,7 %), minyak astiri (2,5 %), 70% limonene pene. *Citrus limon* juga mengandung potassium 145 mg per 100 g lemon, bioflavonoids, dan vitamin C 40-50 mg per 100 g (Chevallier, 1996).

Asam sitrat, asam sitrat termasuk salah satu asam organik dengan nama kimia 2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid (Lewis, 2001).

Polifenol, *Citrus limon* mengandung polifenol sebagai antioksidan dan antibakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonela typhi*, *Klasiella pneumonia*, dan *E.coli* (Kumar et al, 2011) dan anti fungi *Candida albicans* (Kirbsalar et al, 2009). Polifenol pada *Citrus limon* meliputi:

#### 1. Flavanoid

Flavanoid dalam *Citrus limon* menyebabkan warna kuning terang yang berguna untuk melindungi kekuatan vitamin C dengan meningkatkan absorpsi dan melindungi dari oksidasi, mengurangi kadar kolesterol sampai 40% dengan mengurangi produksi kolesterol pada liver, dapat mengurangi resiko penyakit jantung, mencegah kanker, menguatkan dinding pembuluh darah. Kadar flavonoid paling tinggi terdapat pada kulit *Citrus limon*.

#### 2. Tanin

Tanin ditemukan pada kulit dan daun *Citrus limon*. Tanin berfungsi sebagai antibakteri dan antioksidan. Tanin menyebabkan rasa *Citrus limon* menjadi agak pahit dan asam.

#### 3. Fenol

Fenol terdapat pada kulit, daun, dan air perasan *Citrus limon*. Fenol berfungsi sebagai anti bakteri, antifungi, dan antioksidan. Fenol pada *Citrus limon* dapat mengurangi kolesterol dalam darah sehingga dapat mengurangi resiko penyakit jantung (Grohmann and Manthey, 2001).

### 2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* termasuk dalam famili *Pseudomonadaceae*. *Pseudomonadaceae* dan beberapa genus lain bersama beberapa organisme tertentu, dikenal sebagai pseudomonad. Istilah pseudomonad ditujukan pada bakteri yang mempunyai perlengkapan fisiologik sama dengan bakteri dari genus *Pseudomonas*. Beberapa dari bakteri-bakteri ini pada awalnya termasuk genus *Pseudomonas* tetapi kemudian dipindahkan ke genus atau famili karena jauhnya jarak filogenetik mereka dari genus *Pseudomonas* (Todar, 2004).

Pseudomonad biasanya hidup di tanah dan air, merupakan organisme patogen pada tanaman. Tetapi *Pseudomonas aeruginosa* bersama spesies terdahulu dari *Pseudomonas* yaitu *Pseudomonas cepacia* (kini dinamakan *Burkholderia cepacia*) dan *Pseudomonas maltophilia* (dinamai kembali menjadi *Xanthomonas maltophilia* dan sekarang disebut *Stenotrophomonas maltophilia*) adalah patogen pada manusia. *Pseudomonas pseudomallei* (kini dinamakan *Burkholderia pseudomallei*) adalah penyebab melioidosis (Todar, 2004; Jawetz, 2003).

*Pseudomonas aeruginosa* adalah patogen oportunistik, yaitu memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu penyakit suatu infeksi. Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi saluran kemih, infeksi saluran pernafasan, dermatitis, infeksi jaringan lunak, bakteremia, infeksi tulang dan sendi, infeksi saluran pencernaan, dan bermacam-macam infeksi sistemik, terutama pada penderita luka bakar berat, kanker, dan penderita AIDS yang mengalami penurunan sistem imun. Infeksi *Pseudomonas aeruginosa* menjadi problema serius pada pasien rumah sakit yang menderita kanker, fibrosis kistik, dan luka bakar. Angka fatalitas kasus pasien-pasien tersebut adalah 50%. Bakteri ini merupakan penyebab sepsis yang umum dijumpai pada pasien di unit perawatan intensif (Todar, 2004; IARW, 2005).



Gambar 2.2 *Pseudomonas aeruginosa* pada pewarnaan gram (Brooks.*et al.*, 2013).

### 2.2.1 Taksonomi dan Morfologi

Kingdom : Bacteria Phylum : Proteobacteria

Class : Gamma Proteobacteria

Order : Pseudomonadales

Family : Pseudomonadaceae

Genus : Pseudomonas

Species : *Pseudomonas aeruginosa* ( Trelia, 2004)

*Pseudomonas aeruginosa* berbentuk batang dengan ukuran sekitar 0,6 x 2  $\mu\text{m}$ . Bakteri ini terlihat sebagai bakteri tunggal, berpasangan, dan terkadang membentuk rantai yang pendek. *Pseudomonas aeruginosa* termasuk bakteri gram negatif. Bakteri ini bersifat aerob, katalase positif, oksidase positif, tidak mampu memfermentasi tetapi dapat mengoksidasi glukosa/karbohidrat lain, tidak berspora, tidak mempunyai selubung (sheat) dan mempunyai flagel monotrika (flagel tunggal pada kutub) sehingga selalu bergerak. Bakteri ini dapat tumbuh di air suling dan akan tumbuh dengan baik dengan adanya unsur N dan C ( Jawetz, 1996). *Pseudomonas aeruginosa* bersifat aerobik obligat yang tumbuh dengan cepat pada berbagai tipe media,

kadang memproduksi bau manis, seperti anggur atau seperti jagung (corn taco like odor). Beberapa galur menghemolisis darah. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni bulat, halus dengan warna fluoresen kehijauan. Juga sering memproduksi pigmen kebiruan dan fluoresen yang disebut piosianin (pyocyanin) yang larut dalam agar. Spesies pseudomonas lain tidak memproduksi piosianin. Beberapa galur *Pseudomonas aeruginosa* juga menghasilkan pigmen fluoresen pioverdine yang memberi warna kehijauan pada agar. Beberapa galur menghasilkan pigmen merah gelap pioverdin atau pigmen hitam piomelanin (Brooks et al., 2005; Todar, 2008).

### 2.2.2 Patogenitas

Kemampuan *Pseudomonas aeruginosa* menyerang jaringan bergantung pada produksi enzim-enzim dan toksin-toksin yang merusak barrier bagian tubuh dan sel-sel inang. Endotoksin *Pseudomonas aeruginosa* seperti yang dihasilkan bakteri gram negatif lain, menyebabkan gejala sepsis dan syok septik. Eksotoksin A menghambat sintesis protein eukaryotik dengan cara kerja yang sama dengan cara kerja toksin difteri yaitu mengkatalisis pemindahan sebagian ADP-ribosil dari NAD (*nicotinamide adenine dinucleotide*) kepada EF-2 (*elongation factor 2*) sesuai reaksi berikut:

ecotouin A



Hasil dari kompleks ADP-ribosil- EF-2 adalah inaktivasi sintesis protein sehingga fungsi fisiologik sel normal. Enzim-enzim ekstraseluler, seperti elastase dan protease mempunyai efek histotoksik dan mempermudah invasi organisme ini ke dalam pembuluh darah (Jawetz *Et al*, 2003).

Bakteri yang baru diisolasi dari paru-paru penderita fibrosis kistik bersifat mukoid. Lapisan alginat yang mengelilingi bakteri dan mikrokoloni bakteri dalam paru-paru berfungsi sebagai adhesin dan kemungkinan mencegah fagositosis bakteri, bahkan dapat meningkatkan resistensi *Pseudomonas aeruginosa* terhadap antibiotika (Whit D D, 1994).

Strain *Pseudomonas aeruginosa* yang mempunyai sistem sekresi tipe III secara signifikan lebih virulen dibandingkan dengan yang tidak mempunyai sistem sekresi tersebut. Sistem sekresi tipe III adalah sistem yang dijumpai pada bakteri gram negatif, terdiri dari  $\pm$  30 protein yang terbentang dari bagian dalam hingga luar membran sel bakteri, berfungsi seperti jarum suntik yang menginjeksi toksin-toksin secara langsung ke dalam sel inang sehingga memungkinkan toksin mencegah netralisasi antibodi. (Jawetz, 2004).

*Pseudomonas aeruginosa* bersifat patogen hanya bila memasuki daerah dengan sistem pertahanan yang tidak normal, misalnya saat membran mukosa dan kulit "robek" karena kerusakan jaringan langsung, sewaktu penggunaan kateter intravena atau kateter air kemih, atau bila terdapat neutropenia, seperti pada kemoterapi kanker (Jawetz *et al*, 2001).

### 2.2.3 Persebaran Bakteri

*Pseudomonas aeruginosa* terdapat di tanah dan air, dan pada  $\pm$ 10% orang merupakan flora normal di kolon (usus besar). Dapat dijumpai pada daerah lembab di kulit dan dapat membentuk koloni pada saluran pernafasan bagian atas pasien-pasien rumah sakit (Jawetz, 2003).

*Pseudomonas aeruginosa* dapat dijumpai di banyak tempat di rumah sakit; disinfektan, alat bantu pernafasan, makanan, saluran pembuangan air, dan kain pel merupakan beberapa contoh reservoir. Suatu penelitian di unit perawatan intensif neonatus menyatakan bahwa *Pseudomonas aeruginosa*

paling sering membentuk koloni di saluran pernafasan dan saluran cerna. Hal ini terutama dijumpai pada bayi prematur oleh karena pH lambung sering tinggi sehingga mendukung pertumbuhan bakteri. Penyebaran terjadi dari pasien ke pasien lewat tangan karyawan rumah sakit, melalui kontak langsung dengan reservoir, atau lewat pencernaan makanan dan minuman yang terkontaminasi (Todar, 2004; Foca et al, 2000).

*Pseudomonas aeruginosa* menyebabkan kontaminasi pada perlengkapan anestesi dan terapi pernafasan, cairan intravena, bahkan air hasil proses penyulingan. Endoskopi, termasuk bronkoskopi adalah alat-alat medik yang paling sering dihubungkan dengan berjangkitnya infeksi nosokomial. Suatu penelitian di AS membuktikan bahwa dari 414 pasien yang menjalani prosedur bronkoskopi didapati 9.4% infeksi saluran nafas atas dan bawah serta infeksi lewat aliran darah, dan pada 66.7% dari infeksi tersebut didapati *Pseudomonas aeruginosa* sesudah dilakukan kultur (Todar, 2004; Srinivisan et al, 2003).

Untuk tujuan epidemiologi, strain dapat ditentukan tipenya berdasarkan kepekaan terhadap piosin dan imunotipe lipopolisakaridanya. Vaksin dari jenis yang tepat yang diberikan pada penderita dengan risiko tinggi akan memberikan perlindungan sebagian terhadap sepsis *Pseudomonas*. Terapi semacam itu telah digunakan secara eksperimental pada penderita leukemia, luka bakar, fibrosis kistik, dan imunosupresi (Jawetz et al, 2001).

### 2.3 Bahan Antimikroba

Antimikroba atau antibiotik merupakan senyawa alami atau sintetik yang mempunyai efek menghentikan atau menekan proses biokimiawi dalam organisme, khususnya dalam proses infeksi oleh mikroba (Soleha, 2015). Berdasarkan sifat toksisitas, antimikroba dibagi menjadi dua, yaitu bakterostatik

yang merupakan antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba, dan bakteriosidal yang merupakan antimikroba yang dapat membunuh mikroba. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok, yaitu (Ain, 2010).

- a. Antimikroba bakteriostatik yang mengganggu metabolisme sel mikroba
- b. Antimikroba bakteriosidal yang menghambat sintesis dinding sel bakteri dengan cara memecah dan menghambat pembentukan enzim
- c. Antimikroba bakteriosidal dan bakteriostatik yang mengganggu permeabilitas membran sel mikroba, dengan cara melisis sel menghilangkan substansi seluler
- d. Antimikroba bakteriosidal dan bakteriostatik yang menghambat sintesis protein sel mikroba dengan cara menghambat tahap sintesis protein pada sel kuman tanpa mempengaruhi sel normal tubuh
- e. Antimikroba yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel mikroba

## **2.4 Uji Kepekaan Bahan Antimikroba**

Aktifitas antibakteri ditentukan oleh spektrum kerja (spektrum luas dan spektrum sempit), cara kerja (bakteriosidal dan bakteriostatik) dan konsentrasi hambat minimum (KHM) serta potensi pada KHM. Suatu antibakteri dikatakan mempunyai aktifitas yang tinggi apabila KHM terjadi pada kadar antibiotik yang rendah tetapi mempunyai daya bunuh atau daya hambat yang besar. Metode yang umum digunakan untuk menguji daya antibakteri adalah metode difusi sumuran, difusi cakram, dilusi tabung, dan dilusi agar (ngaisah, 2010).

### **2.4.1 Metode Difusi Sumuran**

Metode untuk menguji beberapa bahan antibakteri. Metode ini dilakukan dengan cara membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan larutan yang akan diuji, setelah diinkubasi pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

#### **2.4.2 Metode Difusi Cakram**

Metode difusi cakram dilakukan dengan meneteskan larutan antibakteri yang akan diuji ke dalam cakram kertas kosong sejumlah tertentu dengan kadar tertentu pula. Cakram kertas diletakkan di atas permukaan agar padat yang telah diolesi bakteri, diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Aktifitas antibakteri dapat dilihat dari daerah hambat disekeliling cakram kertas (Ngaisah, 2010).

#### **2.4.3 Metode Dilusi Tabung**

Metode dilusi tabung menggunakan satu seri tabung reaksi yang dapat diisi media cair dan sejumlah sel bakteri yang akan diuji. Masing-masing tabung diisi dengan obat yang akan diencerkan secara serial. Selanjutnya, diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C, diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih adalah KHM dari obat. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri adalah KBM dari obat terhadap bakteri uji (Dzen dkk., 2003).

#### **2.4.4 Metode dilusi Agar**

Metode diusi agar merupakan metode lain untuk menilai Kadar Hambat Minimal (KHM) namun Kadar Bunuh Minimal (KBM) tidak dapat dilihat pada metode ini. Pada metode ini beberapa konsentrasi agen mikroba dicampur dengan plateagar, satu plate untuk masing-masing konsentrasi yang diuji. Langkah awal dari metode ini yaitu dengan membuat pembenihan cair bakteri. isolat diinokulasikan ke dalam nutrient broth dan diinkubasi selama 18-24 jam sampai terjadi kekeruhan. Kekeruhan distandarisasi dengan McFarland 0,5 ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) kemudian diambil sejumlah 0,001 ml dan diteteskan pada permukaan agar. Setelah diinkubasi semalam dilihat pertumbuhan koloni bakteri pada permukaan agar, apabila jumlah koloni bakteri yang tumbuh  $< 3$  CFU (Colony Forming Unit) maka konsentrasi tersebut merupakan Kadar Hambat Minimal (KHM) (Baron *et al.*, 1994).

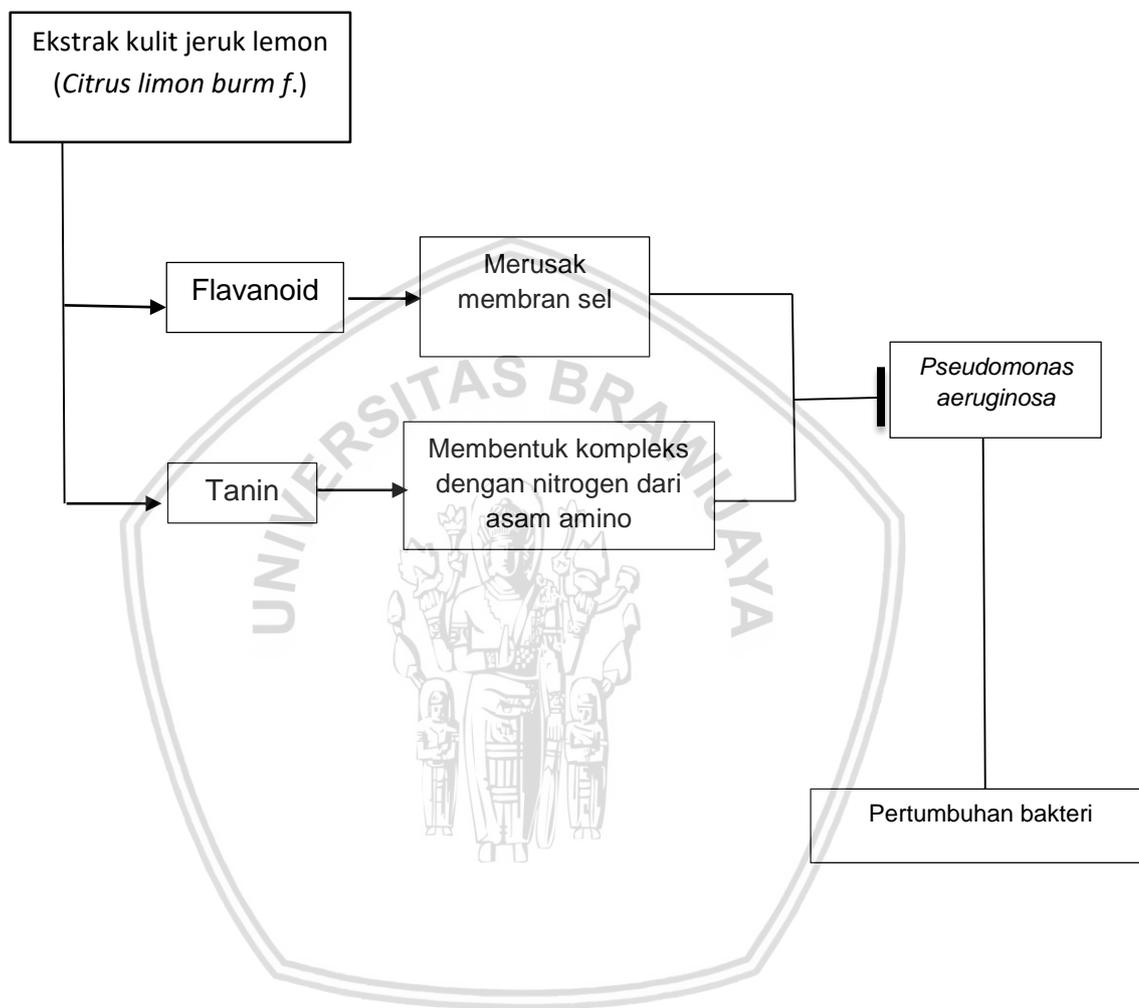
## **2.5 Pembuatan Ekstrak Etanol dengan Metode Maserasi**

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Secara teknologi maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi dilakukan dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan atau kamar (Depkes RI,2000).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

—| : alur kerja yang dihambat

→ : kandungan kerja

Gambar 3.1 Skema Kerangka Konsep Penelitian

### 3.1.1 Penjelasan Kerangka Konsep

Ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus Limon burm f.*) memiliki kandungan senyawa flavonoid, dan tanin.

Flavonoid merupakan senyawa polifenol mempunyai sifat khas sebagai pengendap protein dan mudah terurai dalam asam (Manitto, 1992 dalam Windyaanita, 2006). Senyawa fenol dan turunannya flavonoid merupakan salah satu anti bakteri yang bekerja dengan mengganggu fungsi membran sitoplasma. Sebagai zat antibakteri, flavonoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan merusak dinding sel dan membran sitoplasma bakteri serta mencegah pembelahan bakteri sehingga menyebabkan bakteri tidak dapat berkembang biak (Robinson, 1995). Pada kondisi rendah dapat merusak membran sitoplasma yang dapat menginaktifkan sistem enzim bakteri, konsentrasi tinggi mampu merusak membran sitoplasma dan mengendapkan protein sel sehingga bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan dan bahkan kematian (Volk dan Wheeler, 1993).

Tanin adalah penghambat pertumbuhan bakteri yang baik karena memiliki senyawa asam tannic. Tanin, sebagai antibakteri, bekerja dengan merubah susunan ikatan hidrogen dan membentuk kompleks dengan nitrogen dari asam amino pada sel bakteri sehingga kehilangan aktivitas vitalnya. Selain itu, tanin juga bekerja dengan melarutkan lapisan lipid dinding bakteri sehingga menyebabkan kebocoran sel (Bylka *et al.*., 2004).

Pengaruh antimikroba kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat dengan menentukan zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Zona inhibisi merupakan zona bening di sekitar lubang sumuran yang menunjukkan terjadinya penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus Limon burm f.*) memiliki efek antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara in vitro.



## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Dengan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *true eksperimental-post test only control group design*, dengan fokus penelitian pada kekuatan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* setelah perlakuan pemberian ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) secara in vitro melalui metode difusi sumuran untuk menentukan zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) dan sampel bakteri uji yang digunakan dalam penelitian adalah *Pseudomonas aeruginosa* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.3 Pengulangan

Jumlah pengulangan yang akan dilakukan pada penelitian ini menggunakan rumus (Solimun, 2001) :

$$p(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

p = Jumlah perlakuan yang dilakukan

n = Jumlah pengulangan tiap perlakuan

Dengan penelitian ini digunakan 7 macam perlakuan yaitu ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) konsentrasi 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, kontrol

negatif berupa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang diberi akuades dan antibiotik siprofloksin sebagai kontrol positif, maka :

$$p(n-1) \geq 15$$

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \text{ (dibulatkan keatas menjadi 4)}$$

Jumlah perlakuan ulang ( $n$ ) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3,14 yang kemudian dibulatkan menjadi 4 kali pengulangan.

#### **4.4 Variabel Penelitian**

##### **4.4.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi 25%, 35%, 45%, 55%, dan 65% ekstrak etanol kulit jeruk lemon.

##### **4.4.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran

#### **4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Februari 2018 sampai Maret 2018. Bahan dan tempat ekstraksi kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) diperoleh di UPT Materia Medika Kota Batu dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### **4.6 Definisi Operasional**

- 4.6.1 Kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan Materia Medika Batu.
- 4.6.2 Ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) menggunakan pelarut etanol 96% yang diproses dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi.
- 4.6.3 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan dalam penelitian berasal dari stock culture Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- 4.6.4 Kelompok kontrol negatif bakteri adalah dengan perlakuan akuades.
- 4.6.5 Kelompok perlakuan adalah kelompok dengan perlakuan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) dengan konsentrasi 25%, 35%, 45%, 55%, 65%.
- 4.6.6 Kelompok kontrol positif adalah kelompok dengan perlakuan antimikroba siprofloksasin yang merupakan antimikroba yang terbukti efektif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Zona inhibisi adalah zona bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dan menunjukkan bahan antimikroba dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin lebar zona inhibisi maka semakin rentan bakteri tersebut terhadap ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*). Diameter zona inhibisi diukur dalam satuan milimeter (mm).

#### **4.7. Alat dan Bahan Penelitian**

##### **4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*)**

1. Alat
  - a. Oven

- b. Timbangan
- c. Gelas erlenmeyer
- d. Kertas saring
- e. *Rotatory evaporator*
- f. Labu penampang etanol
- g. Labu evaporator
- h. Selang *water pump*
- i. *Water pump*
- j. *Water bath*
- k. *Vacuum pump*

## 2. Bahan

- a. kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*)
- b. Pelarut etanol 96%
- c. Aquades

### 4.7.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

#### 1. Alat

- a. Tabung reaksi
- b. Ose
- c. Lampu spiritus dan Bunsen
- d. Incubator
- e. Spektrofotometer
- f. Korek api
- g. Label
- h. Kertas filter
- i. Larutan reagen tetramethyl p-phenylenediamine dichloride 1% (Kovac's reagen)
- j. Obyek glass dank aca penutup

k. Mikroskop

2. Bahan

a. *Pseudomonas aeruginosa*

b. Medium *Mueller-Hinton Agar (MH Agar) Plate*

c. Medium *MacConkey*

d. Suspense bakteri dari *Mueller-Hinton Broth (MH Broth)*

e. Bahan pewarnaan gram ; kristal violet, lugol, alcohol 96%, safranin

f. Akuades steril

g. Kertas penghisap atau tisu

h. Minyak emersi

**4.7.3 Alat dan Bahan untuk Metode Difusi Sumuran**

1. Alat

a. Cawan petri

b. Pelubang sumuran

c. Pipet mikro

d. Incubator

e. Bunsen burner

f. Korek api

g. Penggaris

h. Jangka sorong

2. Bahan

a. Ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*)

b. Suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*  $10^8$  CFU/ml

c. Aquades

d. Agar *Mueller Hinton*

**4.7.4 Alat dan Bahan untuk Metode Maserasi**

1. Alat

- a. Toples Tertutup
- b. Corong Gelas
- c. Timbangan Analitik
- d. Gelas Ukur
- e. Botol
- f. *Erlenmeyer*
- g. *Rotary Evaporator*
- h. *Beaker glass*
- i. *Shaker Digital*

#### Bahan

- a. Simplisia kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*)
- b. Etanol 96%
- c. Kertas Saring

### 4.8 Prosedur penelitian

#### 4.8.1 Identifikasi Bakteri

- a. Pewarnaan Gram (Brooks et al., 2013)

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui *Pseudomonas* termasuk bakteri Gram positif atau Gram negative. Prosedur pewarnaan Gram, sebagai berikut.

1. Gelas obyek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api lalu dibiarkan dingin.
2. Satu tetes akuades steril diteteskan pada gelas obyek.
3. Dengan ose jarum yang steril, diambil sedikit bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang tumbuh pada medium padat kemudian disuspensikan dengan satu tetes akuades steril yang sudah diteteskan terlebih dulu pada gelas obyek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.

4. Hapusan dibiarkan kering di udara. Setelah kering hapusan difiksasi dengan cara melewatkan sediaan sebanyak tiga sampai lima kali di atas api. Sediaan siap diwarnai.
5. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama satu menit. Kemudian sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.
6. Sediaan dituangi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit setelah itu sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.
7. Sediaan dituangi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.
8. Sediaan dituangi safranin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
9. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak imersi lalu dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 97-100x
10. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang teramati di bawah mikroskop berupa bakteri berbentuk batang dan berwarna merah. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* mengambil warna pembanding safranin yang berwarna merah sehingga termasuk dalam golongan bakteri Gram negatif.



**Gambar 4.1** Didapatkan Gambaran Batang (Basil) Berwana Merah (Bakteri Gram Negatif) pada Pengamatan Menggunakan Mikroskop Perbesaran Lensa Objektif 100x.

b. Tes Oksidase

Biakan pada MacConkey diambil satu ose, kemudian dilakukan tes oksidase. Prosedur tes oksidase adalah sebagai berikut.

1. Pada penelitian ini dilakukan tes oksidase metode kertas filter.
2. Kertas filter dibasahi dengan larutan reagen *tetramethyl p-phenylenediamine dichloride* 1%.
3. Bakteri yang diperiksa, digoreskan dengan nose platina/batang gelas pada kertas tersebut.
4. Tes positif apabila warna goresan tersebut menjadi ungu sampai hitam dalam waktu  $\frac{1}{2}$  - 1 menit.



**Gambar 4.2** Didapatkan Hasil Tes Oksidase Positif dengan Gambaran Warna Goresan Menjadi Ungu dalam Waktu 10 detik.

c. Kultur untuk Identifikasi Bakteri

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat diidentifikasi dengan melakukan kultur pada beberapa media, sebagai berikut.

1. Pada penelitian ini dilakukan tes identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* dengan melakukan streaking (penggoresan) bakteri pada medium *Mueller Hinton Agar* dan *MacConkey*.
2. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37° – 42°C selama 18-24 jam dan dilihat penampakan koloni bakteri pada medium.
3. Koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada medium *Mueller Hinton Agar* berwarna hijau karena memproduksi pigmen piosianin. Bakteri tetap tumbuh pada suhu 42°C.
4. Koloni *Pseudomonas aeruginosa* tidak memfermentasi laktosa sehingga tidak berwarna di medium *MacConkey*.



**Gambar 4.3** *Pseudomonas aeruginosa* berpigmen piosianin (Hijau) pada Penanaman di Media *Mueller Hinton Agar*.

d. Uji *Microbact System*

Uji *Microbact Sytem* menurut (Oxoid, 2015):

1. Melakukan tes oksidase terlebih dahulu menggunakan strip oksidase.

2. Tes oksidase digunakan untuk menentukan kit yang akan digunakan pada Uji *Microbact System*.
3. Uji oksidase dilakukan dengan cara mengambil koloni bakteri dari media *MacConkey* menggunakan tusuk gigi kemudian menggoreskannya pada strip oksidase. Tunggu 10 detik, amati perubahan yang terjadi.
4. Oksidase positif jika strip oksidase berubah warna menjadi ungu sampai kehitaman. Uji oksidase negatif jika strip oksidase tidak berubah warna.
5. Hasil tes oksidase pada *Pseudomonas aeruginosa* adalah positif, sehingga menggunakan *Microbact* test 12A/24E.
6. Masukkan 2,5 – 3 ml normal saline pada tabung reaksi steril.
7. Ambil 5-7 koloni homogen dari hasil kultur bakteri, masukkan dalam tabung berisi normal saline.
8. Campur menggunakan vortex.
9. Keluarkan strip *Microbact*. Tuliskan nomor spesimen pada bagian samping selotip.
10. Buka selotip pada baris yang akan digunakan dan masukkan 100 µl emulsi bakteri pada seluruh sumur, atau hingga separuh tinggi sumur.
11. Untuk membuat kondisi anaerob pada beberapa sumuran, tetesi sumuran tersebut dengan mineral oil. Sumuran yang harus ditetesi dengan mineral oil memiliki lingkaran warna hitam di pinggir sumuran. Tutup kembali selotip lalu inkubasi strip *Microbact* pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
12. Strip *Microbact* yang telah diinkubasi selama 18-24 jam dikeluarkan.

13. Tulis nomor spesimen pada lembar identifikasi *Microbact*.
14. Persiapkan *Microbact* Set D berisi : Reagent indole, Reagent VP I dan VP II, Reagent Nitrate A dan Nitrate B, Reagent TDA. Reagen tersebut akan ditambahkan pada sumuran sistem 12A.
15. Buka selotip dan teteskan reagen VP I dan VP II pada sumur 10 sistem 12A untuk dibaca 15 menit kemudian.
16. Berikan dua tetes reagen indole pada sumur 8 (indole) dan evaluasi dalam waktu kurang dari 2 menit.
17. Berikan satu tetes reagen TDA pada sumur 12 (TDA) dan langsung lakukan identifikasi.
18. Berikan satu tetes reagen nitrat A dan satu tetes reagen nitrat B pada sumur 7 (ONPG) setelah membaca hasil ONPG.
19. Amati perubahan pada sumur 10 (VP) pada 15 menit setelah langkah "n".
20. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *Microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada lembar identifikasi *Microbact*.
21. Jumlahkan angka setiap tiga reaksi pada lembar identifikasi *Microbact* sehingga didapatkan bilangan oktal dari bakteri tersebut.
22. Buka program *Microbact2000* pada komputer. Pada menu 'System', pilih jenis bakteri sesuai dengan yang diamati. Masukkan bilangan oktal yang didapat dan tuliskan hasil identifikasi dengan persentase tertinggi.
23. Buang kit yang telah digunakan untuk identifikasi.



$V_1$  = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

$N_2$  = *Optical Density* ( 0,1 setara  $10^8$  CFU/ml)

$V_2$  = volume suspensi bakteri uji ( 10ml)

Dari hasil perhitungan maka diperoleh volume bakteri (ml) yang akan ditambahi pengencer untuk mendapatkan konsentrasi  $10^8$  CFU/ml sebanyak 10 ml.

#### 4.8.2 Pembuatan Ekstrak Etanol kulit jeruk lemon

Pembuatan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) dalam beberapa tahap seperti berikut.

1. Kulit jeruk lemon dicuci bersih dengan air mengalir lalu digunting sampai membentuk bagian yang lebih kecil kemudian ditimbang sebanyak 1000 gram.
2. Kemudian dikeringkan selama 3 hari dengan suhu  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tanaman dikatakan sudah kering apabila bagian tanaman sudah hancur ketika diremas.
3. Kulit jeruk lemon yang telah kering kemudian ditimbang kembali dan dihaluskan dengan blender, diayak hingga mendapat simplisia.
4. Lalu letakan hasil simplisia ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter dan tuangkan etanol 96% sebanyak 800 ml untuk merendam simplisia, kemudian diamkan selama satu jam pada suhu ruang.
5. Massa dipindahkan ke dalam toples secara hati-hati kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 200 ml. Tutup toples dengan rapat selama 48 jam dan di *shaker* diatas *shaker* digital rpm 50.
6. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam Erlenmeyer.
7. Lakukan remaserasi pada ampas sebanyak satu kali dengan cara dimasukkan kembali ke dalam toples dan ditambahkan dengan pelarut

- sampai terendam ( minimal 5 cm diatas permukaan simplisia). Kemudian dibiarkan semalam atau 8 jam di atas *shaker*. Remaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 800 ml
8. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Diperlukan waktu 3 jam 30 menit untuk evaporasi.
  9. Ekstrak cair yang dihasilkan kemudian dievaporasi atau diuapkan kembali di atas waterbath selama 2 jam untuk menghilangkan etanol. Memastikan kandungan etanol masih terdapat pada ekstrak dengan cara memasukan ekstrak pada tisu, apabila menguap maka masih terdapat etanol.
  10. Setelah evaporasi selesai, ekstrak kemudian dioven kembali dengan suhu 80°C selama 2 jam. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa etanol 96% yang mungkin masih tersisa dalam ekstrak
  11. Hasil ekstraksi diletakkan dalam botol plastik atau kaca warna gelap lalu disimpan di dalam *freezer*.

#### 4.8.3 Uji Sensitivitas Antimikroba

Dalam menguji sensitivitas antimikroba ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* digunakan konsentrasi 25%, 35%, 45%, 55%, dan 65%. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) menggunakan metode difusi sumuran adalah sebagai berikut.

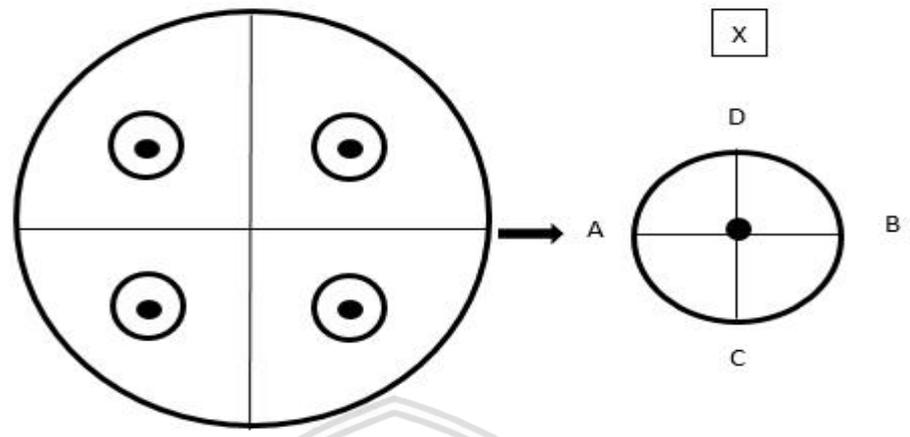
- a. Alat dan bahan disiapkan. Cawan petri sebanyak tujuh buah dengan rincian, satu untuk kontrol negatif (-), satu untuk kontrol positif (+) dan lima cawan petri lainnya diberikan tanda untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon yang akan dimasukkan.
- b. Suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* 10<sup>8</sup> CFU/ml dicampurkan dengan agar cair *Mueller Hinton* sebanyak 15 ml dalam cawan petri.

- c. Cawan petri digoyang-goyangkan sehingga campuran tercampur dengan baik, lalu diamkan beberapa saat hingga mengeras.
- d. Campuran agar *Mueller Hinton* dan suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*  $10^8$  CFU/ml dibagi empat dengan menggunakan penggaris.
- e. Lubang sumuran dibuat pada keempat sisi campuran agar *Mueller Hinton* dan suspense bakteri *Pseudomonas aeruginosa*  $10^8$  CFU/ml yang telah di bagi sebelumnya, dengan menggunakan pelubang sumuran
- f. Cawan petri pertama berisi 40 $\mu$ l akuades sebagai kontrol negatif, cawan petri kedua sampai ke enam berisi 40 $\mu$ l larutan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) dengan konsentrasi 25%, 35%, 45%, 55%, dan 65%. Dan cawan petri ketujuh berisi 40  $\mu$ l siprofloksasin sebagai kontrol positif.
- g. Cawan petri dimasukkan ke dalam incubator selama 18-24 jam dengan suhu 37°C.

Mengukur diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm).

#### 4.8.4 Pengamatan dan Pengukuran

. Zona inhibisi yang dihasilkan mempunyai bentuk lingkaran dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 satuan milimeter (mm). Pengukuran diameter zona inhibisi dilakukan sebanyak 4 kali (arah vertikal, horizontal dan dua arah diagonal) dan dihitung rata-ratanya. Diameter diukur dari batas terluar dari zona inhibisi dari satu sisi ke sisi lainnya.

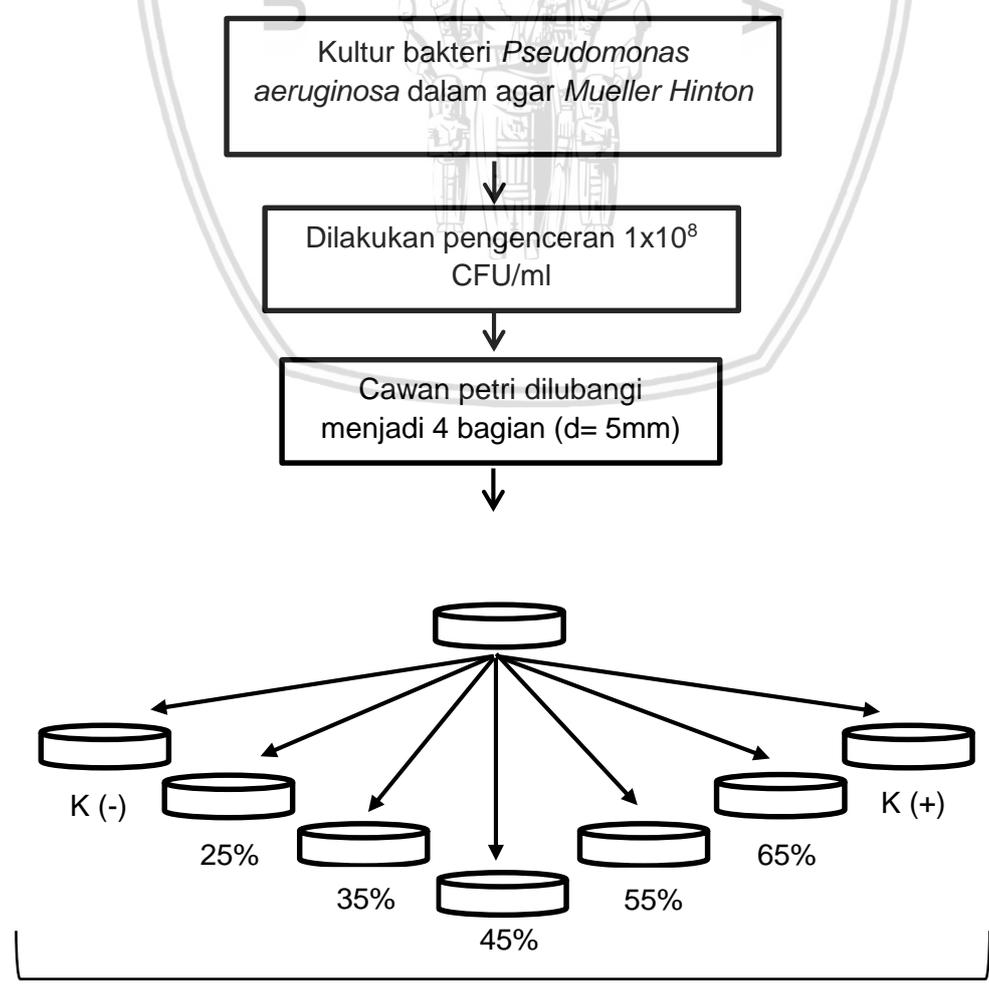


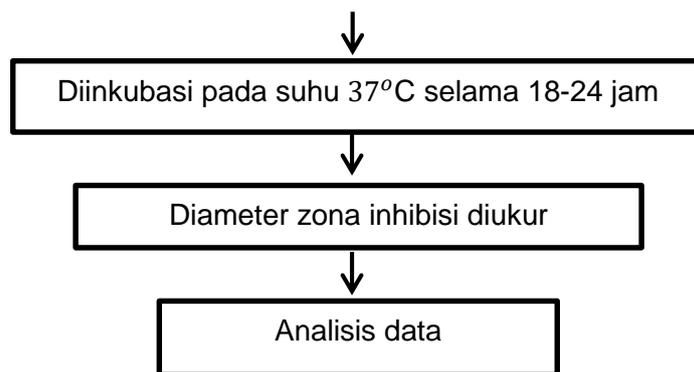
$$X = (A+B+C+D)/4$$

X = Diameter zona inhibisi

Gambar 4.5 Cara Pengukuran Diameter Zona Inhibisi.

#### 4.8.5 Skema Prosedur Penelitian





Gambar 4.6 Skema alur uji antimikroba ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 4.9 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) untuk windows versi 17 (Dahlan, 2008).

Adapun langkah-langkah pengujian sebagai berikut.

1. Uji normalitas data dengan menggunakan *Kolmogorov Smimov test* untuk menguji apakah data tersebar normal (parametik) atau tidak tersebar normal (non parametik).
2. Uji komparasi dilakukan dengan cara *One-Way ANOVA* > 2 kelompok untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*, dengan syarat:
  - a. Sebaran data harus normal
  - b. Varian data harus sama (homogen)

Namun jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal, maka digunakan metode *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan ukuran zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran pada

setiap perlakuan yang disebabkan oleh pemberian ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*)

3. Uji *Post Hoc Tukey* dilakukan untuk mengetahui pasangan kelompok sampel yang memberikan perbedaan yang signifikan.
4. Uji Korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variable dependen dan variable independen. Jika data parametrik maka digunakan Uji Korelasi *Pearson*, sedangkan data non parametrik akan diuji dengan Uji Korelasi *Spearman*. Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan konsentrasi pemberian ekstrak kulit jeruk lemon dan potensinya.

Uji Regresi dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui bagaimana besaran potensi ekstrak kulit jeruk lemon terhadap zona inhibisi pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 4.10 Jadwal Kegiatan

No	Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
<b>Tahap Persiapan</b>														
1.	Mengurus perijinan penelitian	■												
2.	Mengurus perijinan laboratorium	■												
3.	Belanja alat dan bahan penelitian	■												
4.	Membuat ekstrak etanol kulit jeruk lemon	■	■											
5.	Membiakkan bakteri	■	■											
<b>Tahap Pelaksanaan</b>														
1.	Melaksanakan penelitian pendahuluan			■										
2.	Uji identifikasi bakteri			■	■									
3.	Pembuatan sumuran pada cawan patri			■	■	■								
4.	Induksi kontrol negatif, perlakuan, dan positif					■								
5.	Pengamatan zona inhibisi					■	■							
<b>Tahap Penyelesaian</b>														
1.	Analisis data									■	■			
2.	Penyusunan Laporan akhir									■	■			



## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Penelitian

##### 5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri

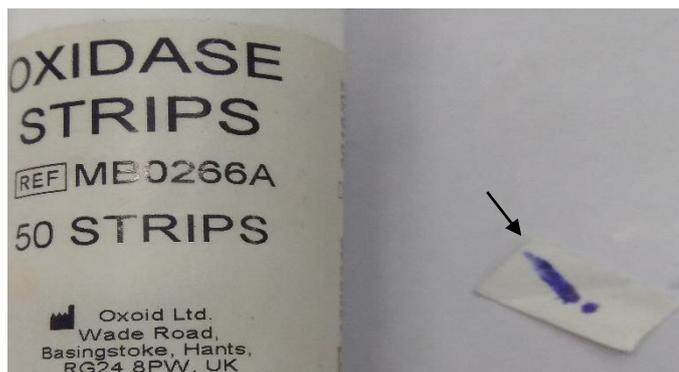
Isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* didapatkan dari biakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum bakteri digunakan, dilakukan uji identifikasi terlebih dahulu berupa pewarnaan Gram, kultur bakteri dengan menggunakan media *MacConkey* dan *Mueller Hinton Agar*, tes Oksidase, dan *Microbact*.

Hasil dari pewarnaan Gram dan setelah diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran lensa objektif 100x didapatkan gambaran dengan bentuk batang (basil) berwarna merah, yang merupakan ciri dari bakteri Gram negative.



**Gambar 5.1** Didapatkan Gambaran Batang (Basil) Berwana Merah (Bakteri Gram Negatif) pada Pengamatan Menggunakan Mikroskop Perbesaran Lensa Objektif 100x.

Tes oksidase didapatkan hasil oksidase positif pada bakteri yang diuji. Dibuktikan dengan gambaran goresan menjadi warna ungu dalam waktu 10 detik.



**Gambar 5.2** Didapatkan Hasil Tes Oksidase Positif dengan Gambaran Warna Goresan Menjadi Ungu dalam Waktu 10 detik.

Kultur bakteri dengan penanaman pada media *Mueller Hinton Agar* didapatkan hasil berupa gambaran koloni bakteri berwarna hijau, karena bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memproduksi pigmen piosianin.

Didapatkan Gambaran Khas Bakteri



**Gambar 5.3** *Pseudomonas aeruginosa* berpigmen piosianin (Hijau) pada Penanaman di Media *Mueller Hinton Agar*.

Hasil dari uji reaksi biokimia menggunakan Microbact 12A/E-24E yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dapat dilihat pada gambar di bawah. Setelah dilakukan uji biokimia, hasil reaksi yang didapat kemudian dijumlahkan sesuai ketentuan pada tabel. Selanjutnya jumlahnya dikonversikan pada *database* dan didapatkan hasil bakteri yang diuji merupakan *Pseudomonas aeruginosa*.

Hasil dari uji reaksi biokimia menggunakan Microbact 12A/E-24E yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,

dapat dilihat pada gambar di bawah. Setelah dilakukan uji biokimia, hasil reaksi yang didapat kemudian dijumlahkan sesuai ketentuan pada tabel. Selanjutnya jumlahnya dikonversikan pada *database* dan didapatkan hasil bakteri yang diuji merupakan *Pseudomonas aeruginosa*.

MICROBACT™		MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E																											
IDENTIFICATION KITS		GNB 24E											GNB 12B																
		Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine	
Result / Risultato / Ergebnis / Résultat / Risultato / Resultat / Amendakapan		-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Sum / Sume / Summe / Somme / Somma / Summa / Somme / Somma / Altopap		4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
Identification / Identificación / Identifikation / Identificación / Identificazione / Identificación / Identifizierung / Identificação / Tautomaizacija		Ps. aeruginosa 98,33%																											

**Gambar 5.4** Didapatkan Hasil Pada Uji Microbact 12A/E-24E Bahwa Bakteri yang Digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa*.

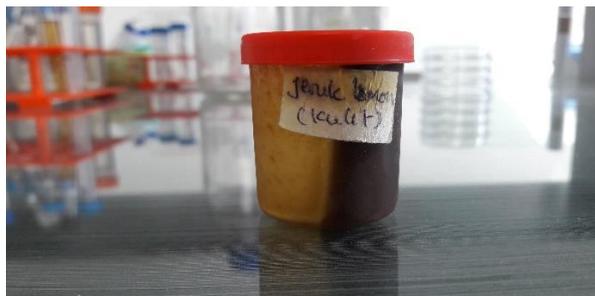
Keterangan:

- a: *Lysine* (+) berwarna biru dengan nilai 4
- b: *Ornithine* (+) berwarna biru dengan nilai 2
- c: *H<sub>2</sub>S* (-) berwarna kekuningan dengan nilai 1
- d: *Glucose* (+) berwarna biru dengan nilai 4
- e: *Mannitol* (-) berwarna biru dengan nilai 2
- f: *Xylose* (+) berwarna biru dengan nilai 1
- g: *ONPG* (-) berwarna kuning dengan nilai 4
- h: *Indole* (-) berwarna pink dengan nilai 2
- i: *Urease* (-) berwarna kekuningan dengan nilai 1
- j: *V-P* (+) berwarna kekuningan dengan nilai 4
- k: *Citrate* (+) berwarna biru dengan nilai 2
- l: *TDA* (-) berwarna merah *cherry* dengan nilai 1

**5.1.2 Hasil Ekstrak Etanol Kulit jeruk lemon**

Ekstrak kulit jeruk lemon dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebanyak 200 gram menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.





**Gambar 5.5 Ekstrak Kulit Jeruk Lemon**

Keterangan: Tabung menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk lemon berwarna coklat keruh dengan konsistensi kental.

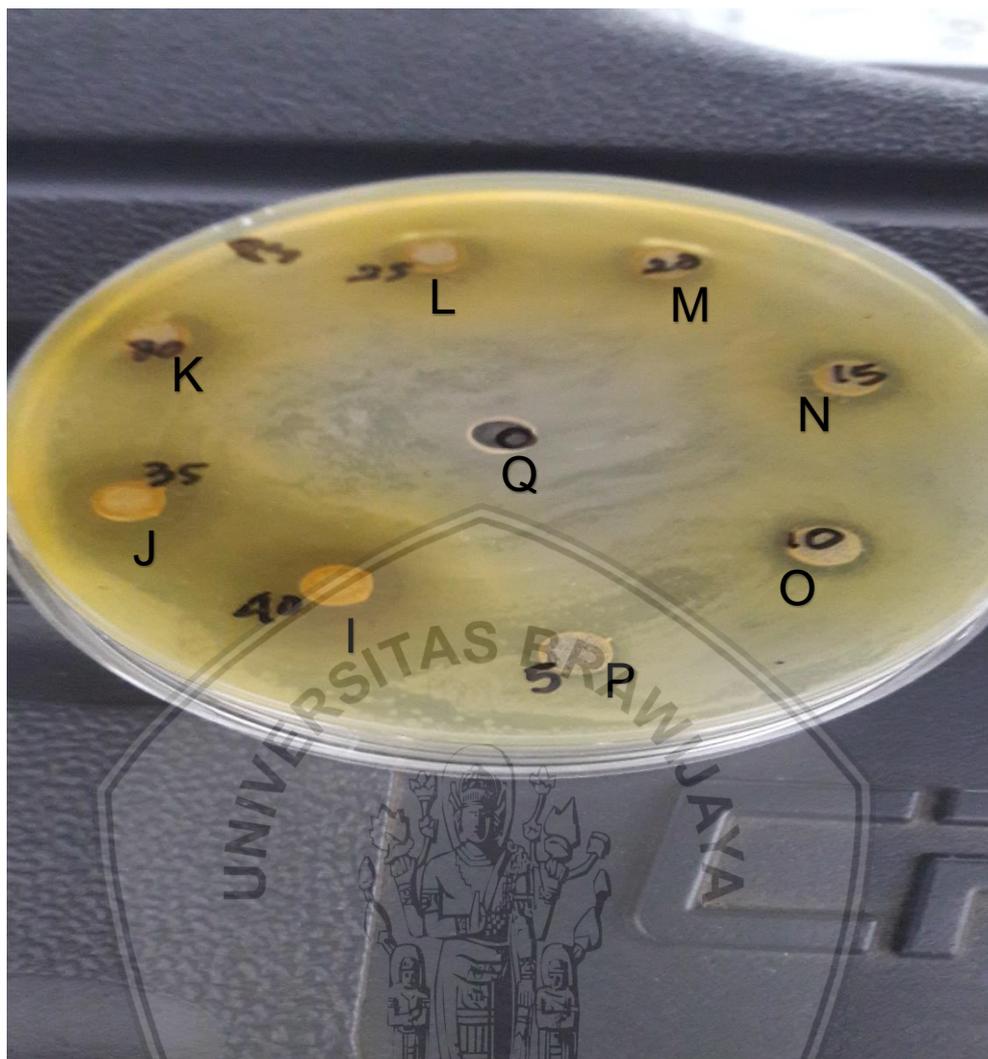
### 5.1.3 Hasil Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon yang akan digunakan pada penelitian Difusi Sumuran yaitu 70%, 65%, 55%, 45%, 35%, 25%, 0%. Daya antibakteri ditandai adanya zona hambat pertumbuhan bakteri di sekeliling sumuran. Penelitian pendahuluan menghasilkan zona hambat di seluruh konsentrasi tersebut, kecuali 0% (aquades). Hasil ini dapat diamati pada gambar 5.6. Selanjutnya untuk penelitian inti digunakan konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon 65%, 55%, 45%, 35%, 25%, 0%.

### 5.1.4 Hasil Difusi Sumuran

Pada penelitian ini Penentuan zona hambat menggunakan Difusi Sumuran, pada penelitian ini dilakukan dengan mengamati terbentuknya zona hambat pertumbuhan bakteri yang ada disekeliling sumuran, Penelitian ini tidak dapat menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM), karena ekstrak berwarna gelap, keruh dan kental. Zona hambat yang dihasilkan mempunyai bentuk lingkaran dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,1 mm. Konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon yang digunakan adalah 65%, 55%, 45%, 35%, 25%, dan 0%. Hasil Difusi Sumuran dapat diamati pada Gambar 5.7.

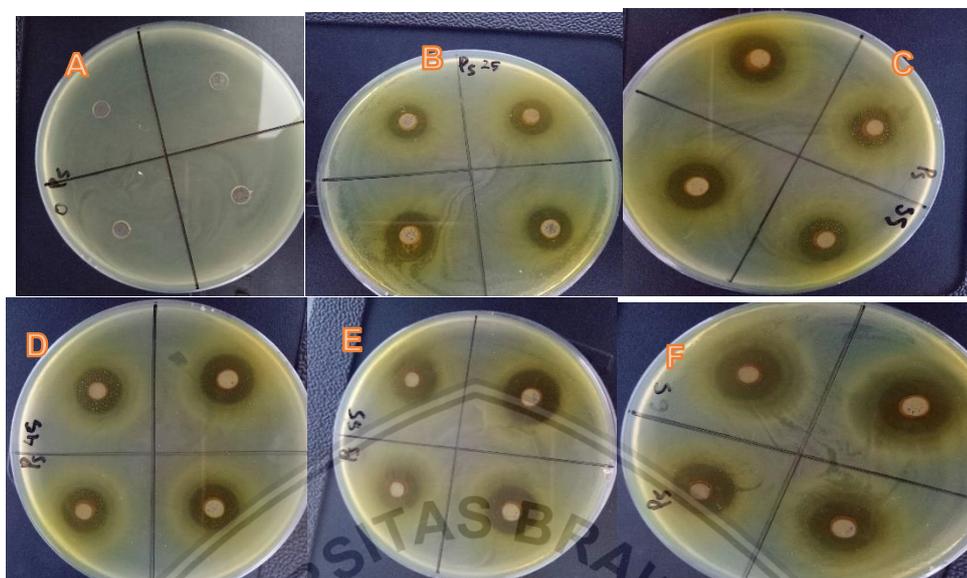




**Gambar 5.6 Hasil Penelitian Pendahuluan Menggunakan Metode Difusi Sumuran**

Keterangan gambar :

- a: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 80% dengan rerata zona hambat 15 mm
- b: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 75% dengan rerata zona hambat 15 mm
- c: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 70% dengan rerata zona hambat 15 mm
- d: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 65% dengan rerata zona hambat 15 mm
- e: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 60% dengan rerata zona hambat 14 mm
- f: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 55% dengan rerata zona hambat 14 mm
- g: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 50% dengan rerata zona hambat 11 mm
- h: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 45% dengan rerata zona hambat 11 mm
- i: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 40% dengan rerata zona hambat 10 mm
- j: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 35% dengan rerata zona hambat 10 mm
- k: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 30% dengan rerata zona hambat 10 mm
- l: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 25% dengan rerata zona hambat 10 mm
- m: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 20% dengan rerata zona hambat 9 mm
- n: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 15% dengan rerata zona hambat 9 mm
- o: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 10% dengan rerata zona hambat 7 mm
- p: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 5% dengan rerata zona hambat 6 mm
- q: Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 0% dengan rerata zona hambat 6 mm



**Gambar 5.7 Hasil Difusi Sumuran Konsentrasi Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Lemon 65%, 55%, 45%, 35%, 25%, dan 0%**

**Keterangan Gambar**

- A : Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 0% dengan rerata zona hambat 6 mm
- B : Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 25% dengan rerata zona hambat 11 mm
- C : Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 35% dengan rerata zona hambat 12 mm
- D : Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 45% dengan rerata zona hambat 13 mm
- E : Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 55% dengan rerata zona hambat 14 mm
- F : Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon 65% dengan rerata zona hambat 15 mm

Gambar 5.7 menunjukkan adanya variasi ukuran diameter besar zona hambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi selama 18-24 jam. Secara umum, terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit jeruk lemon maka semakin besar zona hambat yang terbentuk.

**5.1.5 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri**

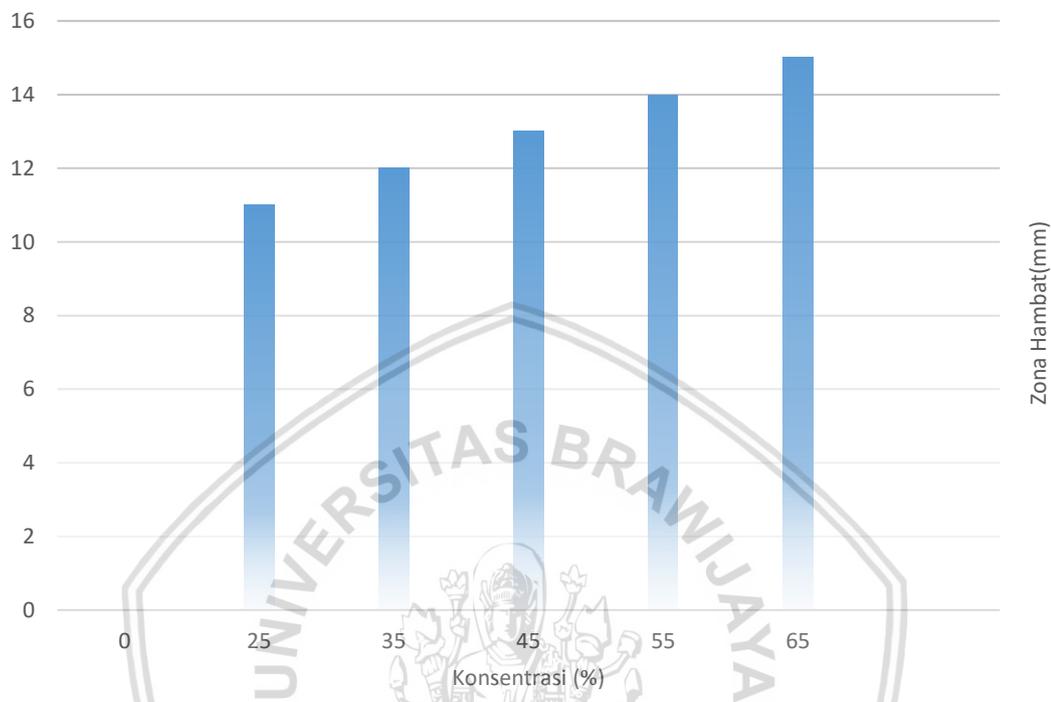
Penelitian ini dilakukan dengan berbagai macam konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon yang digunakan adalah 65, 55%, 45%, 35%, 25%, dan 0%. Penentuan pemberian ekstrak etanol kulit jeruk lemon terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan dengan metode Difusi Sumuran. Perbedaan daya

antibakteri ditentukan dengan besar diameter zona hambat pertumbuhan bakteri yang terbentuk pada medium MHA (*Mueller Hilton Agar*) yang telah dilubangi dan diisi dengan ekstrak kulit jeruk lemon sesuai dengan konsentrasi tersebut dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi memiliki rata-rata diameter yang berbeda-beda. Semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk, maka semakin besar daya antibakterinya. Berdasarkan hasil uji Difusi Sumuran dapat diukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dan dapat ditentukan besar zona hambat pada masing-masing konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil perhitungan zona hambat Ekstrak Kulit Jeruk Lemon disajikan dalam Tabel 5.1. j

**Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa***

Konsentrasi (%)	Zona Hambatan Ekstrak Kulit Jeruk Lemon (mm)				Rerata (mm)
	I	II	III	IV	
0%	0	0	0	0	0
25%	11,15	11,2	11,17	11,2	11
35%	12,06	12,10	12,26	12,26	12
45%	13,24	13,54	13,28	13,4	13
55%	14,24	14,4	14,28	14,32	14
65%	15,17	15,18	15,17	15,18	15



**Gambar 5.8 Grafik Rerata Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada Ekstrak etanol kulit jeruk lemon**

Berdasarkan Tabel 5.1 dan Gambar 5.8 di atas dapat dilihat adanya perbedaan rerata diameter zona hambat yang menunjukkan adanya perbedaan daya antibakteri masing-masing perlakuan. Kelompok kontrol akuades tidak menunjukkan adanya daya antibakteri. Kelompok perlakuan 65 % menunjukkan zona hambatan yang terbesar dengan rerata mm. Ekstrak Kulit Jeruk Lemon dengan konsentrasi 65%, 55%, 45%, 35%, 25% menghasilkan zona hambatan yang menunjukkan bahwa ekstrak kulit jeruk lemon dengan konsentrasi tersebut memiliki daya antibakteri untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dalam kategori sedang yaitu 11-15 mm (Susanto dkk, 2012).

## 5.2 Analisis Data

Yang dilakukan pertama kali dalam analisis data yaitu melakukan uji normalitas dengan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov Test* untuk mengetahui apakah data sampel penelitian berasal dari populasi yang berdistribusi normal (parametrik) atau tidak normal (non parametrik) . Hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikansi 0.008 ( $p < 0.05$ ) dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi tidak normal (non-parametrik). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas varian dengan tujuan untuk mengetahui bahwa dua kelompok atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki variasi yang sama. Hasil uji homogenitas varian dengan *Levene Test Homogeneity of Variance* didapatkan nilai signifikansi 0.048 ( $p > 0.05$ ) dapat disimpulkan bahwa variasi tiap sampel tidak sama atau tidak homogen.

Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa sampel berdistribusi tidak normal dan memiliki variasi homogen sehingga dapat dilakukan uji statistic non parametrik yaitu *Kruskal-Wallis Test*. Untuk mengetahui adanya perbedaan pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon terhadap rerata diameter zona inhibisi. Hasil *Kruskal-Wallis Test* didapatkan nilai signifikansi sebesar 0.000 ( $p < 0.5$ ) dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh secara signifikan efek perubahan konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Setelah dilakukan *Kruskal-Wallis Test*, dilakukan uji *Post Hoc Tukey Test* untuk dapat mengetahui perbandingan dua sampel (antara kelompok konsentrasi dan kelompok kontrol, serta antar kelompok konsentrasi). Hasil uji *Post Hoc Tukey Test* didapatkan perbedaan signifikan pada semua sampel ( $p < 0.05$ ).

Uji korelasi *Pearson* dilakukan dengan tujuan mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak kulit jeruk lemon dengan beberapa konsentrasi terhadap zona inhibisi yang diamati dengan mengukur diameter disekitar lubang sumuran. Hasil uji korelasi *Spearman* diperoleh angka signifikansi antara dua variabel yaitu 0.000 ( $p < 0.05$ ) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara pemberian ekstrak etanol kulit

jeruk lemon terhadap diameter zona inhibisi. Serta didapatkan koefisien korelasi antara pemberian ekstrak etanol kulit jeruk lemon terhadap zona inhibisi sebesar 0.989. Dari hasil angka yang didapat merupakan bilangan positif, maka hal ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon maka semakin besar diameter zona inhibisi yang terbentuk.

Uji regresi dilakukan dengan tujuan mengetahui bagaimana besaran potensi ekstrak etanol kulit jeruk lemon terhadap zona inhibisi pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hubungan antara kenaikan konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon terhadap besarnya zona inhibisi dapat dinyatakan dengan rumus  $Y = a + bX$ . Y adalah interval zona inhibisi dan X adalah konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon. Angka koefisien dari a dan b didapat didalam uji regresi a sebesar 2.392 dan b sebesar 2.481. Apabila data ini dimasukkan pada rumus  $Y = 2,392 + (2,481 \times 0.1)$ , maka didapatkan hasil 2,6401. Berdasarkan nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa tiap penambahan konsentrasi ekstrak jeruk lemon sebanyak 10% akan menaikkan nilai interval zona inhibisi sebesar 2,6401. Nilai 2,6401 sebagai korelasi regresi menunjukkan bahwa tiap kenaikan konsentrasi ekstrak 10% akan menaikkan zona hambat sebesar 2,6401. Hal ini dapat disimpulkan bahwa hubungan konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon terhadap pembentukan zona inhibisi yang terbentuk adalah positif, yang dapat diartikan semakin besar konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon maka semakin besar pula zona inhibisi yang terbentuk disekitar lubang sumuran.



## BAB VI

### PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan potensi antimikroba ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*. Metode didalam penelitian ini menggunakan difusi sumuran. Metode ini digunakan untuk mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Metode ini tidak dapat digunakan untuk menilai Kadar Bunuh Minimum (KBM). Pada penelitian ini, KHM tidak dapat diukur dengan menggunakan metode dilusi tabung karena ekstrak terlalu keruh pada konsentrasi tinggi maupun rendah sehingga mempersulit penilaian secara visual pada metode dilusi tabung. Penentuan KHM pada metode difusi sumuran dilakukan secara visual dengan melihat langsung ada atau tidaknya pertumbuhan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada media agar dengan campuran berbagai konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) setelah diinkubasi di inkubator dengan suhu 37° – 42°C selama 18-24 jam. Penilaian visual pada metod difusi sumuran dilakukan oleh tiga pengamat, yaitu oleh peneliti sendiri, analis yang membantu peneliti, dan pengamat non-peneliti dan non-analisis, untuk mengurangi terjadinya bias dalam penilaian. Penentuan KHM pada penelitian ini digunakan sebagai dasar untuk menentukan dosis efektif jika dilanjutkan ke tahap pembuatan antimikroba baru.

Isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pada awal penelitian, terlebih dahulu dilakukan identifikasi bakteri untuk membuktikan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang akan digunakan adalah bakteri yang sesuai. Identifikasi bakteri dilakukan dengan melakukan pewarnaan Gram, tes oksidase, kultur untuk identifikasi bakteri pada media *MacConkey Agar* dan *Mueller Hinton Agar (MHA)*, uji *Microbact System*, serta pembuatan pembedihan cair bakteri kepadatan 10<sup>8</sup> CFU/ml. Identifikasi bakteri

*Pseudomonas aeruginosa* terbukti valid karena koloni bakteri tumbuh dengan bewarna hijau karena memproduksi pigmen piosianin (hijau). Bakteri tetap tumbuh pada suhu 42°C. Selain itu, pada pewarnaan Gram didapatkan bakteri berbentuk batang berwarna merah (basil, Gram negatif).

Senyawa-senyawa aktif pada ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) didapatkan melalui proses ekstraksi dengan metode maserasi dari 1000 gram jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) dan menggunakan pelarut etanol 96%. Metode maserasi dipilih karena cara ini mudah, relatif murah, tidak perlu pemanasan sehingga kecil kemungkinan bahan alam menjadi rusak atau terurai (Susanty dan Bachmid, 2016). Pelarut yang digunakan adalah pelarut etanol karena etanol adalah pelarut yang bersifat universal yang dapat menarik senyawa polar, non-polar dan semi-polar. Pemilihan pelarut etanol 96% sebagai pelarut ekstraksi karena memiliki kelarutan yang tinggi dan tidak memiliki efek hambat pada bakteri. Pelarut etanol 96% digunakan untuk melarutkan senyawa-senyawa yang diperlukan, seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, serta senyawa-senyawa lain yang tidak memiliki efek antimikroba (Febrina, 2014). Hasil akhir ekstrak yang diperoleh berupa cairan pekat dan kental sebanyak 35 ml berwarna coklat tua, mengandung banyak jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*). Hasil ini dianggap sebagai ekstrak dengan konsentrasi 100%. Konsentrasi ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) yang digunakan pada penelitian inti adalah 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, dan 0% sebagai bakteri kontrol, dimana konsentrasi ini didapatkan melalui penelitian pendahuluan terlebih dahulu.

Jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) yang didapatkan bersifat keruh terhadap endapan, kemudian untuk dapat memisahkan cairan dan endapannya dilakukan proses sentrifugasi dengan kecepatan 50 rpm selama 48 jam. Setelah dilakukan proses sentrifugasi, ekstrak yang didapatkan tetap keruh dan masih terdapat endapan, sehingga penelitian tidak dapat dilakukan dengan menggunakan metode dilusi tabung. Karena tidak dapat menggunakan metode dilusi tabung, maka peneliti menggunakan metode difusi sumuran untuk membuktikan

bahwa ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Metode difusi sumuran dilakukan dengan cara mencampurkan *Nutrient Broth* dengan ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) sebagai satu kesatuan padat yang mengeras. Kemudian, untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) pada penelitian ini, peneliti mengamati ada atau tidaknya koloni bakteri yang tumbuh pada media agar yang telah ditetesi oleh bakteri uji  $10^8$  CFU/ml bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan telah diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 18-24 jam. Penentuan nilai KHM dari ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) pada penelitian ini didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dimana tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian ini dilakukan dengan empat kali pengulangan. Hasil dari penelitian ini diinterpretasikan dengan sistem skoring melalui pengamatan dan pengukuran di sekitar lubang sumuran dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan millimeter (mm) secara visual dengan melibatkan 3 pengamat untuk menilai ketebalan dan kejelasan koloni dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara subyektif. Dari hasil pengamatan pada pengulangan 1, 2, 3, dan 4 di konsentrasi 65% menunjukkan zona hambatan yang terbesar dengan rerata mm. Hasil rata-rata tingkat ketebalan dan kejelasan koloni dari konsentrasi 0%, 25%, 35%, 45%, 55%, 65% saling dibandingkan dan menunjukkan adanya perbedaan rata-rata tingkat ketebalan dan kejelasan dari koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Tingkat ketebalan dan kejelasan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* semakin besar zona hambat yang terbentuk seiring dengan peningkatan konsentrasi dari ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*)

Efek hambat ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diduga kuat diperankan oleh Flavonoid, dan Tanin (Sutriningsih, 2005). Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai zat antibakteri adalah satu anti bakteri yang bekerja dengan mengganggu fungsi membran sitoplasma. Sebagai zat antibakteri, flavonoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan merusak dinding sel dan membran sitoplasma bakteri serta mencegah pembelahan bakteri sehingga menyebabkan

bakteri tidak dapat berkembang biak (Robinson, 1995). Sedangkan Tanin adalah penghambat pertumbuhan bakteri yang baik karena memiliki senyawa asam tanic. Tanin, sebagai antibakteri, bekerja dengan merubah susunan ikatan hidrogen dan membentuk kompleks dengan nitrogen dari asam amino pada sel bakteri sehingga kehilangan aktivitas vitalnya. Selain itu, tanin juga bekerja dengan melarutkan lapisan lipid dinding bakteri sehingga menyebabkan kebocoran sel (Bylka *et al.* , 2004).

Penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat efek antimikroba pada setiap pemberian berbagai macam konsentrasi ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini sesuai dengan uji *Kruskal-Wallis Test* yang memiliki nilai probabilitas  $< 0.05$ . Selain itu, efek antimikroba dari ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) menunjukkan ada perbedaan pada diameter rata-rata pertumbuhan konsentrasi tiap koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang signifikan antara dua konsentrasi ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) yang dibuktikan dengan uji *Post Hoc Tukey* yang mempunyai nilai probabilitas  $< 0.05$ . Tetapi, jika perbedaan diameter rata-rata pertumbuhan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* antara dua konsentrasi ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) memiliki nilai probabilitas  $> 0.05$  maka bisa dikatakan perbedaan tidak signifikan atau tidak jauh berbeda. Pada penelitian ini juga memiliki hubungan yang signifikan pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang dapat dibuktikan dengan uji korelasi *Spearman* dengan nilai probabilitas  $< 0.05$ . Koefisien korelasi yang bernilai positif mempunyai arti semakin tinggi ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) yang digunakan maka semakin tinggi pertumbuhan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Selain itu, pada penelitian ini juga dapat mengetahui besar pengaruh dari konsentrasi ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap rata-rata diameter pada zona hambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang dibuktikan dengan uji regresi yang mempunyai nilai R Square 0,683 yang berarti konsentrasi ekstrak

etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) memberi pengaruh sebesar 5% terhadap rata-rata diameter pertumbuhan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ketika diberi perlakuan 6 konsentrasi.

### 6.1 Keterbatasan Peneliti

Penelitian ini masih memiliki keterbatasan. Komponen-komponen aktif yang terkandung pada ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) yang berperan lebih banyak dalam penelitian ini masih belum diketahui secara pasti. Penilaian pada penelitian ini menggunakan penilaian subyektif dari masing-masing pengamat, maka dapat terjadi perbedaan penilaian dari tingkat ketebalan pertumbuhan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada masing-masing konsentrasi antara pengamat satu dengan pengamat yang lain. Selain itu, cahaya serta warna ekstrak yang berwarna coklat tua juga dapat menyebabkan perbedaan interpretasi terhadap ketebalan pertumbuhan koloni bakteri ini. Lama penyimpanan ekstrak mungkin juga dapat menyebabkan penurunan atau peningkatan potensi antimikroba dari suatu ekstrak dengan bahan alam.

Keterbatasan lainnya dari penelitian ini adalah penelitian ini hanya menggunakan satu metode yaitu metode difusi sumuran yang hanya dapat melihat KHM saja. Penelitian ini tidak dapat menggunakan metode dilusi tabung karena ekstrak yang keruh sehingga mempersulit penilaian secara visual. Untuk penelitian-penelitian selanjutnya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi antimikroba ekstrak etanol jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan metode lainnya selain metode difusi sumuran. Selain itu, pada penelitian ini hanya digunakan satu *Pseudomonas aeruginosa*.

## BAB VII

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa :

- a) Ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) memiliki potensi antimikroba terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.
- b) Semakin tinggi tingkat konsentrasi ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limon burm f.*) yang digunakan, maka semakin besar diameter zona inhibisi yang terbentuk disekitar lubang sumuran

#### 7.2 Saran

Adapun saran yang dapat diberikan pada penelitian ini adalah :

- a) Perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut tentang ekstrak kulit jeruk lemon sebagai antimikroba terhadap bakteri lainnya.
- b) Perlu dilakukan penelitian dengan ekstrak yang berbeda pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
- c) Perlu dilakukan penelitian lain baik dengan uji *In vivo* atau *In vitro* untuk dapat mengetahui dosis efektif, toksisitas, dan efek samping yang dapat disebabkan oleh pemberian ekstrak etanol kulit jeruk lemon sebelum digunakan sebagai alternatif pengobatan terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* selain menggunakan metode sumuran.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ain, N. (2010). Daya Antibakteri Ekstrak Teripang Laut (*Holothuria atra*) Terhadap Kuman Penyebab Infeksi Nasokomial pada Luka Operasi. Skripsi. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Hal. 1- 3.
- Armandani, Reviandy Achmad. 2017. Potensi Antimikroba Ekstrak Etanol Akar Gantung Beringin (*Ficus benjamina*) terhadap Bakteri *Pseudomonas Aeruginosa* secara *In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Balows A, Hausler W J, Herrmann K L, Isenberg H D, Shadomy H J. 1991. Manual of clinical microbiology, 5<sup>th</sup> Edition, American Society for Microbiology, Washington DC: 429-30,431,439.
- Boel, Trelia, 2004, *Pseudomonas aeruginosa*, <http://library.usu.ac.id>
- Bylka W., M. Szauffer-Hajdrych, I. Matlawska, O. Goslinska. 2004. Antimicrobial Activity of Isocytiside and Extracts of *Aquilegia vulgaris* L. Letters in Applied Microbiology. 39. 93- 97. Foca M, et al. September 7, 2000. Endemic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Neonatal Intensive Care Unit, N Engl J Med, Vol.343.
- Dahlan S. 2008. Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan. Jakarta: Salemba Medika.
- Depkes RI. 2000, Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 9-11,16.
- Goodman & Gilman, 2008, Dasar Farmakologi Terapi, Volume 2, diterjemahkan oleh Tim Alih Bahasa Sekolah Farmasi ITB, 1126, 1133, 1137, Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Gould, D. & Brooker, C., 2003, Mikrobiologi Terapan Untuk Perawat, Cetakan Pertama, hal 212, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Ikonne, E. U. & Odozor, P. J., 2009, Comparative Efficacy of Topical Ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aureginosa* In Vitro, JNOA, 15 (8-15).



- Jawetz E, Melnick, Adelberg. 2003. Medical Microbiology, 22<sup>nd</sup> Edition, McGraw-Hill Companies USA : 229-31.
- Jawetz, 1996, Mikrobiologi Kedokteran, EGC, Jakarta
- Kusmiyati, agustini N. 2007. Aktifitas Senyawa Antibakteri Dari Mikroalga *Porphydium cruentum*. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu pengetahuan Indonesia (LIPI) Vol 8, No 1, Hal: 48-53
- Levinson W, Jawetz E. 2003. Medical Microbiology & Immunology: Examination & Board Review, 7<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill Companies USA: 130-31.
- Madigan M T, Martinko J M, Parker J.2003. Brock Biology of Microorganisms, 10<sup>th</sup> Edition, Southern Illinois University Carbondale, Pearson Education, Inc. Upper Saddle River, NJ: 370, 633-37, 673, 745.
- Nazhifah, Rustini, & Deswinar, D. 2013. Uji sensitivitas isolat bakteri dari pasien luka bakar di bangsal luka bakar RSUP DR. M. Djamil Padang. Prosiding Seminar Nasional Perkembangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik II, 212-220.
- Ngaisah, S. 2012. Identifikasi dan Uji Aktifitas Bakteri Minyak Atsiri Daun Sirih Merah ( *Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Asal Magelang. Tugas akhir. Tidak diterbitkan. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.
- Radji, M., 2011, Buku Ajar Mikrobiologi: Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran, 68-69, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Penerbit Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Salyers A A, Whit D D. 1994. Bacterial pathogenesis:a molecular approach, American Society for Microbiology, Washington DC: 265, 28.
- Shabrina, Linati. 2017. Uji Efek Antimikroba Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Acinetobacter baumannii* secara *In Vitro*. Tugas Akhir, Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang
- Sjahjadi, N.R., Rasyid, R., Rustam, E., & Restusari, L. 2014. Prevalensi Kuman Multi Drug Resistance (MDR) di Laboratorium Mikrobiologi RSUP Dr. M.

Djamil Padang Periode Januari 2010 - Desember 2012. *Jurnal Kesehatan Andalas*.3, 3.

Soleha TU (2015). Uji kepekaan terhadap antibiotik. *Juke Unila*, 5(9): 119-120.

Solimun. 2001. *Structural Equation Modelling dan LISREL*. Malang: FMIPA Universitas Brawijaya.

Srinivasan A, et al. January 16, 2003. An Outbreak *Pseudomonas aeruginosa* Infections Associated with Flexible Bronchoscopes, *N Eng J Med*, Vol.348.

Susanty, Bachmid, F. 2016. *Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Refluks terhadap Kadar Fenolik dari Ekstrak Tongkol Jagung (Zea mays L.)*. *KONVERSI* Vol. 5 No. 2, p. 87-93.

Tambayong, J., 2002, *Farmakologi Untuk Keperawatan*, 143, Jakarta, Widya Medika.

Timmreck, T.C. 2005, *Epidemiologi Suatu Pengantar*, Edisi 2, diterjemahkan oleh Fauziah, M., Apriningsih, Widyastuti, P., Sugiarti, M., & Ratnawati, 28, 33, *Kedokteran EGC*, Jakarta.

Todar K. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*, University of wiconsin – Madison Department of Bacteriology. Available from [URL:http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html](http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html)

Utji R. *Microbiology Aspect of Infection in Intensive Care Unit*, 2<sup>nd</sup> Symposium of Indonesia Antimicrobial Resistance Watch ( IARW) in Conjunction with PIT PAMKI, Jakarta 2-3 July 2005.

Volk, W. A dan M. F Wheeler. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Alih Bahasa: Markham. Edisi ke-5. Jilid 1. Erlangga. Jakarta.

Wibowo, A., 2012. Minyak Atsiri dari Daun Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Sebagai Insektisida Alami Melalui Metode Hidrodestilasi. *Jurnal Sains dan Seni*.

Widyaanita, H. 2006. Daya Antibakteri Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L) yang Diekstraksi Dengan Etanol dan Yang Diekstraksi dengan Air Terhadap *Aeromonas hydrophila* Secara In Vitro. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.