

**UJI EFEKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK KULIT BUAH JERUK
NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP BAKTERI *Streptococcus
pyogenes* SECARA *In Vitro***

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum



Oleh :

USWAH HASANAH

145070107111059

**PROGRAM STUDI S1 KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

Uji Efektivitas Antimikroba Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Terhadap Bakteri *Streptococcus pyogenes* Secara *In Vitro*

Oleh:

Uswah Hasanah

NIM: 145070107111059

Telah diuji pada

Hari : Rabu

Tanggal : 24 Januari 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Indriati Dwi Rahayu, M. Kes

NIP. 197605192005012001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

dr. Yuanita Mulyastuti, M. Si

NIP. 198208092009122004

dr. Hermawan Wibisono, Sp. OG(K)

NIP. 197704222008121002

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

dr. Tri Wahyu Astuti, M. Kes, Sp.P(K)

NIP. 196310221996012001

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan bimbingan dan anugerah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Uji Efektivitas Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Terhadap Bakteri *Streptococcus pyogenes*”. Tugas akhir ini dibuat untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Umum.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes., yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
2. dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K), sebagai Ketua Program Studi Kedokteran yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di Program Studi Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. dr. Yuanita Mulyastuti, M.Si. sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan banyak bantuan untuk penelitian ini, yang dengan sabar dan sepenuh hati membimbing untuk bisa menulis dengan baik, dan senantiasa memberikan semangat serta doa, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. dr.Hermawan Wibisino, Sp.OG(K) sebagai pembimbing kedua yang telah meberikan bimbingan, masukan, memberi semangat serta doa sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.

5. dr.Indriati Dwi Rahayu, M.kes sebagai penguji yang telah memberikan bimbingan, masukan, memberi semangat serta doa sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.

6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, khususnya Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt, M.Si yang telah membantu penulis dalam penyelesaian Proposal Tugas Akhir ini.

7. Kepala laboratorium dan jajaran staff di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

8. Yang tercinta Ayahanda H. Mohammad Zainuddin dan Ibunda Suharnawati, dr Holipah , dr Hikmawan serta seluruh keluarga besar atas seluruh kasih sayang , doa , semangat dan dukungan yang tiada henti sehingga Tugas Akhir ini berjalan dengan lancar .

9. Terimakasih kepada Bambang Sasmito yang selalu menghibur dan memberikan dukungan positif serta memberikan semangat yang tiada henti dalam penyelesaian Tugas Akhir ini .

10. Teman-temanku yang tercinta Arum Sulistiyarini, Suci Aini Fatana, Heidyana Rachma, Dananjaya Wirahusodo, Mohammad Azka Soelaiman dan Maryam permatasari yang turut memberikan semangat dan selalu membantu daam penyelesaian Tugas Akhir ini.

11. Teman-teman Pendidikan Dokter angkatan 2014 ,khususnya teman-teman PD-B 2014 atas persahabatan selam ini dan suasana yang menyenangkan dalam menuntut ilmu , semoga kita bisa terus menjaga komunikasi dan kekompakkan .

12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu dan menyelesaikan Tugas Akhir ini , baik secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis menyadari bahwa penulisan Tugas Akhi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Semoga Tugas Akhir ini dapat menambah wawasan dan memberikan sumbangsih dalam ilmu pengetahuan khususnya Ilmu Kedokteran .



Malang,

Penulis

ABSTRAK

Hasanah, Uswah . 2017. *Uji Efektivitas Antimikroba Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia) Terhadap Bakteri Streptococcus pyogenes Secara In Vitro*. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Yuanita Mulyastuti, MSi (2) dr. Hermawan Wibisiono Sp. OG(K).

Streptococcus pyogenes merupakan penyebab utama dari infeksi saluran nafas bagian atas contohnya faringitis. Bakteri ini juga dapat menyebabkan penyakit antara lain scarlet fever, erisipelas, faringitis, rheumatic fever, dan bermacam-macam penyakit lainnya. Penisilin sebelumnya masih merupakan pengobatan pertama dari infeksi *S. pyogenes*. Namun, akhir-akhir ini telah diidentifikasi galur *S. pyogenes* yang resisten terhadap penisilin. Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) merupakan salah satu tumbuhan obat yang berpotensi sebagai antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antimikroba Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *S. pyogenes* secara *In Vitro* dengan eksperimen laboratorium menggunakan metode difusi sumuran. Pengukuran diameter zona inhibisi koloni *S. pyogenes* dilakukan dengan menggunakan jangka sorong menggunakan satuan millimeter. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% serta satu kelompok kontrol bakteri tanpa diberi ekstrak jeruk nipis (konsentrasi 0%). Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Uji statistik yang digunakan adalah uji non parametrik meliputi Uji *Kruskal Wallis* , uji *Post Hoc Mann whitney* dan uji korelasi *Spearman* . Uji *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan yang signifikan pada setiap pemberian ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dalam beberapa konsentrasi zona hambat *S. pyogenes* ($p < 0,05$). Uji korelasi *Spearman* menunjukkan hubungan yang signifikan ($p < 0,05$) dan arah yang positif (0,925). Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terbukti memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *S. pyogenes* secara *in vitro*.

Kata kunci : *S. pyogenes*, kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), efek antibakteri.

ABSTRACT

Hasanah, Uswah . 2017. *Antimicrobia Effectiveness Test of Lime Peel Extract (Citrus aurantifolia) Against Streptococcus pyogenes Bacteria In Vitro*. Final Project, Medical Bachelor Degree Program, Faculty of Medicine Universitas Brawijaya. Counselor: (1) dr. Yuanita Mulyastuti, MSi (2) dr.Hermawan Wibisono Sp.OG(K)

Streptococcus pyogenes is a major cause of upper respiratory tract infection e.g pharyngitis. These bacteria can also cause diseases such as scarlet fever, erysipelas, pharyngitis, rheumatic fever, and other diseases. Penicillin was previously used as drug of choice of *S. pyogenes* infection. However, lately, it has been identified strains of *S. pyogenes* that are resistant to penicillin. Lime (*Citrus aurantifolia*) is one of the herbal plants that have potency as an antimicrobials. The aim of this study was to determine the effect of antimicrobial lime peel extract (*Citrus aurantifolia*) against *S. pyogenes* bacteria in vitro with experimental laboratory using the diffusion method of wells. The measurement of the zone diameter inhibition of *S. pyogenes* colonies was performed using a sliding range using millimeters. The concentrations used in this study were 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% and one control group of bacteria without giving lemon extract (0% concentration). Each treatment is repeated 4 times. Non-parametric tests were performed in this study included *Kruskal Wallis* test , *Post Hoc Mann Whitney* test and *Spearman* correlation test . The *Kruskal Wallis* test showed significant differences in each administration of lime peel extract (*Citrus aurantifolia*) in some concentration of *S. pyogenes* inhibitory zone ($p < 0.05$). *Spearman* correlation test showed significant relationship ($p < 0,05$) and positive direction (0,925). Based on this research, it can be concluded that the extract of lime peel (*Citrus aurantifolia*) have been proved to have an antibacterial effect against *S. pyogenes* in vitro.

Keyword : *S. pyogenes*, Lime peel extract (*Citrus aurantifolia*), antibacteria effect.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR	iii
ABSTRAK.....	v
ABSTRAK.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
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.....	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademik	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>).....	5
2.1.1 Taksonomi	5
2.1.2 Morfologi.....	6
2.1.3 Persebaran.....	7
2.1.4 Kandungan Kimiawi	7
2.1.5 Manfaat dan Kegunaan.....	7
2.1.6 Kandungan Zat Aktif Tumbuhan Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>).....	8
2.2 <i>Streptococcus pyogenes</i>	10
2.2.1 Morfologi dan Identifikasi	10
2.2.2 Toksonomi.....	11

2.2.3	Antigen – antigen pada <i>Streptococcus pyogenes</i>	11
2.2.4	Toksin dan enzim pada <i>Streptococcus pyogenes</i>	12
2.2.5	Gambaran Klinis	14
2.2.6	Gejala klinis yang diakibatkan oleh infeksi lokal dan zat yang dihasilkan oleh <i>S. pyogenes</i>	16
2.2.7	Gejala Post-Streptococcal.....	17
2.2.8	Mekanisme Kerja Antimikroba.....	17
2.2.9	Menghambat Sintesis Dinding Sel Bakteri.....	18
2.2.10	Menghambat/Merubah Fungsi Membran Bakteri.....	18
2.2.11	Menghambat Sintesis Protein	19
2.2.12	Menghambat Sintesis Asam Nukleat.....	19
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		21
3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	21
3.2	Penjelasan Kerangka Konsep.....	22
3.3	Hipotesis Penelitian	23
BAB 4 METODE PENELITIAN		24
4.1	Rancangan Penelitian.....	24
4.2	Populasi dan Sampel Penelitian.....	24
4.3	Pengulangan.....	24
4.4	Variabel Penelitian	25
4.4.1	Variabel Bebas.....	25
4.4.2	Variabel Terikat.....	25
4.5	Lokasi dan waktu penelittian	25
4.6	Definisi Oprasional.....	26
4.7	Alat dan Bahan Penelitian.....	27
4.7.1	Alat-alat dan Bahan Untuk Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Nipis	27
4.7.1.1	Alat-alat.....	27
4.7.1.2	Bahan.....	27
4.7.2	Alat-alat dan Bahan Untuk Metode Sumuran	27
4.7.2.1	Alat-alat.....	27
4.7.2.2	Bahan.....	27
4.7.3	Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram Bakteri	28

4.7.3.1	Alat-alat.....	28
4.7.3.2	Bahan.....	28
4.7.4	Alat dan Bahan untuk Tes Katalase Bakteri.....	28
4.7.4.1	Alat-alat.....	28
4.7.4.2	Bahan.....	28
4.7.5	Alat dan Bahan untuk Tes Bacitracin Bakteri.....	29
4.7.5.1	Alat-alat.....	29
4.7.5.2	Bahan.....	29
4.7.6	Alat dan Bahan untuk Tes Hemolisis Bakteri.....	29
4.7.6.1	Alat-alat.....	29
4.7.6.2	Bahan.....	29
4.8	Prosedur Penelitian.....	30
4.8.1	Identifikasi Bakteri.....	30
4.8.1.1	Pewarnaan Gram.....	30
4.8.1.2	Tes Hemolisis.....	31
4.8.1.3	Tes Bacitracin.....	31
4.8.1.4	Tes Katalase.....	32
4.8.1.5	Pembuatan Pembenuhan Cairan Bakteri.....	32
4.8.2	Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Nipis.....	33
4.8.3	Uji Sensitivitas Antimikroba.....	34
4.8.4	Pengamatan dan Pengukuran.....	35
4.8.5	Skema Prosedur Penelitian.....	36
4.9	Analisis Data.....	36

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA 38

5.1	Data Hasil Penelitian.....	38
5.1.1	Identifikasi <i>Streptococcus pyogenes</i>	38
5.1.1.1	Pewarnaan Gram.....	39
5.1.1.2	Uji Katalase.....	39
5.1.1.3	Penanaman bakteri media BAP dan uji bacitracin.....	40
5.1.1.4	Hasil Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis.....	41
5.1.1.5	Hasil Penelitian Pendahuluan.....	41
5.1.1.6	Hasil Difusi Sumuran.....	42
5.1.1.7	Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri.....	44

5.2	Analisa Data	46
5.2.1	Uji Asumsi Data	46
5.2.1.1	Uji Kruskal Wallis	47
5.2.1.2	Uji Mann-Whitney.....	48
5.2.1.3	Uji Korelasi Spearmen.....	49

BAB 6 PEMBAHASAN **50**

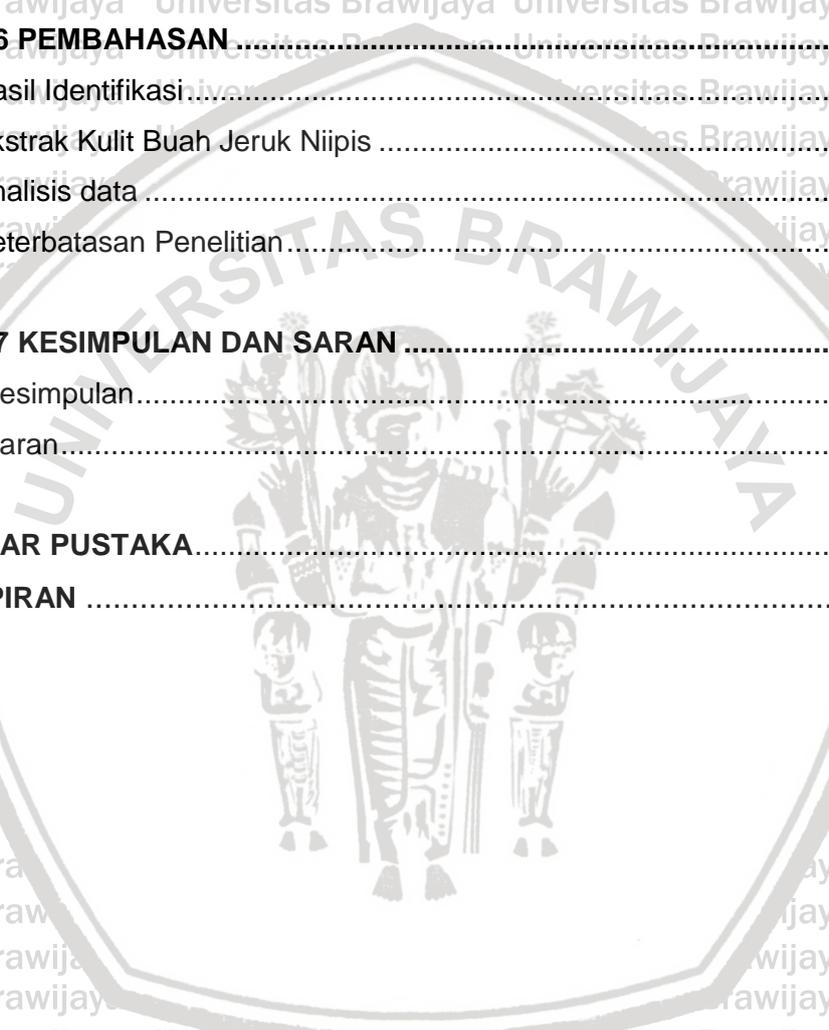
6.1	Hasil Identifikasi.....	50
6.2	Ekstrak Kulit Buah Jeruk Niipis	51
6.3	Analisis data	54
6.4	Keterbatasan Penelitian.....	56

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN **58**

7.1	Kesimpulan.....	58
7.2	Saran.....	58

DAFTAR PUSTAKA..... **59**

LAMPIRAN **62**



DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Hasil Hambatan Pertumbuhan Bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i>	45
Tabel 5.2 Grafik Rerata Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i>	46
Tabel 5.3 Hasil Analisis Uji Kruskal Wallis.....	47
Tabel 5.4 Hasil Analisis Uji <i>Mann Whitney</i>	48
Tabel 5.5 Hasil Analisis Uji Korelasi Spearman.....	49



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>).....	5
Gambar 3.1 Kerangka Konsep.....	21
Gambar 4.2 Skema Prosedur Penelitian.....	35
Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan Gram <i>Streptococcus pyogenes</i>	38
Gambar 5.2 Hasil Uji Katalase <i>Streptococcus pyogenes</i>	39
Gambar 5.3 Hasil penanaman bakteri dalam media BAP dan uji bacitracin.....	40
Gambar 5.4 Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis.....	41
Gambar 5.5 Hasil Penelitian Pendahuluan Menggunakan Metode Difusi Sumuran.....	42
Gambar 5.6 Hasil Difusi Sumuran.....	43



DAFTAR SINGKATAN

BAP	: <i>Blood Agar Plate</i>
BHIA	: <i>Brain Heart Infusion Agar</i>
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
HPLC	: <i>High performance liquid chromatography</i>
KBM	: <i>Kadar Bunuh Minimal</i>
KHM	: <i>Kadar Haambat Minimal</i>
KLT	: <i>Kromatografi Lapis Tipis</i>
MIC	: <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
NAP	: <i>Nutrient Agar Plate</i>
PBP	: <i>Penicillin Binding Protein</i>
RNA	: <i>Ribonucleid Acid</i>
SPSS	: <i>Statistical Product of Service Solution</i>

BAB 1

LATAR BELAKANG

1.1 Latar Belakang

Faringitis merupakan salah satu infeksi saluran nafas atas yang paling banyak terjadi (Depkes RI,2005). Kasus faringitis disebabkan oleh infeksi langsung faring akibat virus atau bakteri (Vincent et al., 2004). Agen penyebab dari infeksi bakteri ini diantaranya *Streptococcus pyogenes* yang merupakan *Streptococcus* grup A (Wessels,2011). Infeksi *Streptococcus* grup A di jumpai pada 15-30% dari kasus faringitis pada anak-anak dan 5-10% pada faringitis dewasa. Terdapat 1 sampai 2,6 juta kasus faringitis terjadi di USA per tahun. *Streptococcus pyogenes* merupakan penyebab utama dari infeksi saluran nafas bagian atas seperti faringitis. Angka kejadian penyakit infeksi saluran nafas di Indonesia mencapai 25%. Infeksi saluran nafas mendominasi infeksi lainnya seperti infeksi saluran cerna, infeksi saluran kemih, kulit, bahkan infeksi sistemik (Kemenkes RI, 2013). Bakteri ini juga merupakan penyebab utama dari *necrotizing fasciitis* penyakit invasif yang dapat berakibat fatal pada 25%-35% kasus. Manusia termasuk salah satu makhluk yang paling rentan terhadap infeksi bakteri ini dan tidak ada alat tubuh atau jaringan dalam tubuhnya yang benar-benar kebal (WHO 2001).

Salah satu penatalaksanaan penderita infeksi karena bakteri adalah pengobatan dengan antibiotik (Mardiastuti, 2007). Pengobatan dini dan teratur dengan antibiotik pada umumnya memberikan penyembuhan. Menurut Jacobs (2005)

seperti dikutip W, Mardiasuti H, et al. (2007), penisilin sebelumnya masih merupakan pengobatan pertama dari infeksi *Streptococcus pyogenes*. Akhir-akhir ini telah diidentifikasi galur *Streptococcus pyogenes* yang resisten terhadap penisilin.

Berdasarkan penelitian di Taiwan pada tahun 2001 dijumpai resistensi pada bakteri ini terhadap makrolida sebesar 78%.

Akibat timbulnya resistensi dari antibiotik maa saat ini telah banyak dilakukan pengujian efek tanaman obat sebagai antimikroba, salah satunya jeruk nipis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jeruk nipis mempunyai aktivitas hambatan terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada kadar 20%, 40%, dan 80% serta *Escherichia coli* pada kadar 40% dan 80% (Dalimartha, 2001). Indonesia dengan

kelimpahan sumber daya alamnya memiliki keunggulan untuk memanfaatkan berbagai tumbuhan obat sebagai antimikroba. Salah satu tanaman yang berpotensi untuk pengobatan infeksi bakteri adalah kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).

Bahan aktif dalam ekstrak kulit buah jeruk nipis seperti alkaloid, tannin, flavanoid, dan saponin memiliki efek antimikroba yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Konsentrasi flavonoid tertinggi terdapat pada jaringan luar yang berwarna seperti kulit buah (Machin et al., 1991). Flavonoid sebagai antimikroba bekerja dengan menghambat enzim DNA girase dan metabolisme energi sehingga bakteri kehilangan fungsi vitalnya dan mati (Cushine and Lamb, 2005).

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai antimikroba terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*. Diharapkan dengan adanya penelitian ini,

masyarakat umum dapat meningkatkan penggunaan tanaman kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek antimikroba ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan khusus

Mengetahui pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak dari kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Keilmuan

Dapat memperkokoh landasan teori ilmu kedokteran terutama di bidang mikrobiologi, khususnya mengenai pengaruh kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dalam menghambat pertumbuhan.

1.4.2 Manfaat Akademik

Mengembangkan ilmu pengetahuan, terutama mengenai bahan alternatif yang dapat digunakan sebagai antimikroba.

1.4.3 Manfaat Praktis

1. Memperoleh pengobatan alternatif dari bahan alami pada pengobatan infeksi *Streptococcus pyogenes*.
2. Memanfaatkan limbah kulit jeruk nipis yang mayoritas dibuang, sehingga dapat menjadi tanaman obat antimikroba.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Jeruk nipis yang dibudidayakan di Indonesia tidak jelas varietasnya. Di Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian Tlengkung, Malang, telah dikoleksi kultivar jeruk nipis komersial disebut jeruk nipis wajak. Bibit yang dikembangkan adalah bibit jeruk bebas penyakit. Produktivitas jeruk nipis sangat bergantung dari umur, kondisi tanaman, keadaan iklim, kesuburan tanah, dan pemeliharaan tanaman. Di Indonesia, jeruk nipis bisa berbunga dan berbuah secara serentak dan bisa berlangsung sepanjang tahun (Sarwono, 2001).

2.1.1 Taksonomi

Berdasarkan taksonomi tumbuhan, Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) digolongkan sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Spermatophyta*
Sub divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Ordo : *Sapindales*
Famili : *Rutaceae*
Genus : *Citrus L.*
Spesies : *Citrus aurantifolia*

2.1.2 Morfologi

Pohon kecil bercabang lebat, tetapi tidak beraturan, tinggi 1,5-3,5 m, batang bulat, berduri pendek, kaku, dan tajam. Daun tunggal, tangkai daun bersayap sempit.

Helaian daun berbentuk jorong sampai bundar telur lonjong, pangkal bulat, ujung tumpul, tepi beriringgit, permukaan atas berwarna hijau tua mengilap, permukaan daun

baguan bawah berwarna hijau muda, panjang 2,5-9 cm, lebar 2-5 cm. Bunga majemuk, tersusun dalam malai yang keluar dari ketiak daun, bunga berbentuk

bintang, diameter 1,5-2,5 cm, berwarna putih, baunya harum. Buahnya buah buni, berbentuk bulat sampai bulat telur, diameter 2,5-5 cm, berkulit tipis tanpa benjolan,

berwarna hijau yang akan mejadi kuning matang. (Dalimartha, S., 2000).



Gambar 2.1 Tanaman Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*): A. Daun; B. Buah (Dalimartha, S., 2000)

2.1.3 Persebaran

Biasanya, jeruk nipis ditanam di pekarangan atau di kebun, dapat tumbuh pada tanah yang kurang subur, asalkan mudah meneruskan air dan mendapat sinar matahari penuh. Konon, jeruk nipis berasal dari kepulauan Hindia Timur. Di Indonesia tanaman ini dapat ditemukan pada ketinggian 1-1.000 m dpl (Dalimartha, 2000).

2.1.4 Kandungan Kimiawi

Jeruk nipis mengandung minyak terbang limonene dan linalool. Selain itu, juga mengandung flavonoid, alkalid, tanin. Buah masak mengandung synephrine dan N-methyltyramine. Disamping itu, juga mengandung asam sitrat, kalsium, fosfor, besi dan vitamin (A, B₁, dan C) (Dalimartha, 2000).

Sedangkan ekstrak dari kulit jeruk nipis sendiri memiliki bahan aktif seperti alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid (Pathan dan Rafi, 2012).

2.1.5 Manfaat dan Kegunaan

Sebagai obat tradisional, tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki banyak manfaat dan kegunaan. Jeruk nipis dapat digunakan untuk menghilangkan sumbatan vital energi, obat batuk, peluruh dahak (mukolitik), peluruh kencing (diuretik), peluruh keringat, dan membantu proses pencernaan. Untuk pemakaian luar, air jeruk nipis diaduk dengan bahan lain untuk dikompreskan atau dibalurkan ke bagian tubuh yang sakit, seperti demam pada anak-anak, sakit perut, diare, sakit gigi, nyeri haid, kepala pusing, rematik, kurap, ketombe, jerawat, *clavus*, terkilir, mengecilkan perut, mengecilkan pori-pori di wajah, dan membersihkan lemak di kulit

wajah. Air jeruk nipis juga dapat digunakan sebagai obat kumur pada penderita sakit tenggorokan atau abses tenggorokan (Dalimartha, 2000).

2.1.6 Kandungan Zat Aktif Tumbuhan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Jeruk nipis, tumbuhan yang sering kita temui di lingkungan kita, mempunyai efek yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Ekstrak kulit jeruk nipis memiliki bahan aktif seperti flavonoid ,alkaloid,saponin,dan tanin (Nogota *et al.*, 2006).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler bakteri, sehingga dapat merusak membran sitoplasma bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Senyawa flavonoid bersifat lipofilik sehingga mampu mengikat fosfolipid – fosfolipid pada dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri lisis dan senyawa dapat masuk ke dalam inti sel bakteri. Pada inti sel senyawa akan berikatan dengan lipid DNA bakteri sehingga menghambat replikasi DNA dan menyebabkan perubahan kerangka mutasi pada sintesis protein (Cushnie Polifenol merupakan senyawa fenol, zat ini memiliki tanda khas yakni memiliki banyak gugus fenol dalam molekulnya. Polifenol diketahui memiliki efek sebagai antimikroba, dengan mekanisme membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan protein terlarut yang dapat mengakibatkan membrane sel bakteri rusak sehingga metabolit-metabolit intraseluler keluar dari dalam sel. Selain itu, polifenol juga dapat menyebabkan protein terdenaturasi. Mekanisme-mekanisme tersebut dapat mengakibatkan metabolisme bakteri terganggu sehingga menghambat pertumbuhan bakteri (L.xu.,2002; Lewis, et al., 2007).

Polifenol merupakan senyawa yang tersusun dari banyak senyawa fenol. Fenol merupakan senyawa non gizi yang mempunyai minimal satu cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil, sedangkan senyawa polifenol mempunyai lebih dari satu cincin aromatik selain itu. Polifenol diketahui memiliki efek sebagai antimikroba, dengan mekanisme membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan protein terlarut yang dapat mengakibatkan membrane sel bakteri rusak sehingga metabolit-metabolit intraseluler keluar dari dalam sel (L.xu.,2002; Lewis, et al., 2007 dan Lamb, 2005; Covalec et al., 2005; Bobbarala, 2012).

Senyawa alkaloid memiliki efek antimikroba karena kemampuannya untuk menghambat sintesis asam nukleat dengan menghambat enzim *dihydrofolate reductase*, topoisomerase tipe I dan II. Selain itu alkaloid juga memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan biofilm, menghambat sistem sekresi bakteri, mengganggu regulasi gen, dan mengganggu fimbriae dan adhesin (Cushnie, et al., 2014). Saponin sebagai antibakteri memiliki efek merubah permeabilitas membran sel dengan memblokir kanal ion. Studi lain menjelaskan, saponin meningkatkan permeabilitas membran sel dengan menyisipkan senyawa *aglycone* diantara lapisan lipid bilayer bakteri sehingga membentuk lubang. Saponin juga merubah fungsi glikoprotein membran plasma dan membentuk kompleks saponin-kolesterol sehingga mengganggu organisasi membran fosfolipid dan membuatnya hancur (Hassan, 2008).

2.2 *Streptococcus pyogenes*

2.2.1 Morfologi dan Identifikasi

Streptococcus pyogenes mengandung antigen A. organisme ini mengandung β hemolitik. *Streptococcus pyogenes* merupakan pathogen utama pada manusia yang menimbulkan invasi local dan sistemik dan kelainan imunologi pasca infeksi *streptococcus*. *Streptococcus pyogenes* secara khas menghasilkan zona hemolysis β yang besar (berdiameter 1 cm) di sekitar koloni yang berdiameter lebih dari 0,5mm. organisme ini bersifat PYR-positif (hidrolisis 1-pirolidonil-2-naftilamid) dan biasanya sensitive terhadap bacitrasin. (Brooks et al., 2015)

Streptococcus pyogenes yang biasanya menimbulkan infeksi pada manusia adalah gram positif, tetapi varietas tertentu yang diasingkan dari tinja manusia dan jaringan binatang ada yang gram negatif. Pada perbenihan yang baru kuman ini gram positif. Bila perbenihan telah berumur beberapa hari dapat berubah menjadi gram negatif . Tidak membentuk spora, kecuali beberapa strain yang hidupnya saprofilik. Geraknya negatif, strain yang virulen membuat selubung yang mengandung *hyaluronic acid* dan *M Type specific protein* (Brooks et al., 2015).

2.2.2 Taksonomi

Berikut dibawah ini taksonomi dari *Streptococcus pyogenes* :

- Kingdom : *Bacteria*
- Filum : *Firmicutes*
- Kelas : *Bacilli*
- Ordo : *Lactobacillales*
- Family : *Streptococaceae*
- Genus : *Streptococcus*
- Spesies : *Streptococcus pyogenes*

2.2.3 Antigen – antigen pada *Streptococcus pyogenes*

a. Protein M

Protein M merupakan factor virulensi utama pada *Streptococcus pyogenes* grup A. Protein M terlihat seperti tonjolan mirip rambut pada dinding sel *Streptococcus*. *Streptococcus* bersifat virulen bila terdapat protein M, dan apabila tidak ada antigen spesifik-tipe M, Organisme ini mampu bertahan terhadap proses fagositosis oleh leukosit polimorfonikuler (Brooks et al., 2015).

b. Zat T

Antigen ini tidak berhubungan dengan virulensi *Streptococcus*. Tidak seperti protein M, zat T ini tidak tahan asam maupun panas.

c. Nucleoprotein

Ekstraksi protein dengan basa lemah menghasilkan campuran protein dan zat-zat lain dengan spesifitas serologi yang rendah, dan disebut sebagai substansi P. Zat ini menyusun sebagian besar badan sel *Streptococcus* (Brooks et al., 2015).

2.2.4 Toksin dan enzim pada *Streptococcus pyogenes*

a. Streptokinase (fibrinolisin)

Streptokinase dihasilkan oleh berbagai strain *Streptococcus* β hemolitik grup A. enzim ini mengubah plasminogen pada plasma manusia menjadi plasmin, suatu enzim proteolitik aktif yang mencerna fibrin dan protein lain (Brooks et al., 2015).

b. Streptodornase

Streptodornase (*Streptococcal deoxyribonuclease*) melakukan depolarisasi DNA. aktifitas enzimatik dapat diukur dengan menghitung penurunan viskositas larutan DNA yang diketahui. Campuran dengan streptokinase digunakan pada debridement enzimatik (Brooks et al., 2015).

c. Hialuronidase

Hialuronidase memecah asam hialuronat, sebuah komponen penting bahan dasar jaringan ikat. Karena itu hialuronidase membantu penyebaran mikroorganisme yang infeksius (faktor penyebar) (Brooks et al., 2015).

d. Eksotoksin pirogenik (toksin eritrogenik)

Eksotoksin pirogenik dihasilkan oleh *Streptococcus* Grup A. ada tiga jenis eksotoksin yang dibedakan berdasarkan antigen yaitu A, B, dan C. eksotoksin A mempunyai faga lisogenik (*lysogenic phage*) yang merupakan sebuah superantigen. Eksotoksin pirogenik dapat menyebabkan sindrom syok toksik *Streptococcus* dan demam scarlet. Eksotoksin C juga bereperan menyebabkan sindroma tersebut. Peran dari eksotoksin pirogenik B masih belum diketahui lebih jelas (Brooks et al., 2015).

e. Hemolisin

Pada *Streptococcus pyogenes* menghasilkan 2 hemolisin (streptolisin). Streptolisin O merupakan protein (BM 60.000) yang aktif secara hemolitik dalam keadaan tereduksi tetapi segera menjadi tidak aktif bila teradapt oksigen. Streptolisin O Berperan dalam hemolisis. Zat ini secara kuantitatif terikat dengan anti streptolisin O yaitu zat yang menghambat aktivitas streptolisin O. streptolisin S zat yang berperan membentuk zona hemolitik di sekitar koloni *Streptococcus* yang tumbuh pada permukaan medium agar darah (Brooks et al., 2015).

2.2.5 Gambaran Klinis

Gambaran klinis yang muncul dibagi menjadi gejala yang muncul karena invasi dari beta hemolitik *Streptococcus pyogenes* grup A dan gejala yang timbul oleh karena produk yang dihasilkan bakteri tersebut (Brooks et al., 2015).

2.2.5.1 Gejala yang timbul karena invasi bakteri *Streptococcus pyogenes*

2.2.5.1.2 Erisipelas

Jika jalan masuk infeksi adalah kulit, akan terjadi infeksi yang disebut erisipelas yang ditandai dengan adanya bengkak kemerahan berwarna merah dan berbatas tegas yang dapat menyebar dengan cepat. (Brooks et al., 2015)

2.2.5.1.3 Selulitis

Selulitis bersifat akut dan mengenai jaringan kulit dan jaringan subkutan. Infeksi tersebut dapat mengikuti infeksi yang disebabkan oleh trauma, luka, luka bakar, atau insisi pada operasi. Terdapat nyeri tekan, warna kemerahan, yang membedakan selulitis dengan erisipelas adalah lesi kulit pada selulitis tidak meninggi dan batas lesi tidak tegas (Brooks et al., 2015).

2.2.5.1.4 Necrotizing fasciitis

Merupakan proses nekrosis yang terjadi dengan cepat pada kulit, jaringan dan fascia. Bakteri selain *Streptococcus* juga dapat menyebabkan gejala tersebut (Carroll et al., 2015).

2.2.5.1.5 Demam purpura

Jika *Streptococcus pyogenes* memasuki uterus saat proses melahirkan, demam purpura akan timbul yang sejatinya merupakan septikemia oleh karena infeksi karena terjadinya endometritis (Brooks et al., 2015).

2.2.5.1.6 Sepsis

Infeksi dari luka trauma ataupun luka operasi oleh *Streptococcus* dapat menyebabkan sepsis. Sepsis juga dapat disertai infeksi kulit, seperti selulitis, dan pada kasus yang langka, sepsis disertai faringitis (Brooks et al., 2015).

2.2.5.1.7 *Streptococcal Toxic Shock Syndrome*

Merupakan infeksi mematikan dari *Streptococcus pyogenes* yang disertai dengan adanya syok, bakteremia, gagal napas, dan kegagalan multiorgan. Kematian akibat keadaan tersebut mencapai 30% dari pasien. Infeksi cenderung terjadi setelah trauma minor pada pasien yang semula sehat meskipun mengalami tanda tanda infeksi jaringan lunak. Pada beberapa pasien, khususnya pasien dengan infeksi *Streptococcus* grup A khususnya tipe 1 dan 3, penyakit tersebut biasanya disertai dengan infeksi jaringan fokal dengan demam dan syok yang bersifat progresif secara

cepat disertai dengan kegagalan multiorgan. Eksotoksin pirogenik A-C juga dapat menyebabkan scarlet fever yang disertai dengan faringitis atau dengan infeksi kulit dan jaringan. Scarlet fever ditandai dengan adanya gatal pada badan yang dapat merambat ke daerah ekstremitas (Brooks et al., 2015).

2.2.6 Gejala klinis yang diakibatkan oleh infeksi lokal dan zat yang dihasilkan oleh *Streptococcus pyogenes*.

2.2.6.1. Faringitis

Penyakit yang paling sering timbul akibat infeksi β -hemolitik *Streptococcus pyogenes* adalah faringitis yang terjadi saat bakteri *Streptococcus pyogenes* melekat pada epitel faring. Pada anak-anak, faringitis akibat infeksi *Streptococcus pyogenes* menyebabkan nasofaringitis subakut dengan sekret serous yang tidak kental, disertai demam, dan infeksi cenderung menyebar ke telinga tengah dan mastoid. Limfonodi servikal biasanya mengalami pembengkakan dan penyakit bisa menetap selama beberapa minggu. Pada anak yang lebih tua dan dewasa, gejalanya adalah gejala akut yang ditandai dengan adanya nasofaringitis akut, tonsilitis, kemerahan dan bengkak dengan disertai sekret yang purulen, limfonodi yang mengalami nyeri tekan, dan biasanya disertai demam tinggi (Brooks et al., 2015).

2.2.6.2 Pyoderma Streptokokal

Pyoderma streptokokal merupakan sebuah infeksi lokal pada jaringan kulit yang superfisial, pada kasus anak-anak disebut impetigo. Penyakit tersebut berupa erosi dari pembuluh darah dan lapisan superfisial kulit dimana area yang terlibat akan

tertutup dengan pus dan pada akhirnya tertutup oleh krusta. Penyakit tersebut dapat menular, terutama pada daerah dengan cuaca panas dan lembab (Brooks et al., 2015).

2.2.6.3 Gejala *Post-Streptococcal*

Setelah infeksi *Streptococcus pyogenes* akut, terdapat periode laten dimana periode tersebut memungkinkan untuk terjadi gejala yang berhubungan dengan respon hipersensitivitas penderita yaitu glomerulonefritis dan demam rematik, dimana glomerulonefritis biasanya didahului oleh infeksi pada kulit, sedangkan demam rematik didahului infeksi pada daerah saluran pernafasan (Brooks et al., 2015).

2.2.7 Mekanisme Kerja Antimikroba

Antimikroba bekerja dengan prinsip toksisitas selektif, yang berarti antimikroba tersebut bersifat selektif terhadap mikroba, sedangkan tidak bersifat toksik terhadap sel tubuh. Antimikroba bekerja melalui beberapa mekanisme, yaitu :

1. Menghambat sintesis dinding sel bakteri
2. Menghambat fungsi membran sel bakteri
3. Menghambat sintesis protein
4. Menghambat sintesis asam nukleat pada bakteri (Brooks et al., 2015).

2.2.8 Menghambat Sintesis Dinding Sel Bakteri

Antimikroba yang memiliki mekanisme kerja menghambat sintesis dinding sel bakteri bekerja diawali dengan melekat pada receptor yang bernama *Penicillin Binding Protein* (PBP). Terdapat setidaknya 6 jenis PBP dengan reaksi yang berbeda-beda antara perlekatan antimikroba pada 1 PBP dengan PBP lainnya. Setelah obat tersebut melekat pada PBP. Reaksi transpeptidasi terhambat, dan reaksi pembentukan peptidoglikan terhambat. Reaksi berikutnya kemungkinan adalah reaksi yang berupa inaktivasi dari inhibitor enzim-enzim autolisis pada dinding sel yang menyebabkan teraktivasi enzim litik yang menyebabkan terjadinya lisis pada kondisi yang hipertonik (Brooks et al., 2015).

2.2.9 Menghambat / Merubah Fungsi Membran Bakteri

Antimikroba yang memiliki mekanisme menghambat/merubah fungsi bakteri memiliki berbagai macam mekanisme. Ada zat yang bekerja dengan cara merusak membran sel secara umum (deterjen). Golongan polimiksin bekerja dengan cara merusak membran sel yang mengandung fosfatidiletanolamin, sebuah komponen yang banyak terdapat pada membran sel bakteri. Golongan asam nalidiksat dan novobiocin menghambat fungsi biosintesis dari membran sitoplasma. Ada golongan obat lainnya yang bekerja dengan cara menyebabkan difusi yang cepat dari kation-kation spesifik melalui membran (Brooks et al., 2015).

2.2.10 Menghambat Sintesis Protein

Golongan aminoglikosida menghambat sintesis protein dengan mengganggu aktivitas normal kompleks inisiasi dari pembentukan peptida golongan makrolida berikatan dengan subunit 50s dari ribosom yang menyebabkan gangguan pada pembentukan kompleks inisiasi pembuatan peptida atau dapat juga mengganggu reaksi translokasi aminoasil. Golongan lincosamid berikatan dengan protein subunit 50s dan memiliki mekanisme yang hampir sama seperti golongan makrolida.

Golongan tetrasiklin berikatan secara reversibel pada protein subunit 30s pada ribosom dan menghambat perlekatan dari aminoasil-tRNA yang menyebabkan pencegahan tereksposnya asam amino baru pada rantai peptida yang memiliki sifat baru dibentuk. Glisilsiklin memiliki mekanisme yang sama dengan tetrasiklin.

Kloramfenikol berikatan dengan protein subunit 50s yang menyebabkan gangguan pada perlekatan asam amino pada rantai peptida yang baru dibentuk karena kloramfenikol menghambat peptidil transferase. Kloramfenikol memiliki efek bakteriostatik. Streptogramin melekat dengan tidak reversibel pada subunit 50s.

Oxazolidinone menghambat pembentukan N-formilmethionil-tRNA, kompleks inisiasi pada ribosom 23s (Brooks et al., 2015).

2.2.11 Menghambat Sintesis Asam Nukleat

Golongan rifampicin menghambat pertumbuhan bakteri dengan berikatan secara kuat pada DNA-dependent RNA polimerase bakteri yang menyebabkan terhambatnya sintesis RNA. Golongan quinolon dan fluoroquinolon menghambat sintesi DNA mikroba dengan menghambat DNA gyrases, enzim topoisomerase.

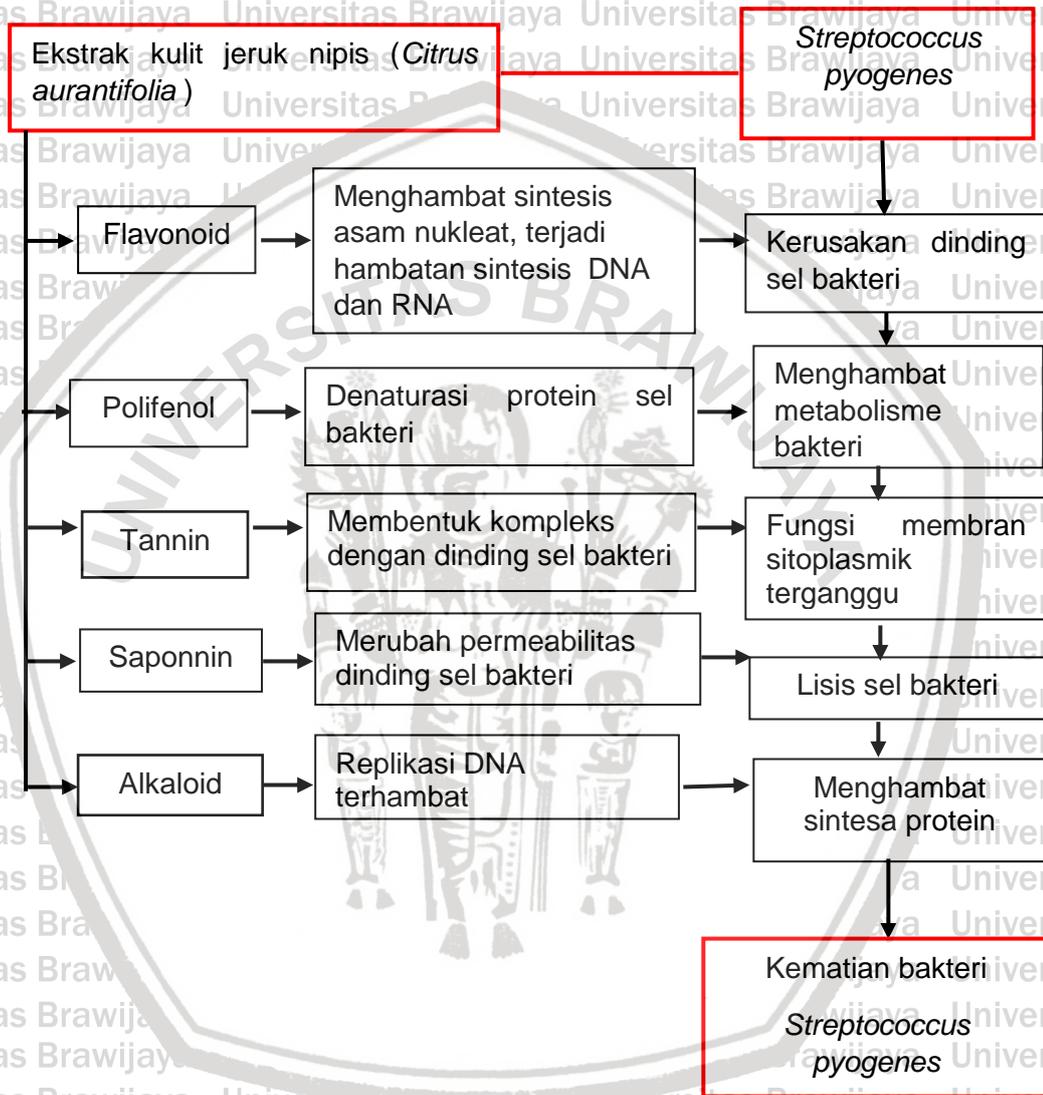
Sulfonamid bekerja dengan berkompetisi dengan PABA untuk mencari center aktif enzim. Golongan trimetoprim menghambat asam dehidrofolat reduktase yang mengganggu sintesis DNA. Pyrimetamin memiliki mekanisme yang sama dengan trimetoprim (Brooks et al., 2015).



BAB 3

KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan :

: variabel yang akan di teliti

: variable yang tidak di teliti

Gambar 3.1 Skema Kerangka Konsep Penelitian

3.1.1 Penjelasan Kerangka Konsep

Kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mengandung banyak zat-zat antioksidan seperti tanin, saponin, alkaloid, dan flavonoid dimana zat-zat tersebut memiliki efek menstimulasi sistem imun, menurunkan agregasi platelet, modulasi metabolisme hormon, antikanker, dan salah satunya antibakteri (Saxena *et al.*, 2013).

Flavonoid bekerja dengan menghambat enzim DNA girase, fungsi membran sitoplasmik, dan metabolisme energi (Cushnie and Lamb, 2005).

Saponin sebagai antibakteri memiliki efek merubah permeabilitas membran sel dengan memblokir kanal ion. Studi lain menjelaskan, saponin meningkatkan permeabilitas membran sel dengan menyisipkan senyawa aglycone diantara lapisan bilayer bakteri sehingga membentuk lubang.

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 (Al-Ani *et al.*, 2008). Senyawa alkaloid memiliki efek antibakteri karena kemampuannya untuk menghambat sintesis asam nukleat dengan menghambat enzim topoisomerase tipe I dan II. Selain itu alkaloid juga memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan biofilm, menghambat sistem sekresi bakteri, mengganggu regulasi gen, dan mengganggu fimbriae dan adhesin (Cushnie *et al.*, 2014).

Saponin juga merubah fungsi glikoprotein membran plasma dan membentuk kompleks saponin-kolesterol sehingga mengganggu organisasi

membran fosfolipid. Senyawa alkaloid memiliki efek antimikroba karena kemampuannya untuk menghambat sintesis asam nukleat dengan menghambat enzim dihidrofolate reductase, topoisomerase tipe I dan II.

Alkaloid memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan biofilm, menghambat sistem sekresi bakteri, mengganggu regulasi gen, dan mengganggu fimbriae dan adhesin (Cushnie, et al., 2014). Saponin sebagai antibakteri memiliki efek merubah permeabilitas membran sel dengan memblokir kanal ion. Studi lain menjelaskan, saponin meningkatkan permeabilitas membran sel dengan menyisipkan senyawa aglycone diantara lapisan lipid bilayer bakteri sehingga membentuk lubang. Saponin juga merubah fungsi glikoprotein membran plasma dan membentuk kompleks saponin-kolesterol sehingga mengganggu organisasi membran fosfolipid dan membuatnya hancur (Hassan, 2008).

Pengaruh antimikroba Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* 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

Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *true experimental-post test only control group design*, dengan fokus penelitian pada keadaan bakteri *Streptococcus pyogenes* setelah perlakuan berupa pemberian ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) 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 kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang didapatkan di UPT Materia Medika Kota Batu dan sampel bakteri uji yang digunakan dalam penelitian adalah *Streptococcus pyogenes* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3 Pengulangan

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

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

Keterangan

p = jumlah perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan 7 macam perlakuan yaitu kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% dan kontrol negatif berupa bakteri *Streptococcus pyogenes* yang diberi akuades, maka :

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3.14 \text{ (dibulatkan menjadi 4)}$$

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 ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% dan kontrol negatif berupa bakteri *Streptococcus pyogenes* yang diberi akuades.

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 pada tahun 2017. Bahan ekstrak diperoleh di UPT Materia Medika Kota Batu dan tempat ekstraksi ekstrak kulit jeruk

nipis (*Citrus aurantifolia*) dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan di UPT Materia Medika Kota Batu.

4.6.2 Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) menggunakan pelarut etanol yang diproses dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi.

4.6.3 Bakteri *Streptococcus pyogenes* 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 nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan konsentrasi penelitian pendahuluan 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100% dan konsentrasi penelitian inti 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.

4.6.6 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 kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Diameter zona inhibisi di ukur dalam satuan milimeter (mm).

4.7. Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

4.7.1.1 Alat

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

4.7.1.2 Bahan

- a. ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)
- b. Aquades

4.7.2 Alat dan Bahan untuk Metode Sumuran

4.7.2.1 Alat

- a. Cawan petri
- b. Pelubang sumuran
- c. Pipet mikro
- d. Incubator
- e. Bunsen burner

- f. Korek api
- g. Penggaris
- h. Jangka sorong

4.7.2.2 Bahan

- a. ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)
- b. Suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* 10^8 CFU/ml
- c. Aquades
- d. *Selective Blood agar medium*

4.7.3 Alat dan Bahan Untuk Pewarnaan Gram Bakteri :

4.7.3.1 Alat

- a. Gelas objek
- b. Kertas penghisap
- c. Mikroskop

4.7.3.2 Bahan

- a. Bakteri *Streptococcus pyogenes*
- b. Lugol
- c. Kristal violet
- d. Alkohol 96%
- e. Safranin
- f. Aquades

4.7.4 Alat dan Bahan untuk Tes Katalase Bakteri :

4.7.4.1 Alat

- a. Ose
- b. Pipet

c. Object glass

4.7.4.2 Bahan

a. Aquades

b. Koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*

c. H₂O₂

4.7.5 Alat dan Bahan untuk Tes Bacitracin Bakteri :

4.7.5.1 Alat

a. Ose

b. Blood agar Medium

c. Cawan petri dengan Blood Agar

d. Bunsen burner

e. Pinset

4.7.5.2 Bahan

a. Koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*

b. Bacitracin disk

4.7.6 Alat dan Bahan untuk Tes Hemolisis Bakteri :

4.7.6.1 Alat

a. Ose

b. Cawan petri dengan blood agar

c. Incubator

4.7.6.2 Bahan

a. Koloni bakteri

4.8 Prosedur penelitian

4.8.1 Identifikasi Bakteri

4.8.1.1 Pewarnaan Gram (Brooks et al., 2013)

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui *Streptococcus* termasuk bakteri Gram positif atau Gram negatif. 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 ditetaskan pada gelas obyek.
3. Dengan ose jarum yang steril, diambil sedikit bakteri *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh pada medium padat kemudian disuspensikan dengan satu tetes akuades steril yang sudah ditetaskan terlebih dulu pada gelas obyek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.
4. Hapusan dibiarkan kering di udara. Setelah kering hapusan difiksasi dengan cara melewati 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 *Streptococcus pyogenes* yang teramati di bawah mikroskop berupa bakteri berbentuk batang dan bewarna biru. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa *Streptococcus pyogenes* mengambil warna pembanding yang bewarna biru sehingga termasuk dalam golongan bakteri Gram positif.

4.8.1.2 Tes Hemolisis

1. Koloni bakteri ditanam pada *Blood agar plate* dengan menggunakan metode streaking.
2. Koloni bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam.
3. Diamati jenis hemolisis yang terjadi pada blood agar.
4. *Streptococcus pyogenes* akan menghasilkan hemolisis tipe β -hemolisis.

4.8.1.3 Tes Bacitracin

1. Tempatkan koloni yang diduga merupakan koloni *Streptococcus* yang memiliki sifat β hemolitik pada Blood agar dengan menggunakan ose, menggunakan metode streaking.
2. Menggunakan pinset yang dipanaskan, tempatkan bacitracin disk pada daerah yang memiliki jumlah koloni paling banyak.
3. Tekan bacitracin disk dengan menggunakan pinset yang dipanaskan, untuk memastikan bacitracin disk melekat dengan baik
4. Inkubasikan *Blood Agar Plate* pada suhu 35°C selama 18 sampai 24 jam.

5. Setelah periode inkubasi, amati apakah ada zona inhibisi koloni di sekitar bacitracin disk

4.8.1.4 Tes Katalase

1. Ose dipanaskan, lalu biarkan dingin.
2. Siapkan gelas objek. Tetesi dengan akuades steril.
3. Koloni bakteri diambil menggunakan ose, dicampur dengan akuades yang telah ditetesi sebelumnya diatas gelas objek.
4. Larutan H_2O_2 ditetaskan secukupnya.
5. Diamati apakah ada gelembung yang dihasilkan atau tidak
6. Hasil tes katalase pada bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah negatif, yaitu tidak menghasilkan gelembung diatas gelas objek.

4.8.1.5 Pembuatan Pembenuhan Cair Bakteri Kepadatan 10^8 CFU/ml

Pembuatan suspensi uji *Streptococcus pyogenes* (10^8 CFU/ml) adalah sebagai berikut :

1. Beberapa koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* diambil dari lempeng *Selective Blood agar medium* kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth*.
2. Tabung reaksi lalu diinkubasikan dalam inkubator pada suhu $37^\circ C$ selama 18-24 jam.
3. Dilakukan spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui OD (*Optical Density*) dari suspensi.

4. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml (sesuai standar McFarland 0.5) yang setara dengan OD=0.1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut :

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan :

N_1 = Nilai absorbs suspensi (hasil spektrofotometri)

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 ditambah pengencer untuk mendapatkan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml.

4.8.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Pembuatan ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dalam beberapa tahap seperti berikut. Ekstrak kulit jeruk nipis *Citrus aurantifolia* diperoleh dengan metode maserasi. Kulit jeruk nipis dipanaskan dengan suhu 80°C menggunakan oven dan dibiarkan selama semalam agar kandungan airnya berkurang (Yuliani dan Astuhu, 2012). Setelah itu, kulit jeruk nipis dihaluskan dengan blender, sehingga bentuknya menjadi bubuk yang homogen (Azwanida, 2015). Seringkali maserasi dikombinasikan dengan digesti dan refluk selama 1-2 jam dengan suhu $40-60^\circ\text{C}$ untuk meningkatkan efisiensi penyaringan. Ekstraksi biasanya dilakukan 2-3 kali atau sampai material tidak mengandung senyawa

terlarut lagi. Hal tersebut dicek dengan KLT dan lampu UV 254/366 nm (Saifudin, 2014).

4.8.3 Uji Sensitivitas Antimikroba

Dalam menguji sensitivitas antimikroba ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap *Streptococcus pyogenes* digunakan konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% selain itu akuades sebagai kontrol negatif.

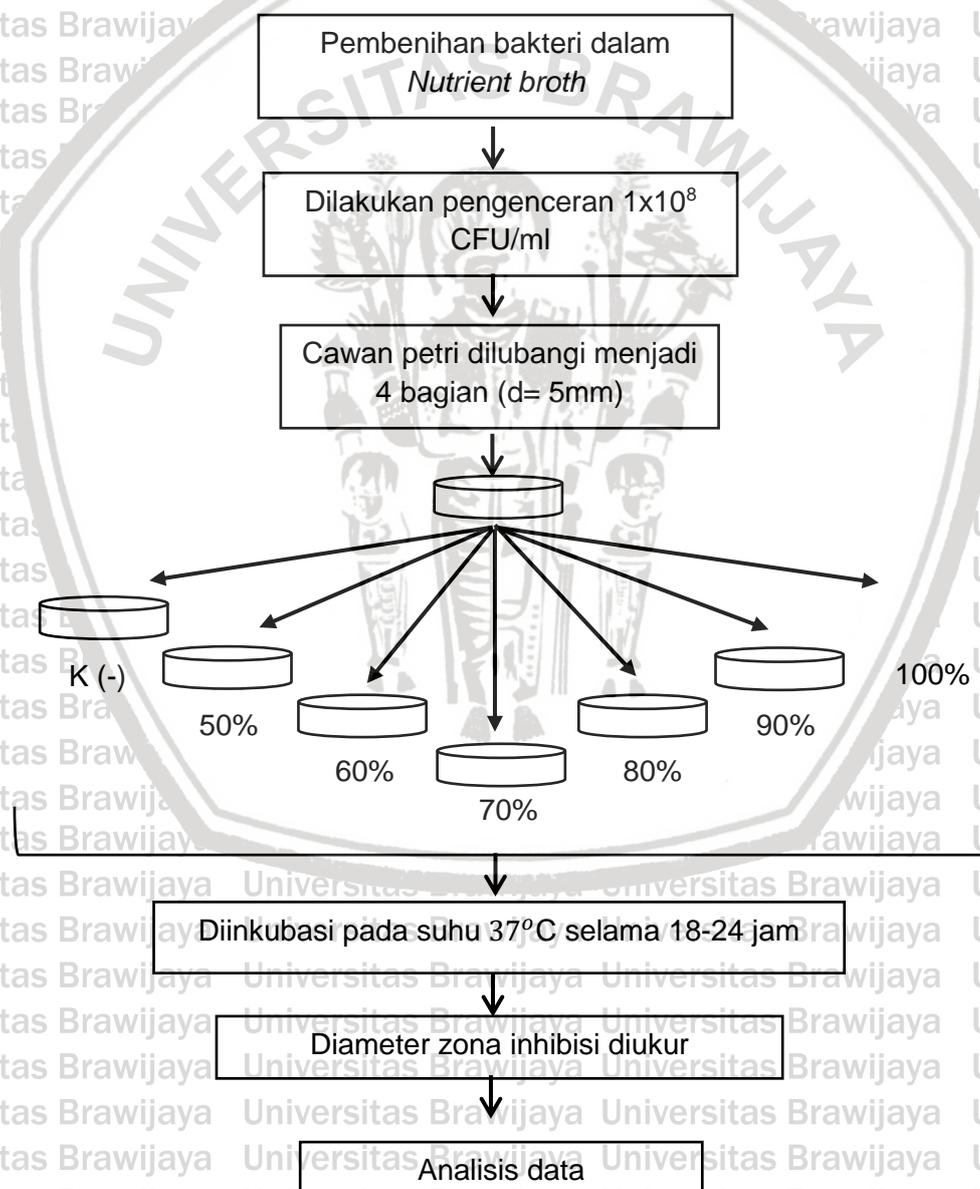
Uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) menggunakan metode difusi sumuran adalah sebagai berikut :

- a. Alat dan bahan disiapkan.
- b. Suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* 10^8 CFU/ml dicampurkan dengan BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*) sebanyak 15 ml ke dalam cawan petri.
- c. Cawan petri digoyang-goyangkan sehingga campuran tercampur dengan baik, lalu diamkan beberapa saat hingga mengeras.
- d. Lubang sumuran dibuat pada medium poin C sebanyak 7 lubang untuk dimasukkan ekstrak yang diujikan.
- e. Lubang berisi 40 μ l akuades sebagai kontrol negatif, lubang kedua sampai ke enam berisi 40 μ l larutan ekstrak-ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.
- f. Cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu 37°C .
- g. Dilakukan pengukuran 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.

4.8.5 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 4.2 Skema alur uji antimikroba ekstrak ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap *Streptococcus pyogenes*

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-ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*, dengan syarat:

- a. Sebaran data harus normal
- b. Varian data harus sama (homogen)

Kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* menggunakan *tukey*.

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 kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), dan dilakukan uji *post hoc* menggunakan uji *mann whitney test*.

3. Uji Korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variabel

dependen dan variabel 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 nipis (*Citrus aurantifolia*) dan efeknya.



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Identifikasi *Streptococcus pyogenes*

Bakteri *Streptococcus pyogenes* yang akan digunakan dalam penelitian ini diperoleh dan telah diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Proses identifikasi terdiri dari uji pewarnaan Gram, uji katalase, penanaman bakteri pada medium BAP, dan uji bacitracin.

5.1.1.1 Pewarnaan Gram



Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan Gram *Streptococcus pyogenes*

Keterangan: tanda panah menunjukkan bakteri *Streptococcus pyogenes* berbentuk rantai kokus berwarna merah. Hasil pengecatan Gram dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali

5.1.1.2 Uji Katalase

Hasil uji katalase pada bakteri *Streptococcus* menunjukkan hasil negatif karena tidak terlihat adanya gelembung udara yang menandakan terjadi reaksi perubahan hidrogen peroksida menjadi H_2O dan O_2 oleh bakteri uji.



Gambar 5.2 Hasil Uji Katalase *Streptococcus pyogenes*

Keterangan: Gambar diatas menunjukkan katalase negatif pada gambar B karna tidak terdapat gelembung udara pada saat koloni bakteri ditetesi hidrogen peroksida.

5.1.1.3 Penanaman Bakteri Media BAP dan Uji Bacitracin



Gambar 5.3 Hasil penanaman bakteri dalam media BAP dan uji bacitracin

Penanaman Bakteri *Streptococcus pyogenes* ditanam dalam medium BAP dan cakram antibiotik bacitracin ditempelkan di area yang telah distreking pada plate. Hasil uji penanaman bakteri pada media BAP menunjukkan bahwa *Streptococcus* tersebut type β hemolitik karena di sebagian media BAP tampak translusen atau berwarna bening. Uji cakram bacitracin menunjukkan bakteri *Streptococcus pyogenes* membuat zona inhibisi di sekitar cakram di area plate yang tampak translusen. Hasil uji cakram menunjukkan bahwa bakteri yang di uji ini merupakan *Streptococcus pyogenes* atau bisa disebut juga *Streptococcus* group A (Gambar 5.3).

5.1.1.4 Hasil Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis



Gambar 5.4 Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis

Ekstrak kulit buah jeruk nipis dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebanyak 100 gram menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Gambar 5.4 diatas menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah jeruk nipis berwarna hitam dan keruh dengan konsistensi kental.

5.1.1.5 Hasil Penelitian Pendahuluan

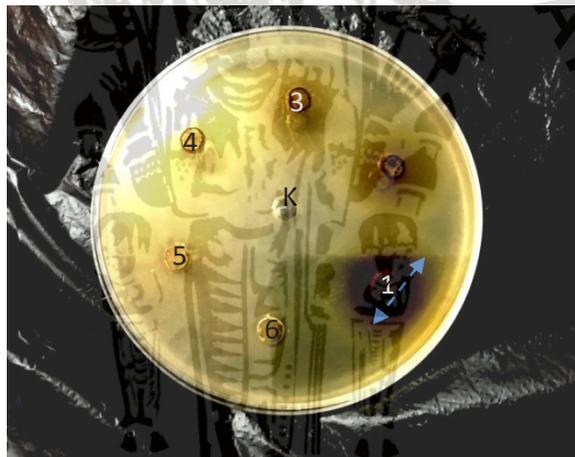
Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis yang akan digunakan pada penelitian difusi sumuran yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%. Daya antimikroba ditandai adanya zona hambat pertumbuhan bakteri di sekeliling sumuran. Penelitian pendahuluan menghasilkan zona hambat di konsentrasi 100% dan 50%. Hasil ini dapat diamati pada gambar 5.6. Selanjutnya untuk penelitian inti digunakan konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, dan 50%.

5.1.1.6 Hasil Difusi Sumuran

Penentuan zona hambat menggunakan difusi sumuran pada penelitian ini dilakukan dengan mengamati terbentuknya zona hambat pertumbuhan bakteri yang ada disekeliling sumuran. Zona hambat yang dihasilkan mempunyai bentuk lingkaran dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,1 mm.

Konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis yang digunakan adalah 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, dan 0%. Hasil difusi sumuran dapat diamati pada Gambar

5.7.



Gambar 5.5 Hasil Penelitian Pendahuluan Menggunakan Metode Difusi Sumuran

Keterangan: tanda panah menunjukkan lebar zona hambatan

Keterangan gambar 5.6 :

1. : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 100% dengan rerata zona hambat 17.3 mm
2. : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 50% dengan rerata zona hambat 14.5 mm
3. : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 25% dengan rerata zona hambat 10 mm
4. : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 12.5% dengan rerata zona hambat 4 mm
5. : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 6.25% dengan rerata zona hambat 2 mm
6. : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 3.125% dengan rerata zona hambat 0 mm
- K : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 0% dengan rerata zona hambat 0 mm



Gambar 5.6 Hasil Difusi Sumuran Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Nipis 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% dan 0% .

Keterangan Gambar

- 1. : Konsentrasi ekstrak jeruk nipis 100% dengan rerata zona hambat 16.72 mm
- 2. : Konsentrasi ekstrak jeruk nipis 90% dengan rerata zona hambat 16.39 mm
- 3. : Konsentrasi ekstrak jeruk nipis 80% dengan rerata zona hambat 15.10 mm
- 4. : Konsentrasi ekstrak jeruk nipis 70% dengan rerata zona hambat 14.85 mm
- 5. : Konsentrasi ekstrak jeruk nipis 60% dengan rerata zona hambat 14.55 mm
- 6. : Konsentrasi ekstrak jeruk nipis 50% dengan rerata zona hambat 13.81 mm
- K : Konsentrasi ekstrak etanol akar gantung beringin 0% dengan rerata zona hambat 0
- A : Pengulangan Uji Difusi Sumuran I
- B : Pengulangan Uji Difusi Sumuran II
- C : Pengulangan Uji Difusi Sumuran III
- D : Pengulangan Uji Difusi Sumuran IV

Gambar 5.6 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 nipis maka semakin besar zona hambat yang terbentuk.

5.1.1.7 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri

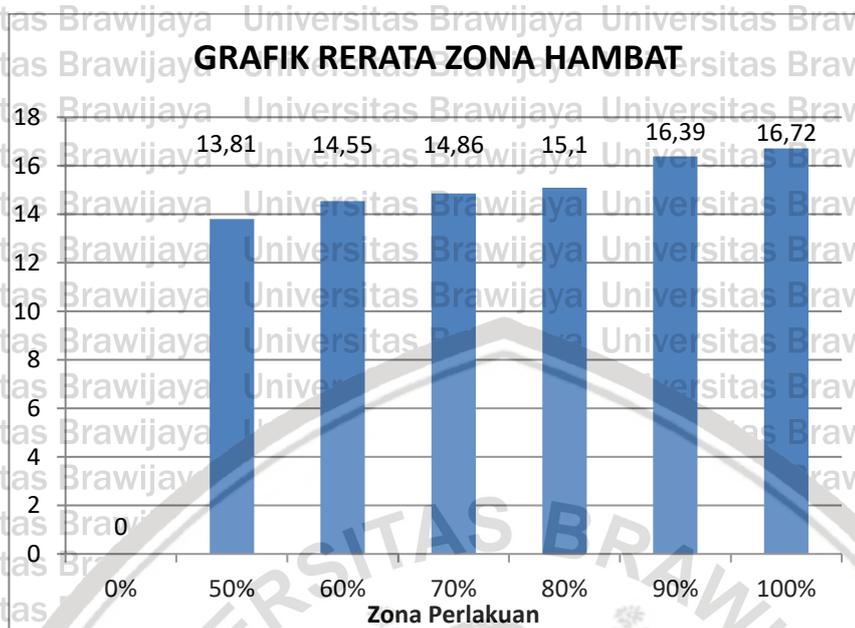
Penelitian ini dilakukan dengan berbagai macam konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis konsentrasi yang digunakan adalah 100%,90%,80%,70%,60%,50%,dan 0%. Penentuan pemberian ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* dilakukan dengan metode difusi sumuran dengan menggunakan *brain heart infusion agar*, diberi lubang yang ditetesi dengan ekstrak kulit buah jeruk nipis dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Perbedaan daya antimikroba ditentukan dengan besar diameter zona hambat pertumbuhan bakteri yang terbentuk pada *brain heart infusion agar* yang telah dicampur dengan isolat bakteri *Streptococcus pyogenes*.

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 antimikrobanya. Berdasarkan hasil uji difusi sumuran dapat diukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dan dapat ditentukan besar zona hambat pada masing-masing konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Hasil perhitungan zona hambat ekstrak kulit buah jeruk nipis disajikan dalam Tabel 5.1

Tabel 5.1 Rata-Rata Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus pyogenes* Berdasarkan Konsentrasi Ekstrak dari Kulit Buah Jeruk Nipis

Konsentrasi (%)	Zona Hambatan Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis				Rerata (mm)
	I	II	III	IV	
0%	0	0	0	0	0
50%	13.7	13.975	13.8	13.775	13.81
60%	14.4	14.375	14.725	14.7	14.55
70%	14.1	15.2	14.9	15.22	14.86
80%	14.85	14.65	15.3	15.6	15.10
90%	16.125	16.6	16.35	16.47	16.39
100%	16.25	16.1	16.975	17.55	16.72

Tabel 5.2 Grafik Rerata Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus pyogenes* pada Ekstrak Kulit Buah Jeruk nipis



Berdasarkan Tabel 5.2 dan Gambar 5.8 di atas dapat dilihat adanya perbedaan rerata diameter zona hambatan yang menunjukkan adanya perbedaan daya antimikroba masing-masing perlakuan. Kelompok kontrol akuades tidak menunjukkan adanya daya antimikroba. Kelompok perlakuan 100% menunjukkan zona hambatan yang terbesar dengan rerata 16,72 mm. Ekstrak kulit jeruk nipis dengan konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% menghasilkan zona hambatan yang menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah jeruk nipis dengan konsentrasi tersebut memiliki daya antimikroba untuk menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.

5.2 Analisis Data

Pada penelitian ini, pemberian ekstrak kulit buah jeruk nipis pada media BHIA adalah variabel bebas, sedangkan diameter zona hambatan yang terbentuk disekitar lubang sumuran adalah variabel tergantug. Uji hipotesis komparatif dan

uji hipotesis korelatif yang digunakan dalam menganalisis data pada penelitian ini. Uji hipotesis komparatif dipilih untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan zona hambat yang terbentuk disekitar lubang sumuran yang diberi beberapa konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak. Uji komparatif yang digunakan untuk mengetahui perbedaan rata-rata data lebih dari dua kelompok adalah *One-Way ANOVA*. Syarat uji *One-Way ANOVA* adalah sebaran data sampel harus normal dan varian data harus homogen atau sama.

Langkah pertama dalam menganalisis data adalah melakukan uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov Test* dan uji homogenitas *Levene Test Homogeneity of Variance*. Tujuan dari uji normalitas adalah melihat apakah data sampel penelitian terdistribusi normal atau tidak terdistribusi normal. Hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikansi 0.084 ($p > 0.05$) yang berarti bahwa data tersebut normal. Lalu, uji homogenitas dilakukan untuk melihat apakah kelompok data sampel berasal dari populasi dengan varian sama atau tidak. Hasil uji homogenitas didapatkan nilai signifikansi 4.085 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa variasi tiap sampel tidak homogen atau tidak sama. Karena kedua syarat uji *One-Way ANOVA* tidak dapat terpenuhi, uji komparasi dilakukan dengan metode non parametrik *Kruskal Wallis*. Uji hipotesis korelatif yang digunakan untuk data ini adalah uji *Spearman*.

5.2.1 Uji Asumsi Data

5.2.1.1 Uji *Kruskal Wallis*

Uji non-parametrik *Kruskal Wallis* dilakukan untuk membandingkan beberapa kelompok variabel tidak terikat (konsentrasi ekstrak) dan mengetahui

apakah ada perbedaan yang bermakna antar perlakuan konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis yang satu dengan yang lain (Mehotcheva, 2008). Hasil uji *Kruskal*

Wallis dapat dilihat pada Tabel 5.2

Tabel 5.3 Uji *Kruskal* *Wallis*

<i>Kruskal</i> <i>Wallis</i>	
Chi-Square	20.050
Probabilitas	0.001

Hasil uji *Kruskal* *Wallis* didapatkan nilai signifikansi sebesar $<0,05$ yang menunjukkan bahwa pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis terdapat perbedaan efek yang bermakna terhadap diameter zona hambat yang terbentuk. Hal ini berarti efek penambahan konsentrasi ekstrak berpengaruh secara signifikan terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

5.2.1.2 Uji *Mann* *Whitney*

Uji *Mann* *Whitney* digunakan untuk mengetahui perbedaan median dua kelompok bebas yang dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis. Pada uji ini kita dapat mengetahui apakah perbedaan antar konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis memberikan pengaruh yang bermakna atau tidak.

Tabel 5.4 Uji *Mann*-*Whitney*

	50%	60%	70%	80%	90%	100%
50%	-	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021
60%	0.021*	-	0.083	0.083	0.021	0.021
70%	0.021*	0.248	-	0.564	0.021	0.021
80%	0.021*	0.083	0.564	-	0.021	0.021
90%	0.021*	0.025	0.025	0.021	-	0.773
100%	0.021*	0.025	0.025	0.021	0.773	-

Keterangan:

* = Berbeda signifikan ($P < 0,05$)

□ = Berbeda tidak signifikan ($P > 0,05$)

Hasil dari uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa antara konsentrasi satu dengan yang lain tidak memiliki perbedaan yang bermakna kecuali konsentrasi 50% memiliki perbedaan yang bermakna.

5.2.1.3 Uji Korelasi *Spearman*

Selanjutnya, dilakukan uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui keeratan hubungan antara konsentrasi pemberian ekstrak kulit buah jeruk nipis dengan diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil uji korelasi *Spearman* (Tabel 5.4) menunjukkan nilai signifikansi antara kedua variabel tersebut adalah 0,000 ($p < 0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang bermakna antara pemberian ekstrak dengan diameter zona hambat. Besar koefisien korelasi adalah 0.925 yang berarti bahwa hubungan korelasi kuat. Tanda positif (searah) koefisien menunjukkan hubungan berbanding lurus, yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk dan sebaliknya.

Tabel 5.5 Korelasi Konsentrasi dan Diameter Zona Hambat

Parameter	Parameter	Korelasi	P-value
Konsentrasi	Diameter Zona Hambat	0.925	0.000



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Hasil Identifikasi

Tujuan dilakukannya penelitian eksperimental ini adalah untuk mengetahui adanya efek antimikroba ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode difusi sumuran. Metode tersebut digunakan untuk dapat menentukan pada konsentrasi berapa ekstrak kulit buah jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*. Hal tersebut dilakukan dengan cara mengukur zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dengan menggunakan jangka sorong. Zona hambat yang terlihat bening tersebut menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri uji.

Streptococcus pyogenes yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum bakteri ini digunakan untuk penelitian, dilakukan beberapa uji identifikasi terlebih dahulu untuk memastikan kemurnian bakteri *Streptococcus pyogenes* yang akan digunakan dalam penelitian. Identifikasi tersebut meliputi pewarnaan Gram, uji katalase, penanaman bakteri pada media BAP, dan uji bacitracin.

Hasil identifikasi secara pengecatan Gram didapatkan gambaran bakteri berbentuk bulat berantai berwarna merah yang artinya bakteri ini merupakan bakteri Gram positif. Hasil dari katalase pada bakteri *Streptococcus pyogenes* didapatkan hasil negatif dengan ditandai tidak adanya gelembung-gelembung udara setelah

ditetesi hidrogen peroksidase. Uji identifikasi penanaman bakteri medium BAP didapatkan koloni *Streptococcus pyogenes* membuat sebagian *blood agar plate* tampak bening karena memiliki sifat β -hemolitik. Identifikasi dilanjutkan dengan uji cakram antibiotik bacitracin. Bakteri *Streptococcus pyogenes* ditanam dalam medium BAP dan cakram antibiotik bacitracin ditempelkan di area yang telah distreking pada *blood agar plate*. Hasil uji cakram bacitracin menunjukkan bakteri *Streptococcus pyogenes* membuat zona inhibisi di sekitar cakram di *area blood agar plate* yang tampak translusen. Hasil uji cakram menunjukkan bahwa bakteri yang di uji bacitracin ini merupakan *Streptococcus pyogenes* atau bisa disebut juga *Streptococcus* tipe A.

6.2 Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Ekstrak kulit buah jeruk nipis dibuat dengan cara mengekstrak kulit buah jeruk nipis dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarutnya. Metode maserasi dipilih karena menghindari terjadinya kerusakan komponen pada ekstrak yang tidak tahan terhadap panas, prosesnya yang mudah, relatif murah. Etanol dipilih karena bersifat semipolar sehingga dapat melarutkan zat kimia yang bersifat polar maupun non polar (Haditomo, 2010). Pelarut etanol 96% digunakan untuk melarutkan saponin, tannin, alkaloid, flavanoid, polifenol dan tidak mempunyai efek sebagai antimikroba. Hasil ekstrak yang diperoleh yaitu cairan pekat 50 ml berwarna hijau tua, mengandung endapan kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang didapatkan adalah 100% bersifat keruh terhadap endapan, kemudian untuk memisahkan cairan dan endapannya dilakukan

proses sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit. Setelah dilakukan proses sentrifugasi, ekstrak yang didapatkan tetap keruh dan masih terdapat endapan sehingga tidak bisa dilakukan penelitian dengan metode dilusi tabung, karena itu peneliti menggunakan metode difusi sumuran untuk membuktikan bahwa ekstrak kulit jeruk (*Citrus aurantifolia*) dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*. Kulit buah jeruk nipis ini didapatkan di Matreria Medika Batu, sedangkan proses pengekstraksinya dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Banyaknya bubuk kulit jeruk nipis yang digunakan adalah 100 gram. Ekstrak kulit jeruk nipis sendiri memiliki bahan aktif seperti alkaloid, saponin, tannin, polifenol dan flavonoid yang dapat digunakan sebagai antimikroba (Nogota, et al.,2006).

Bahan aktif dalam ekstrak kulit buah jeruk nipis seperti alkaloid, tannin, flavonoid, dan saponin memiliki efek antimikroba yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Alkaloid dapat menurunkan sintesis asam nukleat bakteri dengan menghambat enzim topoisomerase I dan II selain itu alkaloid juga bisa memiliki kemampuan untuk mengganggu regulasi gen dan mengganggu fimbriae dan adhesin bakteri sehingga dapat membunuh bakteri (Cushine, et al., 2014). Tannin sebagai antimikroba bekerja dengan melarutkan lapisan lipid dinding bakteri sehingga menyebabkan kebocoran sel dan bakteri menjadi hancur selain itu, tannin juga merubah susunan hidrogen dan membentuk kompleks dengan nitrogen dari asam amino pada sel bakteri sehingga menyebabkan kebocoran sel dan mati (Al-Ani, et al., 2008). Aktivitas antimikroba saponin berhubungan dengan kemampuannya merubah fungsi glikoprotein membran plasma

dan membentuk kompleks saponin-kolestrol sehingga mengganggu organisasi membran fosfolipid dan menyebabkan bakteri lisis (Hassan, 2008). Flavonoid bekerja dengan menghambat enzim DNA girase, fungsi membran sitoplasmik, dan metabolisme energi sehingga bakteri kehilangan fungsi vitalnya dan mati (Cushnie and Lamb, 2005). Penelitian sebelumnya telah menganalisis analisis kandungan flavonoid dalam jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang dilakukan dengan menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), menunjukkan bahwa kandungan flavonoid yang terdapat dalam jeruk nipis adalah flavonone glikosida yaitu eriocitrin (49-62 mg L⁻¹), hesperidin (84-196 mg L⁻¹) (Mouly, 1994).

Dari penjelasan tersebut dapat disimpulkan bahwa kandungan alkaloid, tannin, flavonoid, polifenol dan saponin yang ada pada ekstrak kulit buah jeruk nipis memiliki efek antimikroba, sehingga kulit jeruk nipis dapat digunakan sebagai obat yang bersifat antimikroba.

Konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 100 %, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% dan 0% sebagai kontrol negatif. Konsentrasi tersebut ditentukan berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan.

Langkah penelitian selanjutnya adalah menguji aktivitas antimikroba ekstrak kulit buah jeruk nipis terhadap *Streptococcus pyogenes*. Pengamatan kuantitatif dilakukan dengan menghambat diameter zona hambat yang terbentuk disekitar lubang sumuran yang diberi ekstrak. Pengukuran diameter zona hambat tersebut menggunakan jangka sorong dalam satuan millimeter (mm). Hasil dari uji tersebut menunjukkan bahwa zona hambat terbentuk disekitar lubang sumuran pada

konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, dan 50%. Diameter terkecil terbentuk pada konsentrasi 50% sebesar 13,81 mm yang menunjukkan bahwa terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri uji.

6.3 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan uji *Kolmogrov-Smirnov* untuk mengetahui kenormalan pengaruh ekstrak kulit buah jeruk nipis terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Dari hasil uji *Kolmogrov-Smirnov* menghasilkan probabilitas $> \alpha$ ($p > 0,05$) sehingga dinyatakan normal. Uji analisis selanjutnya yang digunakan adalah *Levene Test* untuk mengetahui apakah memiliki ragam yang homogen atau tidak, dari hasil *Levene Test* menunjukkan probabilitas $< \alpha$ ($p < 0,05$) dinyatakan tidak memiliki ragam yang homogen. Setelah dilakukan uji normalitas dan uji homogen dilanjutkan uji *Kruskal Wallis*.

Uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan pemberian berbagai konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Hasil uji *Kruskal Wallis* didapatkan nilai yang berbeda signifikan sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis terhadap perbedaan efek yang bermakna terhadap diameter zona hambat yang terbentuk. Setelah uji *Kruskal Wallis* yang digunakan adalah uji *Mann whitney* untuk mengetahui apakah perbedaan antar konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis memberikan pengaruh yang bermakna atau tidak. Hasil menunjukkan bahwa antara konsentrasi satu dengan yang lain memiliki perbedaan yang tidak bermakna kecuali konsentrasi 50% memiliki pertumbuhan bakteri yang paling rendah dan berbeda signifikan. Setelah dilakukan uji *Mann*

Whitney yang digunakan adalah uji Kolerasi *Spearman* untuk mengetahui keeratan hubungan antara konsentrasi pemberian ekstrak kulit buah jeruk nipis dengan diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang bermakna yang kuat antara pemberian ekstrak dengan diameter zona hambat. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk.

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data, disimpulkan bahwa ekstrak kulit buah jeruk nipis memiliki efek antimikroba terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*. Zona hambat terbentuk di sekitar lubang sumuran pada konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis sebesar 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, dan 50%. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis yang digunakan, semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk. Efek penambahan konsentrasi ekstrak tersebut berpengaruh secara signifikan terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Dari penjelasan diatas, maka ekstrak kulit buah jeruk nipis, sesuai dengan hipotesa, dapat digunakan sebagai antimikroba.

Penelitian lainnya mengenai efek antimikroba dari ekstrak kulit buah jeruk nipis pernah dilakukan sebelumnya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* menggunakan metode difusi cakram. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah jeruk nipis memiliki efek antimikroba pada *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 60%, dan 70%. Rata-rata zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi tersebut secara berurutan adalah sebesar 9,25 mm, 13,50 mm, 15,37 mm, 20,00 mm, dan 20,25 mm (Vajriana, 2013). Selain itu, ekstrak kulit buah jeruk nipis sebagai antimikroba juga pernah diuji dengan bakteri *Escherichia*

coli menggunakan metode Kirby-Bauer. Hasil penelitian tersebut menunjukkan ekstrak kulit buah jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Pada konsentrasi terendah, yaitu 20%, terbentuk zona hambat sebesar 6,95 mm (Sutrisno, 2017).

Ekstrak kulit buah jeruk nipis dengan konsentrasi 50% juga dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit buah jeruk nipis juga memiliki efek antijamur (Putri, 2014).

Menurut Prakoso, dkk, tingkat sensitivitas ekstrak antimikroba dapat dikategorikan berdasar zona hambat yang terbentuk menjadi kuat, sedang, dan lemah. Suatu antimikroba herbal dikatakan berefek yang kuat bila diameter zona hambat yang terbentuk adalah 10-20 mm, berefek sedang bila diameter 5-10 mm, dan berefek lemah bila diameter <5 mm (Prakoso, dkk, 2016). Rata-rata zona hambat yang terbentuk pada penelitian ini adalah berkisar 13,8 mm sampai dengan 16,7 mm.

Ekstrak kulit buah jeruk nipis dengan konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60% memiliki efek antimikroba yang kuat, sedangkan konsentrasi 50% memiliki konsentrasi yang sedang.

6.4 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini masih memiliki beberapa keterbatasan, seperti tidak diketahui secara pasti kandungan dan seberapa banyak bahan aktif yang ada dalam ekstrak kulit buah jeruk nipis. Selain itu, juga tidak diketahui bahan aktif mana yang paling berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Serta penelitian metode sumuran ini juga tidak bisa menentukan kadar hambat minimal

(KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) dari ekstrak kulit buah jeruk nipis terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

Pada penelitian ini masih perlu dilakukan uji lebih lanjut untuk meneliti efek toksik, efek samping, farmakodinamik, dan farmakokinetik dari ekstrak kulit buah jeruk nipis agar ekstrak kulit buah jeruk nipis bisa diaplikasikan secara klinis sebagai obat pada manusia.



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa:

Ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terbukti mempunyai efek antimikroba terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

7.2 Saran

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya adalah:

- a. Diharapkan dapat dilakukan penelitian lain mengenai efek antimikroba ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) pada bakteri lain, jamur, ataupun virus.
- b. Diperlukan uji mengenai efek toksik dan efek samping ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) agar nantinya dapat diaplikasikan secara klinis sebagai obat pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

Anggrahini, Shinta P. 2014. Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai Antifungi terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* secara *In Vitro*. Skripsi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Brooks GF, Butel JS, Carroll KC, Morse SA. 2015. Jawetz, Melnick, & Adelberg's. Medical Microbiology, 27th ED. USA : Mc. Graw Hill.

Cushnie TT dan Lamb AJ. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356

Cushnie TT, Cushnie B dan Lamb AJ. 2014. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 377-386.

Dalimartha S. 2000. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Trubus Agriwidya.

Dahlan S. 2008. Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan. Jakarta: Salemba Medika.

Donna P, Irma S, Mariyam A. 2013. Efek Anti Bakteri Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap *Salmonella typhi* secara *In Vitro*. *Jurnal Efek Anti Bakteri Ekstrak Kulit Jeruk*. 9(2) : 110-115

Dzen M dan Roekistiningsih. 2005. *Bakteriologi Medik*, Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Hassan, SM. 2008. *Antimicrobial activities of saponin-rich guar meal extract*. Texas A&M University.

Hutapea JR. 1994. Inventaris Tanaman Obat Indonesia III. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal 69.

Holden dan Matthew TG. 2009. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. *PLoS pathogens*.

Kanagasabhapathy MH, Sasaki S, Haldar S, Yamasaki dan Nagata S. 2006. Inhibitory activities of surface associated bacteria isolated from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Microbes and Environments*. 20(3): 178-185.

Khan P dan Rafi. 2012. "In vitro antimicrobial activity of *Citrus aurantifolia* and its phytochemical screening." *Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2* : S328 - S331.

Machlin LJ. 1991. Handbook of Vitamins. 2nd Edition. New York: Marci Dekker Inc. hal. 572-575.

Mardiastuti HW, Anis K, Ariyani K, Ikaningsih, et al. 2007. *Emerging Resistance Pathogen: Situasi Terkini di Asia Eropa, Amerika Serikat, Timur Tengah Indonesia*. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 57(3) : 75-79.

Mehotcheva TH. 2008. The Kruskal –Wallis Test. Seminar In Methodology And Statistics.

Mouly PP, Arzouyan CR, Gaydou EM and Estienne JM . 1994. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavonone glycosides. *J. Agric. Food Chem*. 42: 70-79.

Mustafa dan Murtaza. 2015. Farangitis. *Konsiderasi Diagnosa Perawatan Antibiotik Empiris*. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*. 14(5): 110-116.

Rahmawati Y. 2015. Peta Kuman Dan Resistensinya Terhadap Antibiotika Pada Pasien Faringitis Di Rsud Dr. Moewardi Tahun 2014. Disertasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Rukmana R. 2003. Jeruk nipis : prospek agribisnis, budidaya dan pasca panen.

Yogyakarta: kanisius

Sarwono B. 2001. Khasiat dan manfaat jeruk nipis. AgroMedia.

Saxena M, Saxena J, Nema R, Singh D and Gupta A. 2013. Phytochemistry of medicinal plants. *J. Pharm. Phytochem.* 1(6):168 – 82.

Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Review Article Number 63. Phytochemistry.* 30(12): 3875-3883.

Sholihah dan Istiqamatush. 2015. Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Dan Infusa Daun Kupu-Kupu (*Bauhinia variegata*) Terhadap Bakteri *Streptococcus pyogenes*. Disertasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Silvia SP dan Ferry F. 2017. Review Artikel: Kandungan dan Aktivitas Farmakologi Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* s.). *Suplemen.* 15(2).

Solimun. 2001. Metode Penelitian Kuantitatif. *Bandung* : Penerbit Alfabeta.

Soleha dan Umiana T. 2009. Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik. *Jurnal Kedokteran Universitas Lampung* 5.9: 119-123.

Todar M. 2004. *Streptococcus pyogenes* in Web Review of Todar's online textbook of Bacteriology-The Good, the bad and the deadly. *Science Magazine*, Vol. 304, 1-12.

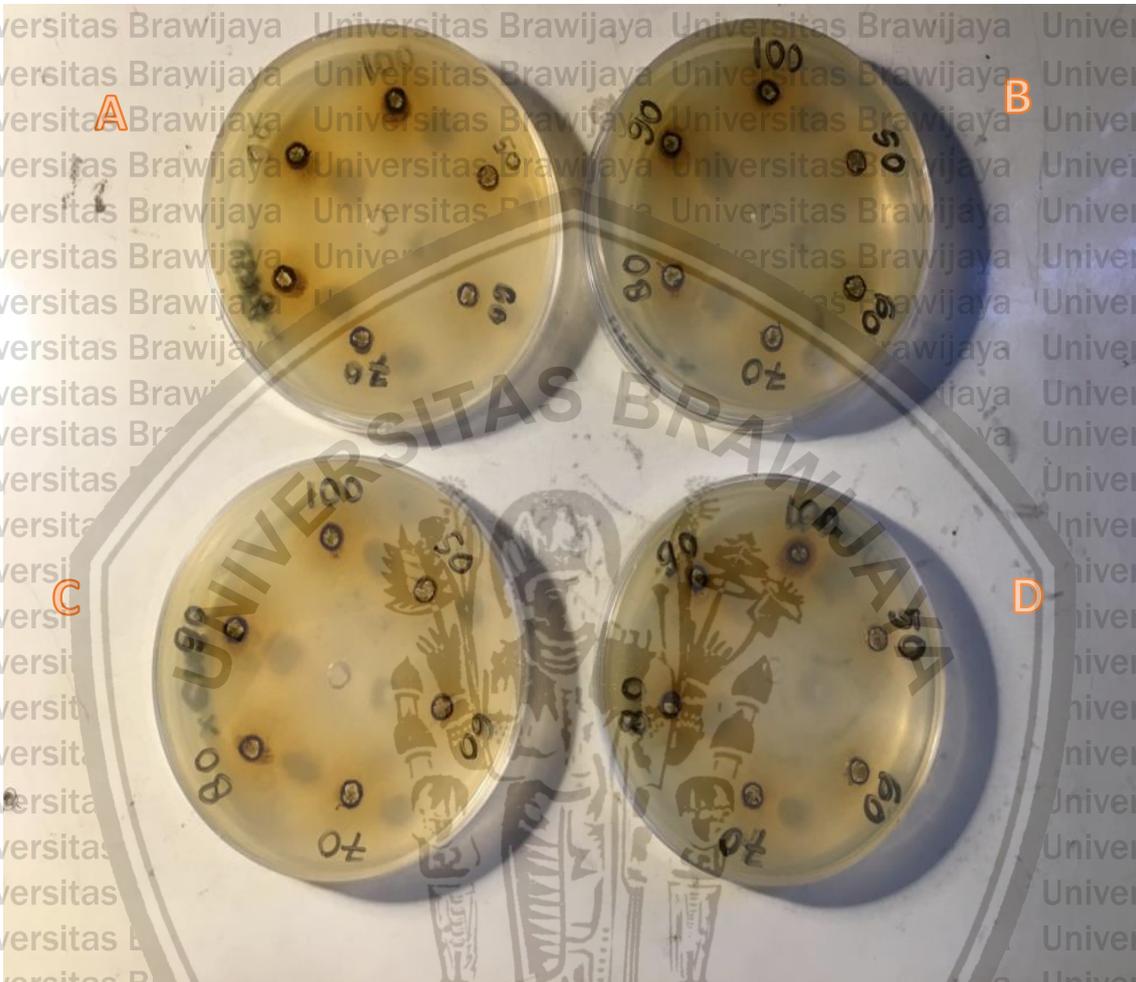
Vajriana E. 2013. Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Terhadap Isolat *Staphylococcus Aureus* Secara In Vitro. Skripsi. Universitas Syiah Kuala Banda Aceh.

Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. 2015. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry.* 22: 132 – 149.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Penelitian Inti Metode Sumuran



Zona Hambat bakteri *Streptococcus pyogenes* terhadap Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis

Lampiran 2

Alat dan Bahan Penelitian



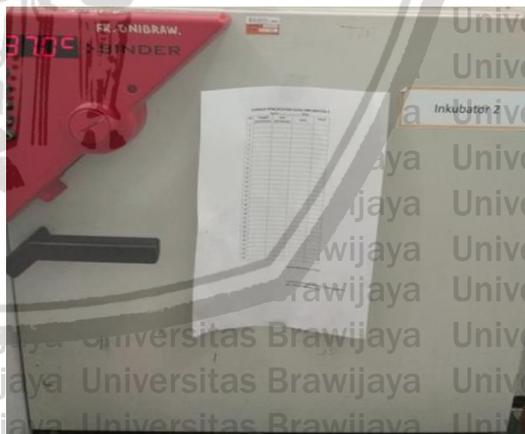
Pipet mikro



Vortex



Jangka Sorong



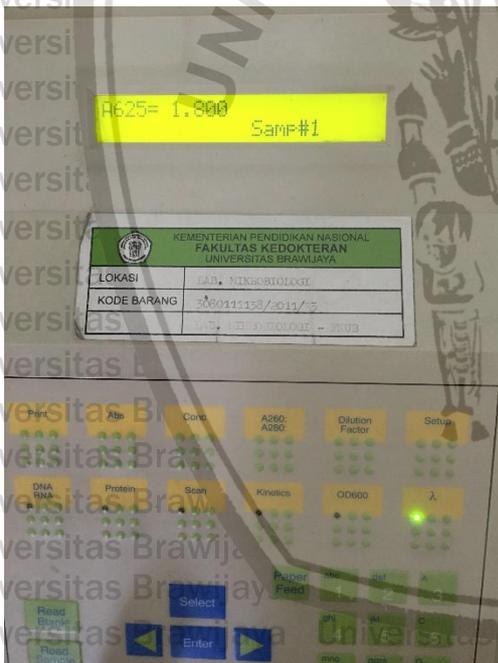
Inkubator



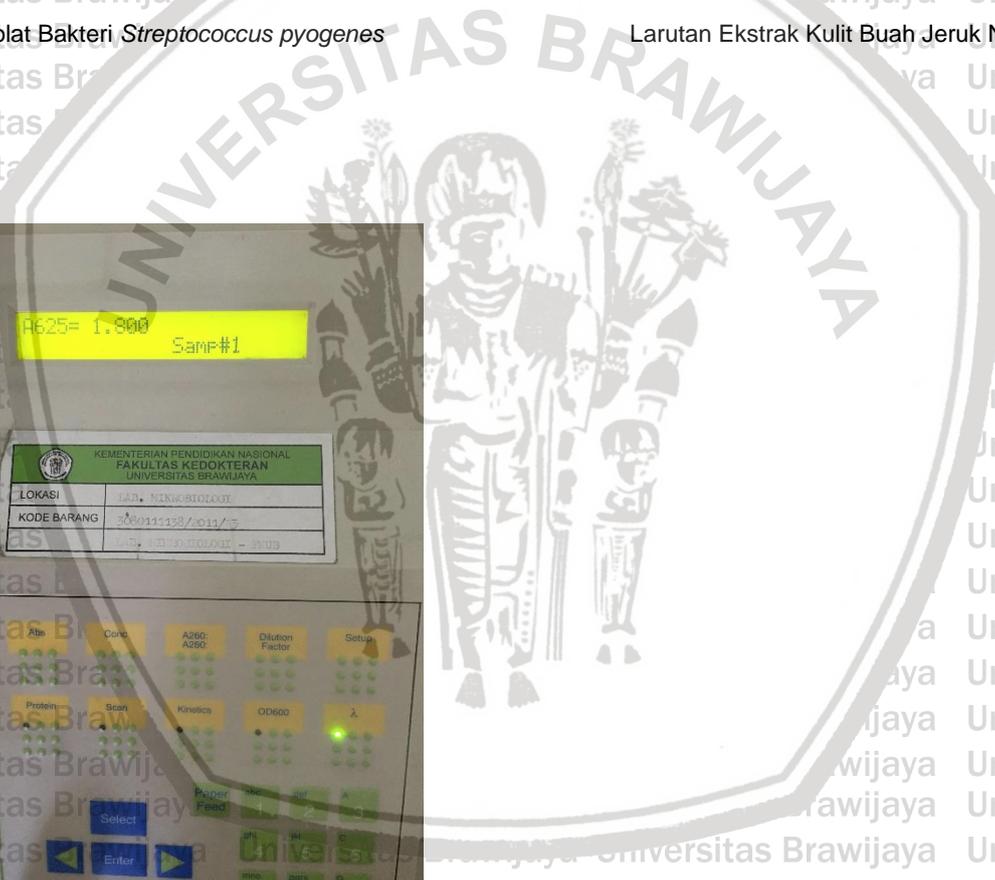
Isolat Bakteri *Streptococcus pyogenes*



Larutan Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis



Spektrofotometer



Lampiran 3. Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y	.084	24	.200	.985	24	.968

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Pertumbuhan Bakteri

F	df1	df2	Sig.
4.085	5	18	.012

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + X1.1

Lampiran 4. Kruskal Wallis Test

Ranks

	X1.1	N	Mean Rank
Pertumbuhan Bakteri	50%	4	2.50
	60%	4	8.00
	70%	4	11.00
	80%	4	12.50
	90%	4	20.25
	100%	4	20.75
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

	Pertumbuhan Bakteri
Chi-Square	20.050
df	5
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: X1.1

Lampiran 5. Pengujian Multiple Comparison (Post Hoc) – Mann Whitney

Uji Mann-Whitney

	50%	60%	70%	80%	90%	100%
50%	-	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021
60%	0.021*	-	0.083	0.083	0.021	0.021
70%	0.021*	0.248	-	0.564	0.021	0.021
80%	0.021*	0.083	0.564	-	0.021	0.021
90%	0.021*	0.025	0.025	0.021	-	0.773
100%	0.021*	0.025	0.025	0.021	0.773	-

Tabel 5.2 Nilai signifikansi (p) dari hasil Uji Mann-Whitney

Keterangan:

* = Berbeda signifikan ($P < 0,05$)□ = Berbeda tidak signifikan ($P > 0,05$)

Lampiran 6. Korelasi Spearman

Analisis Korelasi Spearman

		Correlations	
		Pertumbuhan Bakteri	Konsentrasi
Pertumbuhan Bakteri	Spearman Correlation	1	.921**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	24	24
Konsentrasi	Spearman Correlation	.921**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	25	25

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

