



UJI EFEKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL KULIT JERUK NIPIS

***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle TERHADAP BAKTERI**

***Staphylococcus aureus* SECARA IN VITRO**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



Oleh:

Grecella Janeta Agape

NIM 155070607111012

PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN

JURUSAN KEBIDANAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019



DAFTAR ISI

| | Halaman |
|-----------------------------------------------------|----------|
| Judul | i |
| Halaman Pengesahan | ii |
| Kata Pengantar | iii |
| Abstrak | vi |
| Abstract | vii |
| Daftar Isi | viii |
| Daftar Tabel | xii |
| Daftar Gambar | xiii |
| Daftar Lampiran | xiv |
| Daftar Singkatan | xv |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 4 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | 5 |
| 2.1.1 Klasifikasi | 6 |
| 2.1.2 Morfologi dan Identifikasi | 6 |
| 2.1.3 Struktur Antigen | 7 |
| 2.1.4 Toksin dan Enzim | 8 |
| 2.1.4.1 Katalase | 9 |
| 2.1.4.2 Koagulase | 9 |
| 2.1.4.3 Eksotoksin | 9 |
| 2.1.4.4 Lekosidin | 10 |
| 2.1.4.5 Toksin Epidermolitik atau Eksfoliatin | 10 |
| 2.1.4.6 <i>Toxic Shock Syndrome Toxin</i> | 11 |
| 2.1.4.7 Enterotoksin | 11 |
| 2.1.5 Patogenesis | 11 |
| 2.1.6 Gejala Klinis | 12 |



| | |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.7 Uji Laboratorium Diagnosa | 13 |
| 2.1.7.1 Spesimen | 13 |
| 2.1.7.2 Biakan | 14 |
| 2.1.7.3 Uji Katalase | 14 |
| 2.1.7.4 Uji Koagulase | 14 |
| 2.1.7.5 Uji Serologi dan Penentuan Tipe | 15 |
| 2.1.8 Resistensi <i>Staphylococcus aureus</i> terhadap Antibiotika | 15 |
| 2.1.9 Terapi Infeksi | 17 |
| 2.1.10 Pencegahan | 18 |
| 2.2 Mastitis | 18 |
| 2.2.1 Etiologi | 19 |
| 2.2.2 Jenis Mastitis | 19 |
| 2.2.2.1 Nonlaktasional | 19 |
| 2.2.2.2 Laktasional | 20 |
| 2.2.3 Patofisiologi Mastitis | 21 |
| 2.2.4 Manifestasi Klinis Mastitis | 22 |
| 2.2.5 Penatalaksanaan dan Terapi Mastitis | 22 |
| 2.3 Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>) | 23 |
| 2.3.1 Klasifikasi | 24 |
| 2.3.2 Morfologi | 25 |
| 2.3.3 Lingkungan Tumbuh | 25 |
| 2.3.4 Kandungan | 26 |
| 2.3.5 Kandungan Zat Aktif yang Bersifat Antimikroba | 27 |
| 2.3.6 Manfaat | 28 |
| 2.4 Antimikroba | 29 |
| 2.4.1 Mekanisme Kerja Antimikroba | 29 |
| 2.4.2 Uji Sensitivitas Antimikroba <i>In Vitro</i> | 31 |
| 2.4.2.1 Metode Dilusi | 31 |
| 2.4.2.2 Metode Difusi | 32 |
| 2.5 Ekstraksi | 34 |
| 2.5.1 Metode Ekstraksi | 34 |
| 2.5.1.1 Cara Dingin | 34 |
| 2.5.1.2 Cara Panas | 35 |



| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN | 37 |
| 3.1 Kerangka Konsep Penelitian | 37 |
| 3.2 Deskripsi Kerangka Konsep | 38 |
| 3.3 Hipotesis Penelitian | 38 |
| BAB 4. METODE PENELITIAN | 39 |
| 4.1 Desain Penelitian | 39 |
| 4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian | 39 |
| 4.3 Sampel Penelitian | 39 |
| 4.4 Besar Sampel dan Pengulangan | 40 |
| 4.5 Variabel Penelitian | 40 |
| 4.5.1 Variabel Bebas | 41 |
| 4.5.2 Variabel Tergantung | 41 |
| 4.6 Definisi Operasional | 41 |
| 4.7 Alat dan Bahan Penelitian | 43 |
| 4.7.1 Alat dan Bahan Uji Identifikasi Bakteri | 43 |
| 4.7.2 Alat dan Bahan Pembuatan Suspensi Bakteri | 44 |
| 4.7.3 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis | 44 |
| 4.7.4 Alat dan Bahan Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis | 45 |
| 4.8 Prosedur Penelitian | 46 |
| 4.8.1 Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> | 46 |
| 4.8.1.1 Inokulasi Pada <i>Nutrient Agar Plate</i> | 46 |
| 4.8.1.2 Pewarnaan Gram | 46 |
| 4.8.1.3 Uji Katalase | 47 |
| 4.8.1.4 Uji Koagulase | 47 |
| 4.8.1.5 Perbenihan Pada <i>Mannitol Salt Agar (MSA)</i> | 48 |
| 4.8.2 Pembuatan Suspensi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 48 |
| 4.8.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis | 49 |
| 4.8.4 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis | 50 |
| 4.8.5 Uji Antimikroba Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>) | 51 |
| 4.8.6 Alur Kerja Penelitian | 53 |
| 4.8.7 Analisis Data | 54 |
| BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA | 55 |
| 5.1 Hasil Penelitian | 55 |
| 5.1.1 Hasil Ekstraksi Etanol Kulit Jeruk Nipis | 55 |



| | |
|---------------------------------------------|-----------|
| 5.1.2 Hasil Uji Fitokimia | 55 |
| 5.1.3 Hasil Identifikasi Bakteri | 56 |
| 5.1.4 Hasil Penelitian Pendahuluan I | 58 |
| 5.1.5 Hasil Penelitian Pendahuluan II | 59 |
| 5.1.6 Hasil Uji Antibakteri | 60 |
| 5.2 Analisis Data | 64 |
| 5.2.1 Uji Normalitas | 64 |
| 5.2.2 Uji <i>Kruskal-Wallis</i> | 65 |
| 5.2.3 Uji <i>Mann-Whitney</i> | 65 |
| 5.2.4 Uji <i>Spearman</i> | 66 |
| BAB 6 PEMBAHASAN | 68 |
| BAB 7 PENUTUP | 76 |
| 7.1 Kesimpulan | 76 |
| 7.2 Saran | 76 |
| DAFTAR PUSTAKA | 78 |
| LAMPIRAN | 83 |

HALAMAN PENGESAHAN

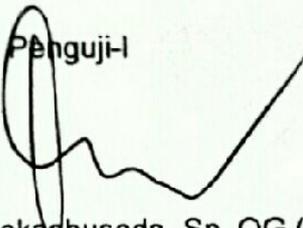
TUGAS AKHIR

**UJI EFEKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL KULIT JERUK NIPIS
Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle TERHADAP BAKTERI
Staphylococcus aureus SECARA IN VITRO**

Oleh:

**Grecella Janeta Agape
NIM 155070607111012**

Telah diuji pada
Hari: Rabu
Tanggal: 08 Mei 2019
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I


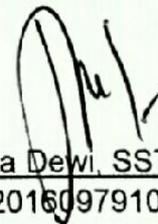
dr. Subandi Rekschusodo, Sp. OG (K)
NIK. 2013087602111001

Pembimbing-I/Penguji-II,



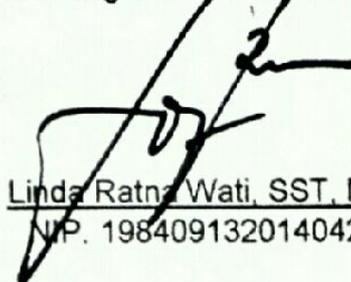
dr. Dewi Erikawati, M.Si
NIP. 198510172009122007

Pembimbing-II/Penguji-III,



Mustika Dewi, SST, M.Keb
NIK. 2016097910052001

Mengetahui,
Ketua Program Studi S1 Kebidanan,



Linda Ratna Wati, SST, M.Kes
NIP. 198409132014042001



ABSTRAK

Agape, Grecella Janeta. 2019. *Uji Efektifitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle terhadap Bakteri Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Tugas Akhir, Program Studi S1 Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Dewi Erikawati, M.Si (2) Mustika Dewi, SST, M.Keb.

Staphylococcus aureus merupakan bakteri yang sering ditemukan pada penderita mastitis. WHO (2013) menyatakan bahwa di negara-negara ASEAN angka kesakitan mastitis mencapai 8,7%. Kulit jeruk nipis mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid yang berpotensi sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan metode difusi sumuran untuk menentukan zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Sampel yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FKUB, Malang. Konsentrasi yang digunakan adalah 0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, dan *clindamycin* sebagai kontrol positif. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol kulit jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* mulai dari konsentrasi 25% dengan rata-rata diameter zona hambat 2,82 mm. Hasil analisis data dengan Uji *Kruskal-Wallis* ($p=0.000$) menunjukkan adanya perbedaan pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis terhadap diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil Uji *Spearman* ($p=0.000$, $r=0.965$) menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk nipis memiliki efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

Kata kunci: Kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), antibakteri, *Staphylococcus aureus*, difusi sumuran.



ABSTRACT

Agape, Grecella Janeta. 2019. Antibacterial Effectiveness Test of Ethanol Extract of *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle Peel Against *Staphylococcus aureus* In Vitro. Final Assignment, Midwifery Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Dewi Erikawati, M.Si (2) Mustika Dewi, SST, M.Keb.

Staphylococcus aureus is a bacterium that is often found in people with mastitis. WHO (2013) states that in ASEAN countries, mastitis morbidity rate reaches 8.7%. Lime peel (*Citrus aurantifolia*) contains flavonoids, tannins, saponins and alkaloids that have potential as antibacterial. This study was aimed to prove that the ethanol extract of lime peel has an antibacterial effect on *Staphylococcus aureus*. This research was a laboratory experimental study with a well diffusion method to determine the inhibition zone formed around the well hole. The sample used was *Staphylococcus aureus* that obtained from The Microbiology Laboratory, Medical Faculty of Brawijaya University, Malang. The concentrations used were 0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, and *clindamycin* as positive controls. The results showed that ethanol extract of lime peel can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* started from concentration 25% with an average diameter of the inhibition zone 2.82 mm. The results of Kruskal-Wallis Test ($p = 0.000$) indicated that there was a difference in each concentration of lime peel ethanol extract on the diameter of the inhibition zone formed. The results of Spearman Test ($p = 0.000$, $r = 0.965$) indicated that the higher concentration of extract given will increase the diameter of inhibition zone. It is concluded that the ethanol extract of lime peel has an antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* in vitro.

Keyword: lime peel (*Citrus aurantifolia*), antibacterial, *Staphylococcus aureus*, well diffusion.



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berdasarkan profil kesehatan dunia *World Health Organization* (WHO) 2013, mastitis banyak terjadi di seluruh dunia, di negara-negara ASEAN menunjukkan 8,7% dari 1.590.000 kasus angka kesakitan (Depkes RI, 2013). Pada tahun 2010 angka kejadian mastitis dan puting susu lecet di Indonesia sebesar 55% disebabkan karena perawatan payudara yang tidak benar dan sebesar 46% disebabkan kurangnya perawatan payudara (Depkes RI, 2010).

Mastitis merupakan peradangan payudara pada wanita menyusui yang biasanya terjadi dalam 6 minggu pertama setelah persalinan, paling sering terjadi pada minggu kedua dan ketiga. Mastitis dapat disertai infeksi atau tanpa infeksi. Mastitis tanpa infeksi berupa peradangan jaringan payudara akibat tersumbatnya duktus laktiferus. Bendungan ASI yang tersumbat bila tidak dikeluarkan akan menimbulkan respon inflamasi dan kerusakan jaringan yang memudahkan terjadinya infeksi. Infeksi pada mastitis ditandai dengan masuknya bakteri melalui beberapa cara, yaitu melalui luka puting ke kelenjar limfe sekitar duktus (periduktal), melalui duktus laktiferus ke lobus sekresi, atau melalui penyebaran pembuluh darah. Salah satu bakteri yang paling sering ditemukan pada penderita mastitis adalah *Staphylococcus aureus* (Alasiry, 2013).

Staphylococcus aureus merupakan bakteri koagulase-positif berbentuk bulat yang susunannya tidak beraturan seperti anggur. *Staphylococcus aureus* termasuk flora normal yang terdapat pada kulit dan selaput lendir manusia, namun



ada juga yang bersifat patogen pada tubuh manusia (Brooks *et al.*, 2013).

Staphylococcus aureus menginfeksi manusia melalui invasi jaringan dan pengaruh toksin yang dihasilkan. Infeksi dengan *Staphylococcus aureus* dapat diobati dengan antibiotika. Namun untuk mengetahui antibiotika yang sesuai harus dilakukan kultur bakteri dan uji kepekaan antibiotika karena saat ini sudah banyak *strain Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap berbagai jenis antibiotika (Soedarto, 2015). Hal ini yang mendasari perlunya penemuan zat antibakteri baru yang dapat diperoleh dari senyawa bioaktif dalam tumbuhan, salah satunya jeruk nipis. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan Pathan (2012) dilaporkan bahwa jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Pseudomonas spp.*

Jeruk nipis merupakan salah satu jenis tanaman perdu yang banyak tumbuh di Indonesia. Air perasan jeruk nipis biasanya digunakan untuk memasak makanan, namun juga dapat digunakan untuk mengatasi berbagai penyakit, seperti disentri, sembelit, ambeien, difteri, vertigo, batuk, flu, demam, dan amandel (Agoes, 2010). Kulit jeruk nipis yang biasanya dibuang setelah digunakan air perasannya ternyata memiliki manfaat di dunia kesehatan, yaitu sebagai antibakteri dan antioksidan (Khasanah, 2014). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan Abdullah *et al.*, (2013) menunjukkan kulit jeruk nipis memiliki daya antimikroba terhadap bakteri *Salmonella Typhi* dengan nilai konsentrasi Kadar Hambat Minimum (KHM) 12,5% dan nilai konsentrasi Kadar Bunuh Minimum (KBM) 6,25%. Kulit jeruk nipis memiliki efek antimikroba karena mengandung bahan aktif berupa minyak atsiri, flavonoid, tanin, saponin, fenol, dan alkaloid yang dapat mengganggu permeabilitas membran mikroba (Abdullah *et al.*, 2013).



Berdasarkan uraian di atas dapat diketahui bahwa kulit jeruk nipis dapat digunakan sebagai zat antibakteri. Penelitian mengenai manfaat kulit jeruk nipis sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* masih sedikit dilakukan. Maka dari itu perlu dilakukan penelitian dengan judul uji efektivitas antibakteri kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Diharapkan ke depannya dapat digunakan sebagai obat alternatif baru untuk mengatasi infeksi *Staphylococcus aureus*, khususnya mastitis pada ibu masa nifas yang efektif, aman, murah, dan mudah didapat.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mempunyai efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa ekstrak kulit jeruk nipis memiliki efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.



2. Mengetahui keeratan hubungan antara pemberian konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan diameter zona hambat yang terbentuk.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Dapat mengetahui nilai konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang efektif dalam menghambat dan membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*
2. Dapat mengembangkan ilmu pengetahuan mengenai manfaat kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) bagi kesehatan.

2.1.1 Manfaat Praktis

1. Dapat digunakan sebagai terapi alternatif penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* dengan memanfaatkan kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) bagi masyarakat luas.
- Mengembangkan potensi limbah kulit jeruk nipis sebagai obat antibakteri



BAB 2

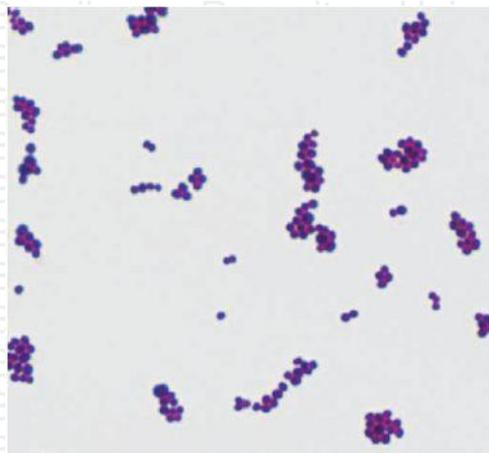
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus berasal dari bahasa Yunani yang terdiri dari kata *staphyle* dan *kokkos* yang memiliki arti kelompok anggur yang berbetuk kokus atau bulat.

Nama *aureus* sendiri berasal dari bahasa Latin yaitu *gold* yang memiliki arti bahwa bakteri ini tumbuh dalam koloni yang besar dan berwarna kuning. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang bersifat gram positif dan tidak aktif bergerak.

Koloni *Staphylococcus aureus* banyak hidup di tubuh manusia, terutama pada membran hidung dan kulit (Putra, 2012). Infeksi *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan berbagai penyakit, yaitu pneumonia, impetigo, selulitis, *scalded skin syndrome*, mastitis, korioamnionitis, dan sepsis neonatal (Pathan, 2012).



Gambar 2.1 *Staphylococcus aureus* dengan Pewarnaan Gram

(Brooks et al., 2013)



2.1.1 Klasifikasi

Menurut Soedarto (2015) klasifikasi *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut:

Domain : *Bacteria*

Kingdom : *Eubacteria*

Phylum : *Firmicutes*

Class : *Bacilli*

Ordo : *Bacillales*

Famili : *Staphylococcaceae*

Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *Staphylococcus aureus* (Soedarto, 2015)

2.1.2 Morfologi dan Identifikasi

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram-positif berbentuk kokus dengan ukuran diameter sekitar 1 μm . Bakteri berbentuk seperti anggur jika dilihat dibawah mikroskop. *Staphylococcus aureus* tidak aktif bergerak dan tidak membentuk spora. Koloni bakteri berwarna bening dan berukuran besar dengan diameter 6-8 mm. Umumnya strain koloni bakteri membentuk pigmen berwarna kuning gading atau jingga. Pada perbenihan *Blood Agar Plate*, koloni *Staphylococcus aureus* berwarna kuning keabuan dengan diameter 3-4 mm dan terdapat zona bening disekeliling koloni yang menandakan terjadinya hemolisis (Brooks *et al.*, 2013; Soedarto, 2015).

Staphylococcus aureus merupakan bakteri yang bersifat anaerob fakultatif dan dapat tumbuh pada udara yang hanya mengandung hidrogen. Bakteri dapat tumbuh optimum pada suhu 35°C dengan batas suhu tumbuh 15°C dan 40°C



(Pradani, 2012). Bakteri tahan terhadap suhu panas dengan suhu 50°C selama 30 menit. *Staphylococcus aureus* dapat menghasilkan katalase, asam laktat, namun tidak menghasilkan gas (Brooks *et al.*, 2013).

Staphylococcus aureus memiliki kemampuan memfermentasi *mannitol*. Pada *Mannitol Salt Agar* (MSA) fermentasi *mannitol Staphylococcus aureus* menghasilkan produk sampingan bersifat asam yang menurunkan pH medium, sehingga merubah merah fenol menjadi kuning. Hal ini yang dapat membedakan *S.aureus* dengan *S. epidermidis*, karena *S. epidermidis* tidak menyebabkan fermentasi *mannitol*. *Staphylococcus aureus* memiliki faktor koagulase darah yang dapat menggumpalkan fibrinogen di dalam plasma sebagai pelindung terhadap fagositosis (Sordarto, 2015).



Gambar 2.2 Koloni *Staphylococcus aureus* pada Perbenihan
Blood Agar Plate setelah diinkubasi selama 24 jam
(Brooks *et al.*, 2013)

2.1.3 Struktur Antigen

Struktur antigen *Staphylococcus aureus* dari luar ke dalam adalah kapsul, dinding sel, membran sitoplasma, dan sitoplasma. Kapsul bakteri dapat menghambat fagositosis yang disebabkan oleh lekosit polimorfonuklear, kecuali



jika terdapat antibodi spesifik. Sebagian besar galur *Staphylococcus aureus* memiliki koagulasi atau faktor penggumpal pada permukaan dinding sel. Ikatan koagulasi non enzimatis pada fibrinogen dapat menyebabkan agregasi pada bakteri (Brooks *et al.*, 2013).

Dinding sel bakteri mengandung polisakarida dan protein A yang bersifat antigen. Polisakarida yang virulen disebut polisakarida A dan yang tidak patogen disebut polisakarida B. *Staphylococcus aureus* memiliki komponen polisakarida A yang dapat dipindahkan dengan menggunakan asam triklorasetat. Antigen ini merupakan suatu kompleks peptidoglikan asam teichoat yang dapat menghambat fagositose. Peptidoglikan (polimer polisakarida) mengandung subunit-subunit yang bergabung menjadi eksoskeleton dari dinding sel. Protein A yang terdapat pada dinding sel dapat mengikat Fc pada molekul IgG kecuali IgG3. Fragmen Fab tetap bisa bebas berikatan dengan antigen spesifik meskipun IgG terikat dengan protein A. Protein A merupakan reagen yang penting dalam imunologi dan teknologi laboratorium diagnostik karena protein A dapat mengaglutinasi bakteri yang mempunyai ko-aglutinasi jika dilekati dengan molekul IgG (Warsa, 2010; Brooks *et al.*, 2013).

2.1.4 Toksin dan Enzim

Stafilokokus dapat menyebabkan penyakit akibat kemampuannya melakukan pembelahan dan penyebaran luas ke dalam jaringan melalui beberapa bahan ekstraseluler. Beberapa dari bahan tersebut adalah enzim dan yang lain dapat berupa toksin. Beberapa toksin berada dibawah kontrol genetik plasmid, baik kromosom maupun ekstrakromosom (Brooks *et al.*, 2013).



2.1.4.1 Katalase

Staphylococcus aureus memiliki sifat katalase positif yang mampu memecah sebagian besar karbohidrat (Putra, 2012). Selain itu, enzim katalase yang dihasilkan *Staphylococcus aureus* dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Enzim katalase memiliki peran sebagai daya tahan bakteri dalam proses fagositosis (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.4.2 Koagulase

Staphylococcus aureus menghasilkan koagulase. Koagulase merupakan protein yang merupai enzim yang dapat menggumpalkan plasma oksalat atau plasma sitrat karena faktor koagulase-reaktif di dalam serum. Faktor serum bereaksi dengan koagulase dan menghasilkan esterase yang dapat meningkatkan aktivitas penggumpalan. Hal ini menyebabkan terjadinya deposit pada permukaan sel bakteri yang dapat menghambat fagositosis. Produksi koagulase menandakan invasi potensial patogenik (Warsa, 2010; Brooks *et al.*, 2013).

2.1.4.3 Eksotoksin

Eksotoksin berisi larutan hemolisis yang dapat dipisahkan dengan elektroforesis. Toksin ini berupa, α -hemolisin, β -hemolisin, delta hemolisin, dan panton valentine. α -hemolisin merupakan protein heterogen yang dapat melisis eritrosit, leukosit, dan trombosit kelinci, namun tidak pada manusia. α -toksin bersifat sitotoksik terhadap biakan jaringan mamalia dan dalam dosis yang besar dapat membunuh manusia dan hewan. Semua efek tersebut dapat terjadi karena



pelepasan anion dengan fosfolipid yang terdapat pada membran sel bakteri (Warsa, 2010).

β -hemolisin dapat menurunkan kadar sfingomyelin dan toksik pada beberapa jenis sel, termasuk sel darah merah manusia. Delta hemolisin dapat menghancurkan eritrosit manusia dan kelinci. Toksin ini dapat menyebabkan kerusakan ginjal akut pada kelinci jika disuntikkan secara intravena (Warsa, 2010; Brooks *et al.*, 2013).

2.1.4.4 Lekosidin

Toksin ini dapat membunuh sel darah putih manusia dan kelinci tanpa aktivitas hemolitik. Tipe toksin yang identik dengan delta hemolisin dapat menyebabkan perubahan morfologik sel darah putih, kecuali yang berasal dari domba. Toksin ini merupakan faktor virulen yang penting pada infeksi CA-MRSA. (Warsa, 2010; Brooks *et al.*, 2013).

2.1.4.5 Toksin Epidermolitik atau Eksfoliatin

Toksin eksfoliatin adalah protein ekstraseluler yang tahan panas tetapi tidak tahan asam. Toksin ini mempunyai aktivitas proteolitik dan dapat melarutkan matriks mukopolisakarida epidermis, sehingga menyebabkan pemisahan intraepithelial pada ikatan sel di stratum granulosum. Toksin eksfoliatin merupakan penyebab *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome* yang ditandai dengan melepuhnya kulit (Kusuma, 2009; Pradani, 2012).



2.1.4.6 Toxic Shock Syndrome Toxin

Sebagian besar galur *Staphylococcus aureus* diisolasi dari pasien sindrom syok toksik yang menghasilkan racun bernama *Toxic Shock Syndrome Toxin-1* (TSST-1). Secara struktural TSST-1 sama dengan enterotoksin B dan C. Toksin menyebabkan demam syok, yang mengenai banyak sistem, termasuk ruam kulit deskuamatif (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.4.7 Enterotoksin

Enterotoksin *Staphylococcus aureus* berbentuk protein rantai tunggal yang memiliki sifat antigenik dengan berat molekul 26-29 kDa. Hampir 50% galur *Staphylococcus aureus* dapat menghasilkan sedikitnya enam toksin laut (A-F). Enterotoksin dapat berikatan dengan molekul MHC Kelas II dan menimbulkan stimulasi sel T. Enterotoksin resisten terhadap panas, sehingga mampu bertahan hidup pada suhu didih dalam makanan hingga 30 menit. Enterotoksin tipe B memiliki stabilitas paling tinggi yang resisten terhadap panas (Putra, 2012; Brooks *et al.*, 2013).

Enterotoksin merupakan enzim utama penyebab keracunan makanan, terutama pada makanan yang mengandung karbohidrat dan protein. Tipe enterotoksin tersebut adalah A, B, C1, C2, D, dan E, dimana tipe A dan B paling banyak ditemukan di makanan. Produksi enterotoksin banyak pada pH diatas 5 dengan suhu optimum diatas 37°C dan pada keadaan aerob (Putra, 2012).

2.1.5 Patogenesis

Patogenitas *S.aureus* merupakan efek dari gabungan beberapa metabolit yang dihasilkan. *S.aureus* bersifat invasif, menyebabkan hemolisis, membentuk



koagulase, mencairkan gelatin, membentuk pigmen kuning emas dan meragi manitol. Infeksi dapat dimulai dari tempat koloni patogen pada tubuh, kemudian ditularkan melalui tangan ke tempat bakteri dapat masuk, misalnya luka pada kulit, insisi pembedahan, tempat masuk kateter vaskuler, atau tempat lain yang pertahanannya lemah (Warsa, 2010; Soedarto, 2015).

Infeksi oleh *Staphylococcus aureus* ditandai dengan adanya kerusakan jaringan disertai abses bernanah. Awalnya terjadi nekrosis pada jaringan sekitar lesi, lalu terjadi koagulasi fibrin di sekitar lesi dan pembuluh getah bening yang menyebabkan terbentuknya dinding yang membatasi proses nekrosis. Dalam kondisi berat, infeksi dapat menyebar ke jaringan lain melalui pembuluh darah dan getah bening yang dapat menyebabkan peradangan pada vena, trombosis, hingga bakterimia (Kusuma, 2009).

2.1.6 Gejala Klinis

Infeksi *Staphylococcus aureus* pada kulit dan jaringan lunak dapat menyebabkan impetigo, penyakit Ritter, folikulitis, furunkel, atau karbunkel. Pada impetigo, terbentuk eritema kecil yang akan berkembang menjadi bulla berisi cairan keruh. Jika bulla pecah maka akan terbentuk krusta berwarna seperti madu (*honey-colored crust*). Pada penyakit Ritter (*Scalded skin syndrome*), terbentuk eritema selulitis yang disebabkan oleh toksin eksfoliatif, lalu kulit melepuh di tempat infeksi, dalam keadaan berat toksin eksfoliatif dapat menyebar ke seluruh bagian tubuh. Penyakit Ritter biasanya disertai demam dan diikuti terjadinya impetigo. Pada folikulitis terjadi pembentukan pustula lunak dan dari tempat infeksi kulit yang mempunyai folikel rambut dapat terbentuk lubang-lubang kecil dari



abses yang mengeluarkan cairan purulen (furunkel). Karbunkel dapat terbentuk dari furunkel-furunkel yang saling berhubungan (Soedarto, 2015).

Infeksi *Staphylococcus aureus* yang lebih berat dapat menyebabkan pneumonia, mastitis, plebitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomielitis, endokarditis, infeksi nosokomial, dan sindrom syok toksik (Kusuma, 2009). Pada pneumonia gejala diawali dengan demam yang berlangsung tidak lama, kemudian diikuti gangguan pernapasan yang berat, dapat juga disertai dengan gangguan gastrointestinal. Pneumonia umum terjadi pada bayi, anak kecil, dan penderita debil. Infeksi tulang atau osteomielitis dapat terjadi pada anak dengan gejala awal berupa demam disertai pelunakan tulang, penderita mengeluh nyeri hebat yang berdenyut. Pada endokarditis, mula-mula penderita mengalami demam dan malaise, diikuti dengan terjadinya emboli perifer (Soedarto, 2015). Sindrom syok toksik diawali dengan terjadinya demam tinggi tiba-tiba, muntah, diare, mialgia, ruam bentuk skarlet, dan hipotensi. Pada gejala yang berat dapat disertai gagal jantung dan gagal ginjal. Sindrom syok toksik dapat terjadi pada wanita yang menggunakan tampon ketika menstruasi dan pada anak yang mengalami infeksi luka terlokalisir (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.7 Uji Laboratorium Diagnosa

2.1.7.1 Spesimen

Pengambilan spesimen dapat dilakukan dengan pengusapan permukaan pus dari abses, darah, aspirat trakea, atau kultur cairan spinal, tergantung dengan proses uji yang dibutuhkan (Brooks *et al.*, 2013). Cara pengambilan sampel pada kulit dapat dilakukan dengan mengusap nanah atau sekret menggunakan kapas usap steril yang telah dibasahi kaldu atau NaCl fisiologis (Harti, 2015).



2.1.7.2 Biakan

Spesimen ditanam pada lempeng agar darah menunjukkan koloni yang khas dalam waktu 18 jam pada suhu 37°C, tetapi hemolisis dan produksi pigmen tidak terjadi dalam beberapa hari kemudian, dan optimal pada suhu kamar. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang memfermentasi manitol.

Spesimen yang terkontaminasi flora campuran dapat dibiakkan pada media yang mengandung NaCl 7,5%. Garam tersebut dapat menghambat sebagian besar flora normal lainnya tetapi tidak menghambat *Staphylococcus aureus*. Agar garam manitol (*Mannitol Salt Agar*) digunakan untuk menyaring *Staphylococcus aureus* yang ada di hidung (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.7.3 Uji Katalase

Tetes larutan hidrogen peroksida dimasukkan dalam gelas objek dicampurkan dengan sedikit biakan bakteri. Pembentukan gelembung (pelepasan oksigen) menunjukkan bahwa hasil tes positif. Uji ini juga dapat dilakukan dengan cara menuangkan larutan hidrogen peroksida pada biakan bakteri yang padat pada agar miring dan diamati munculnya gelembung (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.7.4 Uji Koagulase

Uji koagulase dilakukan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan *Staphylococcus* spp. lainnya. Hal ini ditandai dengan terbentuknya gumpalan atau tidak. Terbentuknya gumpalan menandakan adanya koloni *S.aureus*. Plasma hewan atau manusia yang dicampur sitrat dicairkan dalam perbandingan 1:5 ditambah dengan volume yang sama dari biakan cair atau



koloni, pada agar dan diinkubasi pada suhu 37°C. Satu tabung plasma dicampur dengan media cair yang steril dijadikan sebagai kontrol. Gumpalan terjadi dalam waktu 1-4 jam menunjukkan tes positif (Locke *et al.*, 2012; Brooks *et al.*, 2013).

2.1.7.5 Uji Serologi dan Penentuan Tipe

Uji serologi untuk diagnosis infeksi *Staphylococcus aureus* memiliki nilai praktis yang kecil. Antibodi terhadap asam teikoat dapat dideteksi pada infeksi yang lama dan dalam, misalnya endokarditis stafilokokus. Pola kepekaan terhadap antibiotik bermanfaat dalam melacak infeksi *Staphylococcus aureus* dan dalam menentukan jika bakteremia disebabkan oleh *Staphylococcus epidermidis*, atau disebabkan oleh galur yang sama. Teknik penentuan molekul telah lama digunakan untuk menyatakan penyebaran penyakit epidemik yang menghasilkan koloni *S.aureus* (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.8 Resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap Antibiotika

Saat ini, infeksi *Staphylococcus aureus* menjadi permasalahan yang cukup serius karena peningkatan resistensi bakteri terhadap berbagai jenis antibakteri atau yang dapat disebut *Multi Drug Resistance*. Kemampuan adaptasi yang luar biasa dari *Staphylococcus aureus* membuat bakteri mudah resisten terhadap banyak antibiotik. Pada tahun 1940 dan dalam waktu 10 tahun, pengobatan infeksi *Staphylococcus aureus* menggunakan *penicillin* hingga akhirnya pada tahun 1950 sampai 1960an terjadi resisten terhadap *penicillin* (*penicillin G*, *ampicillin*, *ticarcillin*, *piperacillin*, dan jenis lainnya). Hal ini disebabkan oleh produksi enzim β -laktamase yang dapat merusak struktur β -laktam *penicillin*. Pada tahun 1959



dilakukan penggunaan *methicillin* untuk menangani *Penicillin resistant Staphylococcus aureus*. Namun, beberapa tahun kemudian terdapat laporan kasus mengenai *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (Afifurrahman *et al.*, 2014; Soedarto, 2015).

MRSA merupakan jenis *Staphylococcus aureus* yang kebal terhadap antibiotik *methicillin* dan kelas lainnya, seperti *penicillin*, *amoxicillin*, dan *oxacillin*. Selain itu, terjadi resistensi silang pada antibiotik non- β -laktam seperti eritromisin, gentamisin, klindamisin, kotrimoksazol, dan siprofloksasin. MRSA banyak ditemukan pada pasien rawat inap di rumah sakit maupun fasilitas kesehatan lainnya, terutama pada pasien lanjut usia, penderita luka terbuka, dan pengguna kateter. Penularan MRSA dapat terjadi melalui kontak langsung fisik dengan penderita infeksi dan kontak tidak langsung karena bersentuhan dengan barang-barang penderita yang sudah tercemar dengan MRSA. Antibiotik yang dapat digunakan untuk pengobatan infeksi MRSA adalah *vancomycin*, *oxazolidinone*, ketolida dan mupirosin topika. Antibiotik pilihan untuk terapi infeksi MRSA saat ini adalah glikopeptida *vancomycin*. Namun, karena peningkatan penggunaan *vancomycin* dan tidak tepatnya pemberian terapi menyebabkan terjadinya resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap *vancomycin* atau biasa disebut dengan *Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus* (Afifurrahman *et al.*, 2014; Soedarto, 2015).

Strain Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus (VISA) telah terisolasi di Jepang, Amerika Serikat, dan beberapa negara lainnya. VISA dapat ditegakkan bila konsentrasi minimum penghambatan/ *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) 4-8 $\mu\text{g/mL}$ dan dikatakan *resistant* jika MIC 16 $\mu\text{g/mL}$ atau lebih. VISA umumnya terjadi pada pasien dengan infeksi kompleks yang mendapat



terapi *vancomycin* berkepanjangan. Pada tahun 2002, *strain Vancomycin resistant Staphylococcus aureus* (VRSA) diisolasi dari pasien di Amerika Serikat. Isolat ini memiliki gen *vanA* resisten *vancomycin* dari enterokokus dan gen *mecA* yang membuat resisten terhadap *penicillin*. Munculnya VISA dan VRSA merupakan permasalahan yang serius karena dapat mempersulit pengobatan infeksi *Staphylococcus aureus* (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.9 Terapi Infeksi

Infeksi ringan pada kulit dapat diobati dengan salep antibiotik ataupun antibiotik oral. Abses dan lesi supuratif tertutup lainnya diterapi dengan drainase, dan yang terpenting adalah terapi antimikroba. Banyak obat antimikroba dapat melawan *Staphylococcus aureus in vitro*, namun sulit untuk memusnahkan bakteri patogen dari orang yang terinfeksi. Hal ini dikarenakan organisme dapat cepat resisten terhadap obat antimikroba dan obat tidak dapat bekerja pada bagian nekrotik pusat dari lesi supuratif (Brooks *et al.*, 2013).

Infeksi berat hingga membahayakan jiwa penderita dapat diberikan terapi penisilin tahan β -laktamase secara intravena. Vankomisin dapat digunakan sebagai pengganti bagi stafilokokus yang resisten terhadap antibiotika lini pertama. Jika infeksi disebabkan *Staphylococcus aureus* yang tidak menghasilkan β laktamase dapat diberikan terapi penisilin G, tetapi hanya persentase kecil *strain Staphylococcus aureus* yang peka terhadap penisilin G (Brooks *et al.*, 2013). Memilih antibiotik yang sesuai sangat disarankan dalam pengobatan infeksi *Staphylococcus aureus*, maka dari itu diperlukan kultur bakteri dengan uji kepekaan antibiotika (Soedarto, 2015).



2.1.10 Pencegahan

Vaksin untuk mencegah infeksi *Staphylococcus aureus* hingga kini belum ada karena bakteri ini menyebabkan berbagai macam penyakit, dalam pencegahannya harus ditujukan terhadap faktor-faktor risiko yang dapat meningkatkan infeksi bakteri ini. Pencegahan dapat dilakukan baik di lingkungan maupun di luar rumah sakit. Pencegahan untuk di lingkungan rumah sakit dapat dilakukan dengan menjaga kebersihan lingkungan, kebersihan alat-alat bantu (misalnya kateter), dan perlengkapan perawatan lainnya harus selalu dijaga agar tidak menjadi sumber penularan bakteri *Staphylococcus aureus*. Pencegahan di luar rumah sakit dapat berupa menjaga kebersihan luka luar yang terus menerus mengeluarkan nanah dengan ditutup perban yang bersih dan kering, tangan harus dicuci dengan baik, hindari kontak kulit dengan individu yang mungkin terinfeksi, dan hindari penggunaan bersama perlengkapan pribadi (misalnya handuk, kain pembasuh, pisau cukur, dan pakaian) karena ada kemungkinan jika barang telah terkena luka infeksi (Soedarto, 2015).

2.2 Mastitis

Mastitis merupakan peradangan pada payudara yang biasanya terjadi pada masa nifas atau sampai 3 minggu setelah persalinan. Penyebabnya adalah adanya sumbatan saluran susu dan pengeluaran ASI yang kurang sempurna. ASI yang tidak dikeluarkan dengan efisien akan menyebabkan stagnasi ASI, hal ini menjadi pemicu bakteri untuk berkembang biak (WHO, 2003; Saifuddin, 2014).



Gambar 2.3 Mastitis Berat pada Ibu 7 Bulan Postpartum

(Spencer, 2008)

2.2.1 Etiologi

Penyebab utama mastitis adalah stasis ASI dan infeksi. Stasis ASI dapat disebabkan oleh ketidakefisienan pengeluaran ASI, teknik menyusui yang salah, BH yang terlalu kuat, dan ibu yang kekurangan gizi. Infeksi pada mastitis dapat terjadi karena adanya lesi atau fisura pada puting susu, dimana organisme dapat masuk ke dalam payudara melalui celah lesi tersebut ketika bayi menyusui. Organisme yang menyebabkan infeksi pada mastitis adalah *Staphylococcus aureus*. Bakteri ini banyak hidup didalam hidung dan tenggorokan bayi (WHO, 2003; Brooks *et al.*, 2013; Mansyur dan Dahlan, 2014).

2.2.2 Jenis Mastitis

2.2.2.1 Nonlaktasional

Infeksi jaringan pada payudara yang terjadi ketika tidak menyusui. Organisme yang menyebabkan infeksi adalah bakteri yang banyak hidup pada kulit termasuk enterokokus dan bakteri anaerob, seperti *Bacteroides spp* dan



Streptococcus anaerob. Infeksi terjadi karena adanya kerusakan pada duktus subareolar yang lama kelamaan menyebabkan inflamasi yang disertai atau tidak disertai abses. Penyakit ini biasanya ditandai dengan puting susu rata dan adanya pengeluaran cairan pada puting susu. Mastitis nonlaktasional banyak terjadi pada wanita muda yang usianya berkisar 32 tahun dan dapat terjadi juga pada pria.

Faktor risiko dari mastitis laktasional adalah merokok (Dixon dan Khan, 2011).

2.2.2.2 Laktasional

Infeksi payudara yang sering terjadi pada enam minggu pertama setelah persalinan dan dapat berkembang hingga masa penyapihan. Beberapa jenis dari mastitis laktasional adalah sebagai berikut (Dixon dan Khan, 2011).

1) Stasis ASI

Stasis ASI terjadi ketika ASI tidak dikeluarkan dengan efisien dari payudara. Menyusui yang tidak teratur dapat menyebabkan stasis ASI. Selain itu, cara menyusui yang buruk, pengisapan yang tidak efektif, pembatasan frekuensi atau durasi menyusui dapat menyebabkan sumbatan pada saluran ASI. Hal ini biasanya terjadi di awal minggu masa nifas (WHO, 2003).

2) Mastitis Subklinis

Mastitis subklinis ditandai dengan adanya peningkatan kandungan natrium-kalium dan konsentrasi interleukin-8 (IL-8) dalam ASI, sebelum ditemukan mastitis secara klinis. Peningkatan kadar natrium dan IL-8 menunjukkan terjadinya respon inflamasi meskipun tidak ada tanda klinis. Peningkatan kadar natrium-kalium dalam ASI dapat menyebabkan penambahan berat badan yang buruk pada bayi (WHO, 2003).



3) Mastitis Noninfeksiosa

Mastitis noninfeksiosa terjadi bila ASI tidak dikeluarkan dari satu payudara atau keduanya, sehingga ASI melambat dan akhirnya berhenti. Bila tidak segera diatasi, akumulasi ASI dapat menyebabkan respon peradangan. Respon peradangan ditandai dengan demam, perasaan tidak sehat, rasa nyeri pada payudara, eritema, pembengkakan, dan payudara keras. Pada penyakit ini biasanya hanya satu payudara yang terkena (WHO, 2003).

4) Mastitis Infeksiosa

Mastitis infeksiosa terjadi apabila stasis ASI tidak sembuh dan proteksi oleh faktor imun serta respon inflamasi kalah. Dalam keadaan normal, aliran ASI yang keluar dari payudara secara efisien dapat menghanyutkan bakteri keluar dari payudara. Pengeluaran ASI yang tidak efisien dapat menyebabkan akumulasi ASI yang membuat suatu keadaan baik untuk tempat hidup bakteri (WHO, 2003).

2.2.3 Patofisiologi Mastitis

Mastitis diawali dengan terjadinya stasis ASI yang menyebabkan peningkatan tekanan di dalam duktus (saluran ASI). Bila ASI tidak dikeluarkan akan terjadi peningkatan tegangan alveoli, sehingga sel epitel yang memproduksi ASI menjadi datar dan tertekan. Hal ini menyebabkan permeabilitas jaringan ikat meningkat. Beberapa komponen dalam plasma seperti imunoprotein dan natrium masuk ke dalam ASI, selanjutnya ke jaringan sekitar sel sehingga memicu respon imun. Stasis ASI, respon inflamasi, dan kerusakan jaringan menyebabkan infeksi mudah terjadi (Alasiry, 2013).



2.2.4 Manifestasi Klinis Mastitis

Tanda dan gejala mastitis biasanya timbul setelah seminggu pascapartum. Mastitis biasanya diawali dengan adanya pembengkakan, namun terdapat beberapa perbedaan payudara yang bengkak normal dan patologis. Pada pembengkakan yang fisiologis, payudara terasa panas, berat, keras, ASI mengalir dengan lancar, bayi mudah menghisap, dan terkadang ASI menetes keluar secara spontan. Pembengkakan yang mengarah pada mastitis ditandai dengan payudara yang membesar, nyeri, terlihat mengkilat, eritema, puting menjadi rata, ASI tidak mudah mengalir, dan bayi sulit menyusui. Selain itu, tanda dan gejala lain dapat berupa nyeri ringan pada salah satu payudara, nyeri otot, sakit kepala, letih, peningkatan suhu 39.5-40°C, takikardi, menggigil, malaise, bengkak, dan area payudara keras (WHO, 2003; Astuti *et al.*, 2015).

2.2.5 Penatalaksanaan dan Terapi Mastitis

Penyembuhan mastitis dapat diawali dengan memperbaiki teknik menyusui. Bila ibu berhenti menyusui ketika terjadi gejala awal mastitis, akan menyebabkan stasis ASI. Maka dari itu diperlukan konsultasi dengan tenaga kerja yang profesional. Ibu disarankan untuk banyak minum air, istirahat, dan konsumsi nutrisi seimbang (Spencer, 2008).

Ibu yang terkena mastitis biasanya memiliki kolonisasi bakteri yang sama dengan bayi, menyusui dapat terus dilanjutkan selama mastitis tanpa merasa khawatir jika bakteri akan masuk ke dalam tubuh bayi. ASI yang keluar dari penderita mastitis banyak mengandung komponen antiinflamasi yang dapat memberikan proteksi pada bayi. Menyusui selama mastitis tidak membahayakan bayi, dengan menyusui dapat menghilangkan stasis ASI dan memperlancar



pengeluaran ASI. Masalah yang biasanya terjadi adalah bayi tidak suka dengan rasa ASI karena tinggi kandungan sodium. Pada kondisi ini, ASI dapat diperas dengan pump lalu dibuang (Spencer, 2008).

Seiring dengan seringnya pengosongan ASI, pengobatan dengan antibiotik juga dibutuhkan untuk penyembuhan mastitis. Terapi antibiotik diindikasikan pada banyaknya jumlah koloni bakteri, terlihat puting pecah-pecah, gejala tidak membaik setelah 12-24 jam setelah pengeluaran ASI diperbaiki. Antibiotik yang dapat diberikan adalah amoksisilin, sefalekssin, dan dikloksasilin. Antibiotik β -laktamase harus ditambahkan agar efektif terhadap *Staphylococcus aureus*. Umumnya antibiotik dikonsumsi selama 10-14 hari. Penghentian obat sebelum waktunya dapat meningkatkan risiko terjadinya mastitis berulang (WHO, 2003; Spencer, 2008).

2.3 Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Citrus aurantifolia merupakan tumbuhan yang biasa dikenal dengan sebutan jeruk nipis. Jeruk nipis adalah jenis tanaman perdu yang pertumbuhan dan perkembangannya menyebar di seluruh Indonesia. Bagian tanaman jeruk nipis yang banyak dimanfaatkan adalah buahnya. Buah jeruk nipis berbentuk bulat, berdiameter 3-6 cm, dan berwarna hijau. atau kuning. Air perasan jeruk nipis biasanya banyak dimanfaatkan masyarakat untuk bumbu masakan, obat-obatan, dan minuman segar (Agoes, 2010; Hindun *et al.*, 2017).

Menurut sejarah, tanaman jeruk nipis berasal dari Indonesia dan sentra utamanya adalah Asia Tenggara. Akan tetapi, beberapa sumber menyatakan bahwa tanaman jeruk nipis berasal dari Cina Selatan, India, Himalaya, dan



Malaysia. Masuknya tanaman jeruk nipis ke Indonesia karena dibawa oleh orang Belanda (Aldi, 2016).



Gambar 2.4 Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)
(Pasaribu, 2017)

2.3.1 Klasifikasi

Menurut Rukmana (2003) klasifikasi jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) adalah sebagai berikut:

Kingsdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Subdivisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Rutales

Famili : Rutaceae

Genus : Citrus

Spesies : *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (Rukmana, 2003)



2.3.2 Morfologi

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) merupakan tanaman perdu yang memiliki banyak batang dan ranting. Tinggi tanaman sekitar 0,5-3,5 meter. Batang pohonnya berkayu, berduri, dan keras. Batang berbentuk silindris, berwarna coklat, bercabang dikotomi, arah tumbuh batang tegak lurus, dan arah tumbuh cabang condong ke atas. Daun jeruk nipis berjenis tunggal, berbentuk jorong, dengan ujung tumpul, dan tepi beringgit. Panjang daun sekitar 2,5-9 cm dan lebarnya 2-5 cm. Tulang daun menyirip, berwarna hijau, dan lebar 5-25 mm. Permukaan daun mengkilat dan licin (Saparinto dan Susiana, 2016).

Tanaman jeruk nipis memiliki bunga berukuran kecil berwarna putih. Bunganya berjenis majemuk/tunggal yang tumbuh di ketiak daun atau di ujung batang. Bentuk kelopak bunga seperti mangkok berbagi 4-5 dengan diameter 0,4-0,7 cm, berwarna putih kekuningan. Tangkai putik silindris berwarna putih kekuningan. Daun mahkota berbentuk bulat telur atau lanset dengan panjang 0,7-1,25 cm dan lebar 0,25-0,5 cm berwarna putih. Daun mahkota berjumlah 4-5. Buah jeruk nipis berbentuk bulat seperti bola pingpong dengan diameter 3,5-5 cm. Kulit buahnya berwarna hijau atau kekuning-kuningan. Tanaman jeruk nipis berakar tunggang (Saparinto dan Susiana, 2016).

2.3.3 Lingkungan Tumbuh

Tumbuhan jeruk nipis dapat tumbuh diberbagai iklim, baik itu basah maupun kering. Jika ditanam didaerah kering dengan kondisi tanah kurang subur, jeruk nipis dapat tetap tumbuh dan berbuah asalkan pengairannya baik dan pemberian pupuknya cukup. Tumbuhan jeruk nipis dapat tumbuh baik pada tanah dengan derajat keasaman (pH) antara 5-6 (Setiadi dan Parimin, 2004). Pada



daerah tropis, dapat ditanam di dataran rendah sampai ketinggian 650 mdpl.

Daerah khatulistiwa dapat di tanam sampai ketinggian 2000 mdpl. Tumbuhan dapat tumbuh optimal pada suhu 25°C-30°C. Sinar matahari sangat berpengaruh

penting dalam pertumbuhan jeruk nipis, oleh karena itu jeruk yang ditanam di tempat terlindung pertumbuhannya kurang baik dan mudah terserang penyakit

(Purnomosidhi *et al.*, 2007).

2.3.4 Kandungan

Buah jeruk nipis memiliki banyak kandungan zat makanan dan mineral yang bermanfaat bagi tubuh manusia. Dalam 100 gram jeruk nipis terkandung 51 kalori, dimana karbohidrat 11.5 gram, protein 0.9 gram, mineral 0.5 gram, lemak 0.2 gram, asam askorbat 49 miligram, kalsium 33 miligram, fosfor 23 miligram, dan besi 0.4 miligram. Asam-asaman yang terkandung dalam jeruk nipis adalah asam sitrat, asam amino (triptofan, lisin), minyak atsiri (sitral, limonene, felandren, lemon kamfer, kadinen, geram-asetat, linalil-lasetat, aktilaldehid, nildehid), dan asam sitrun (Agoes, 2010).

Berdasarkan penelitian Garcia *et al.* (2012) komponen minyak atsiri kulit jeruk nipis yang berasal dari Iran paling banyak mengandung limonene dengan 53.53%, α -terpineol 9.41%, dan γ -terpinene 6.26%. Sedangkan pada kulit jeruk nipis yang berasal dari Florida selatan dilaporkan memiliki kandungan limonene 32.6%, α -terpineol 12.5%, dan β -pinene 6.3%. Hal ini menandakan bahwa kandungan minyak atsiri pada kulit jeruk nipis kaya akan limonene dan α -terpineol.

Selain minyak atsiri, kulit jeruk nipis juga mengandung bahan aktif flavonoid, tanin, fenolat, alkaloid, dan saponin (Abdullah *et al.*, 2013). Dimana konsentrasi flavonoid pada jeruk nipis lebih tinggi terdapat pada bagian kulit



dibandingkan dengan bagian lainnya, seperti biji, buah, dan air perasannya (Aldi, 2016).

2.3.5 Kandungan Zat Aktif yang Bersifat Antimikroba

Kulit jeruk nipis memiliki manfaat dalam menghambat dan membunuh bakteri. Zat aktif pada kulit jeruk nipis yang dapat memberi efek antibakteri adalah minyak atsiri, flavonoid, saponin, alkaloid, dan tanin (Abdullah *et al.*, 2013). Minyak atsiri memiliki sifat antibakteri karena molekul-molekul hidrokarbon monoterpenya dapat meningkatkan permeabilitas dan fluiditas membran sehingga menyebabkan membran bakteri berekspansi, terhambatnya respirasi dan gangguan proses transpor ion (Miksusanti, 2008).

Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri dapat dibagi menjadi tiga bagian, yaitu menghambat sintesis nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi. Flavonoid menghambat sintesis asam nukleat dengan menumpuk asam basa nukleat ketika pembentukan DNA dan RNA, pada hal ini cincin A dan B yang berperan penting dalam proses interkalasi atau ikatan hidrogen. Flavonoid menghambat fungsi membran sitoplasma dengan merusak fluiditas membran pada bagian hidrofilik dan hidrofobik sehingga fluiditas lapisan luar maupun dalam menurun. Flavonoid menghambat metabolisme energi dengan mengurangi penggunaan oksigen oleh bakteri dan menghambat sitokrom C reduktase (Cushnie dan Lamb, 2005; Carolia dan Noventi, 2016).

Saponin berfungsi sebagai antibakteri dengan mengikat protein dan enzim tertentu pada sel bakteri sehingga terjadi kebocoran protein dan enzim dari dalam sel (Madduluri *et al.*, 2013). Saponin memiliki sifat seperti detergen, yaitu dapat menurunkan tegangan permukaan dinding sel sehingga mampu merusak



permeabilitas membran dan membunuh bakteri. Alkaloid merupakan senyawa antibakteri yang dapat melawan bakteri gram positif maupun gram negatif dengan cara mengganggu membran sel dan sintesa asam nukleat pada bakteri. Mekanisme senyawa alkaloid dalam mengganggu membran sel bakteri yaitu dengan merusak komponen penyusun peptidoglikan, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk utuh dan terjadilah kematian sel (Abdullah *et al.*, 2013). Kandungan nitrogen pada gugus basa senyawa alkaloid dapat bereaksi merusak DNA bakteri. Hal ini menyebabkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino, sehingga terjadi lisis pada sel bakteri (Bintari *et al.*, 2015).

Tanin merupakan senyawa kimia golongan polifenol yang dapat mengikat salah satu protein membran pada bakteri. Hal ini dapat menyebabkan rusaknya sediaan reseptor pada permukaan sel bakteri sehingga mengganggu proses metabolisme sel. Tanin juga dapat menghambat sintesis protein yang digunakan untuk pembentukan dinding sel dengan membentuk kompleks senyawa yang irreversibel dengan prolin (Abdullah *et al.*, 2013). Tanin juga dapat menyerang polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel tidak utuh. Hal ini menyebabkan bakteri lisis karena tekanan osmotik dan fisik bakteri (Setiawan *et al.*, 2017).

2.3.6 Manfaat

Jeruk nipis memiliki banyak manfaat, salah satunya dapat digunakan untuk memasak makanan, seperti pada soto. Pemanfaatan jeruk nipis dalam pengobatan tradisional dapat mengatasi berbagai macam penyakit, seperti disentri, sembelit, ambeien, haid tidak teratur, difteri, jerawat, kepala pusing atau vertigo, suara serak, batuk, bau badan, menambah nafsu makan, mencegah



kerontokan rambut, ketombe, flu, demam, amandel, penyakit anyang-anyang, mimisan, dan radang hidung (Agoes, 2010). Kandungan minyak atsiri pada kulit jeruk nipis dapat digunakan sebagai antirematik, antiseptik, antiracun, astringent, antibakteri, diuretik, antipiretik, antihipertensi, antijamur, insektisida, tonik, antivirus, dan ekspektoran (Abdullah *et al.*, 2013). Daun dan bunga jeruk nipis dapat digunakan untuk mengatasi hipertensi, batuk, lendir tenggorokan, demam, panas pada malaria, jerawat, dan ketombe (Dalimartha, 2000).

2.4 Antimikroba

Antimikroba adalah bahan atau obat yang digunakan untuk membasmi infeksi mikroba yang merugikan manusia (Dermawan, 2015). Antimikroba memiliki sifat bakteriostatik dan bakterisida. Sifat bakteriostatik dapat menghambat dan menghentikan pertumbuhan bakteri, sehingga tidak lagi terjadi multiplikasi atau perkembangbiakan. Bakterisida, yaitu dapat membunuh bakteri (Sunaryo, 2014).

2.4.1 Mekanisme Kerja Antimikroba

Antimikroba memiliki mekanisme kerja sebagai berikut:

- 1) Bersifat sebagai antimetabolit/penghambat metabolisme sel

Koenzim asam folat diperlukan untuk sintesis purin dan pirimidin (prekursor DNA dan RNA) agar sel dapat tumbuh dan bereplikasi. Asam p-amino benzoate (PABA) merupakan metabolit utama bagi kebanyakan mikroorganisme. Antimikroba seperti sulfonamide akan berkompetisi dengan PABA untuk membentuk asam folat, jika senyawa antimikroba menang bersaing maka akan terbentuk asam folat nonfungsional yang dapat mengganggu kehidupan mikroorganisme (Dermawan, 2015).



2) Penghambatan sintesis dinding sel

Antimikroba golongan ini dapat menghambat biosintesis peptidoglikan dan sintesis mukopeptida, sehingga dinding sel menjadi lemah. Adanya tekanan turgor dari dalam menyebabkan dinding sel pecah dan bakteri mati. Antimikroba yang termasuk adalah penisilin, sefalosporin, vankomisin, dan antifungi golongan azol (Dermawan, 2015).

3) Penghambatan fungsi permeabilitas membran sel

Antimikroba mengganggu permeabilitas membran sel yang menyebabkan keluarnya senyawa intraseluler mikroorganisme, sehingga sel rusak dan mati. Antimikroba golongan ini adalah nistatin, polimiksin, dan amphotericin B (Dermawan, 2015).

4) Penghambatan sintesis protein yang *reversible*

Antimikroba mempengaruhi fungsi ribosom bakteri sehingga sintesis protein terhambat. Antimikroba akan menghambat reaksi transfer antara donor dengan aseptor atau menghambat translokasi t-RNA peptidil dari situs aseptor ke situs donor (Sunaryo, 2014; Dermawan, 2015).

5) Pengubahan sintesis protein

Kematian sel diakibatkan oleh antimikroba yang berikatan dengan sub-unit ribosom 30S yang menyebabkan sintesis protein berubah. Antimikroba golongan ini adalah aminoglikosida (Dermawan, 2015).

6) Penghambatan asam nukleat

Antimikroba mempengaruhi metabolisme asam nukleat dengan mengikat DNA *m*-RNA mikroorganisme, misalnya rifampisin mengikat dan menghambat *DNA-dependent RNA polymerase*. Selain itu, penghambatan sintesis asam



nukleat dapat terjadi dengan menghambat enzimnya, seperti kuinolon, sulfonamide, pirimetamin, rifampin, dan trimetoprim (Sunaryo, 2014).

2.4.2 Uji Sensitivitas Antimikroba *In Vitro*

Pada prinsipnya uji sensitivitas terhadap antimikroba dilakukan untuk mengetahui adanya kemungkinan resisten bakteri terhadap suatu antimikroba yang dilakukan secara *in vitro*, sehingga dapat ditemukan antimikroba yang tepat sebagai pengobatan (Brooks *et al.*, 2013). Terdapat beberapa prinsip dasar uji sensitivitas terhadap antibakteri, antara lain mengukur aktivitas satu atau lebih antimikroba terhadap inokulum bakteri, mendeteksi keberadaan mekanisme resistensi spesifik pada inokulum bakteri, dan merupakan metode khusus untuk mengukur interaksi antara mikroba dan antimikroba (Soleha, 2015).

Berdasarkan rekomendasi *Clinical and Laboratories Standards Institute (CLSI)* uji sensitivitas terhadap suatu bakteri dapat dilakukan dengan beberapa metode, dua diantaranya yaitu metode dilusi dan metode difusi. Standar yang harus dipenuhi dalam pengujian adalah konsentrasi inokulum bakteri dan media perbenihan (Mueller Hinton) dengan memperhatikan pH, konsentrasi kation, tambahan darah maupun serum, suhu inkubasi, lamanya inkubasi, dan konsentrasi antimikroba. Masing-masing metode menerapkan prinsip yang berbeda, sehingga hasil yang diperoleh juga dapat berbeda (Soleha, 2015).

2.4.2.1 Metode Dilusi

Metode dilusi digunakan untuk menentukan konsentrasi minimal antimikroba yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Prosedur



metode dilusi dilakukan dengan dua teknik pengerjaan, yaitu dilusi perbenihan cair dan dilusi agar. Metode dilusi perbenihan cair dilakukan dengan mencampur bahan antimikroba dengan suatu bakteri ke dalam tabung (*macro broth dilution*) berisi media cair. Secara umum untuk menentukan KHM diperlukan lebih dari satu pencampuran antimikroba dengan bakteri. Selain itu disediakan juga tabung kontrol positif dan negatif, dimana tabung kontrol positif berisi bakteri tanpa dicampur bahan antibakteri sedangkan tabung kontrol negatif berisi bahan antibakteri tanpa dicampur dengan bakteri. Tabung-tabung tersebut lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C lalu diamati tingkat kekeruhannya. KHM dapat ditentukan pada konsentrasi yang memiliki tingkat kekeruhan yang rendah (Yanuhar, 2016).

Metode dilusi agar dilakukan dengan menanam bakteri pada perbenihan cair yang digunakan pada dilusi cair (*broth*) sebelumnya ke dalam agar, kemudian diinkubasi semalam pada suhu 37°C. KBM dapat ditentukan pada konsentrasi yang menunjukkan ketidakadaan pertumbuhan bakteri pada agar. Keuntungan dari metode dilusi ini adalah membantu penentuan tingkat resistensi sehingga dapat menjadi petunjuk penggunaan antimikroba melalui hasil KHM. Kerugian dari metode dilusi adalah tidak efisien karena pengerjaannya yang rumit, memerlukan banyak alat-alat dan bahan serta memerlukan ketelitian dalam proses pengerjaan termasuk persiapan konsentrasi antimikroba yang bervariasi (Soleha, 2015).

2.4.2.2 Metode Difusi

Metode difusi digunakan untuk pengukuran zona hambat pertumbuhan bakteri terhadap suatu antimikroba. Uji sensitivitas ini merupakan yang paling sering dilakukan karena pelaksanaannya yang mudah, tidak mahal, dan



pengukurannya tidak sulit. Metode difusi memiliki beberapa metode, yaitu Kirby Bauer, Sumuran, dan *Pour Plate* (Pradani, 2012).

Metode difusi Kirby Bauer dilakukan dengan melakukan *streaking* inokulum standar bakteri pada permukaan medium agar dalam lempeng gelas (*patri disk*), kemudian cakram antimikroba yang terimpregnasi dengan antimikroba diletakkan pada permukaannya lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Lakukan pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri di sekitar cakram antimikroba (Pradani, 2012).

Metode difusi Sumuran sama dengan Kirby Bauer, namun perbedaannya terdapat pada fungsi cakram antimikroba yang diganti dengan sumuran berisi larutan antimikroba yang terimpregnasi dengan agen antimikroba. Pada metode difusi sumuran dilakukan pembuatan lubang pada media NAP menggunakan lubang tips atau pencadangan dan diberi suspensi bakteri dengan cara sebar menggunakan kapas lidi steril. Selanjutnya memasukkan ekstrak antibakteri pada lubang yang telah dibuat, lalu inkubasi selama 24 jam dengan suhu 35°C-37°C lalu dilakukan pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri di sekitar sumuran (Pradani, 2012; Misna dan Diana, 2016).

Metode difusi *Pour Plate* dilakukan tidak dengan *streaking* tetapi dengan mencampur bakteri dengan agar base 1,5% dalam suhu 50°C, kemudian dituangkan pada media *Mueller Hinton* agar. Setelah membeku, cakram antimikroba diletakkan di permukaan agar dan diinkubasi selama 15-20 jam dalam suhu 35°C-37°C. Lakukan pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri di sekitar cakram antimikroba (Pradani, 2012).



2.5 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses penarikan senyawa dari hewan, tumbuhan dan lain-lain dengan menggunakan pelarut tertentu. Tujuan dari ekstraksi adalah untuk menarik seluruh komponen kimia yang terdapat pada sampel. Ekstraksi didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut, dimana perpindahan terjadi antar lapisan luar kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai metode sesuai sifat dan tujuan ekstraksi. Pada proses ekstraksi, sampel yang akan digunakan bisa dalam keadaan segar maupun kering, tergantung pada sifat tumbuhan dan senyawa yang akan diisolasi (Aldi, 2016).

2.5.1 Metode Ekstraksi

2.5.1.1 Cara Dingin

1) Maserasi

Maserasi merupakan proses pengekstrakan simplisia menggunakan pelarut dengan mengalami pengocokan atau pengadukan berkali-kali pada suhu kamar. Prinsip dari metode ini adalah pencapaian konsentrasi pada keseimbangan (Ditjen POM, 2000). Metode ini dilakukan dengan mencampurkan simplisia dengan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel simplisia tercapai, kemudian pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan (Mukhriani, 2014).

2) Perkolasi

Perkolasi adalah proses ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) pada suhu kamar (Ditjen POM, 2000). Metode



ini diawali dengan membasahi simplisia secara perlahan dalam perkolator (wadah silinder yang memiliki kran pada bagian bawahnya). Pelarut dituangkan pada bagian atas simplisia dan dibiarkan menetes perlahan ke bawah (Mukhriani, 2014).

2.5.1.2 Cara Panas

1) Refluks

Metode refluks diawali dengan memasukkan simplisia dan pelarut secara bersamaan ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor, lalu pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi dan kembali ke dalam labu (Mukhriani, 2014).

2) Soxhlet

Soxhlet merupakan ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut yang relative konstan dan adanya pendingin balik (Ditjen POM, 2000). Metode ini dilakukan dengan meletakkan simplisia dalam sarung selulosa (dapat menggunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Kemudian masukkan pelarut yang sesuai ke dalam labu dan atur suhu penangas di bawah suhu reflux (Mukhriani, 2014).

3) Digesti

Digesti merupakan proses maserasi kinetik dengan pengadukan kontinu pada suhu yang lebih tinggi dari suhu kamar, umumnya dilakukan pada suhu 40°C-50°C (Ditjen POM, 2000).



4) Infus

Infus merupakan ekstraksi dengan pelarut air pada suhu penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih dengan suhu 96°C-98°C) selama 15-20 menit (Ditjen POM, 2000).

5) Dekok

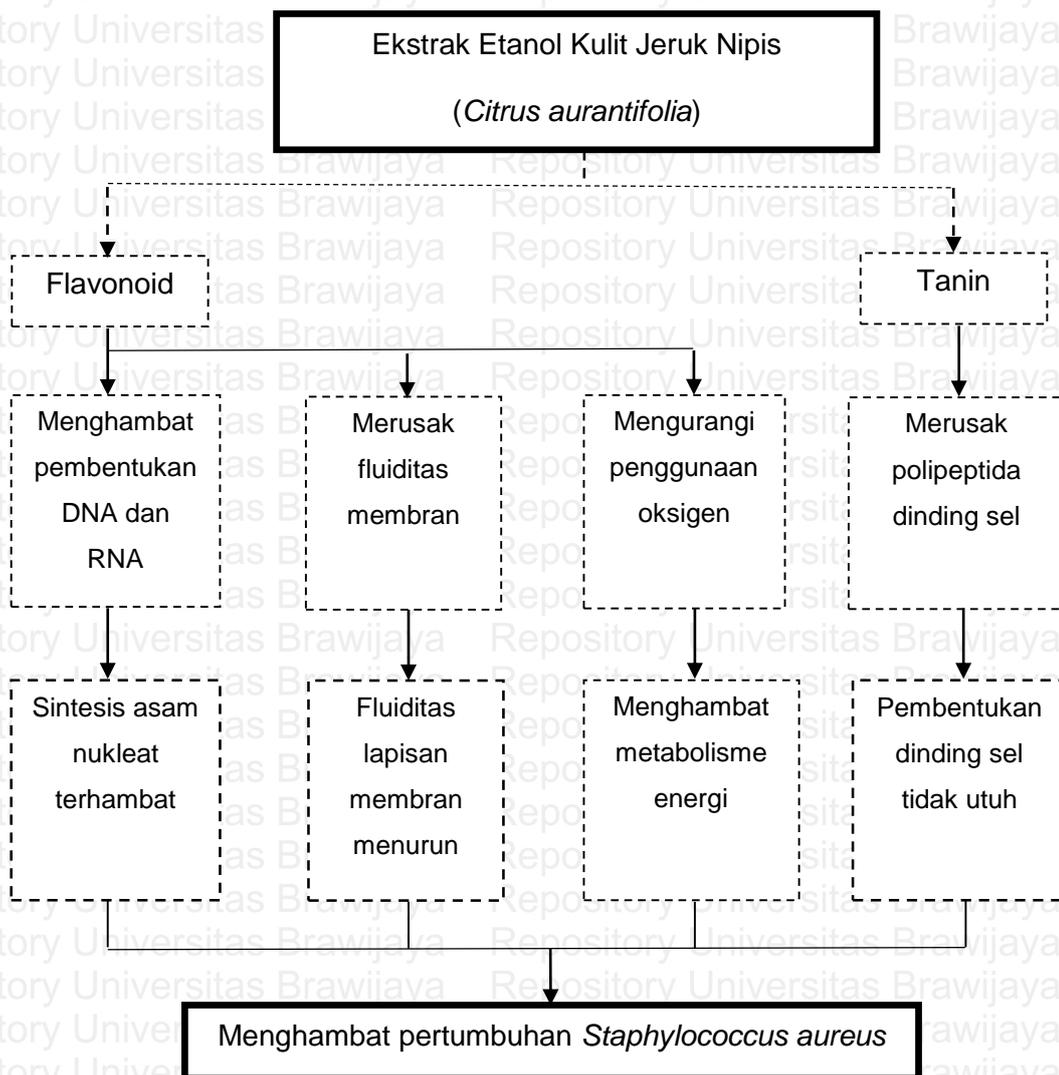
Dekok merupakan proses eskstraksi infus pada waktu yang lebih lama ($\geq 30^{\circ}\text{C}$) dengan suhu sampai titik didih air (Ditjen POM, 2000).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:



: Diamati

- - - -> : Menunjukkan kandungan



: Tidak diamati

-> : Menunjukkan proses



3.2 Deskripsi Kerangka Konsep

Ekstrak etanol kulit jeruk nipis mengandung beberapa zat aktif seperti flavonoid dan tanin. Flavonoid dalam ekstrak etanol kulit jeruk nipis dapat menghambat sintesis asam nukleat dengan menghambat pembentukan DNA dan RNA. Flavonoid dapat merusak fluiditas membran sel bakteri sehingga fluiditas lapisan membran menurun. Selain itu, flavonoid dapat mengurangi penggunaan oksigen, sehingga metabolisme energi menjadi terhambat. Tanin sebagai antibakteri dapat merusak polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi tidak utuh. Oleh karena itu, senyawa flavonoid dan tanin yang terkandung dalam ekstrak kulit jeruk nipis diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.3 Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.
2. Peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) disertai dengan peningkatan diameter zona hambat.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan *posttest only control group* untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Proses ekstraksi kulit jeruk nipis menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Sedangkan pengujian ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai antibakteri menggunakan metode difusi sumuran dengan tujuan menentukan zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada tanggal 22 Oktober 2018 sampai dengan 18 Januari 2019 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dan bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.



4.4 Besar Sampel dan Pengulangan

Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi dari ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) serta 1 kontrol *Staphylococcus aureus* tanpa diberi ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dan kontrol positif *clindamycin*, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan rumus Federer, yaitu:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

t = Jumlah perlakuan

r = Jumlah ulangan yang diperlukan

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75 \approx 5$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka penelitian ini masing-masing perlakuan dilakukan lima kali pengulangan.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini menggunakan dua macam, yaitu variabel bebas dan variabel tergantung.



4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan konsentrasi 0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, dan kontrol positif *clindamycin* 3.5 mg/mL. Konsentrasi didapatkan dari hasil penelitian pendahuluan.

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah diameter zona hambat yang terlihat di sekitar lubang sumuran.

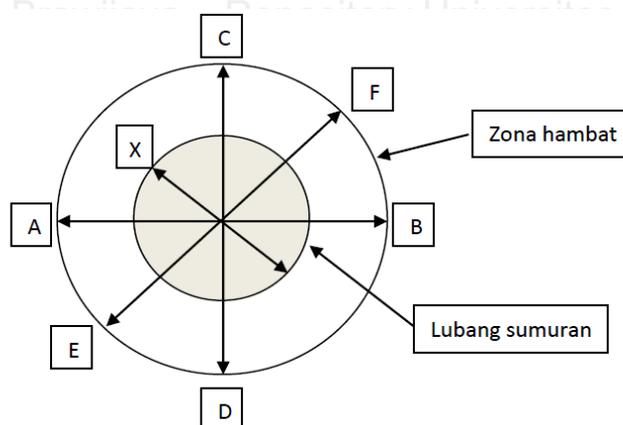
4.6 Definisi Operasional

1. Kulit jeruk nipis yang digunakan adalah kulit jeruk nipis yang sudah matang dan berwarna hijau kekuningan. Kulit jeruk nipis dibuat menjadi bentuk simplisia di Materia Medika Batu, Malang.
2. Ekstrak etanol kulit jeruk nipis adalah hasil ekstraksi metode maserasi senyawa aktif pada simplisia kulit jeruk nipis menggunakan pelarut etanol 96%.
3. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan adalah isolat *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
4. Metode difusi sumuran adalah salah satu metode uji antimikroba secara *in vitro* dengan membuat lubang pada media NAP yang tercampur suspensi bakteri dan memasukkan lubang tersebut dengan antimikroba, lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.



5. Standar kepadatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan adalah sebesar 10^6 CFU/mL.
6. Kelompok perlakuan adalah ekstrak etanol kulit jeruk nipis yang dibuat dengan konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, dan 0% berdasarkan penelitian pendahuluan.
7. Kontrol negatif adalah larutan aquades steril yang tidak diberi ekstrak etanol kulit jeruk nipis (ekstrak dengan konsentrasi 0%).
8. Kontrol positif adalah serbuk *clindamycin* 35 mg yang dilarutkan dengan pelarut aquades sebanyak 1 mL lalu diencerkan 10 kali berdasarkan penelitian pendahuluan.
9. Zona hambat adalah zona berwarna bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Zona ini diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm).
10. Rata-rata diameter zona hambat adalah penjumlahan dari tiga garis diameter zona hambat, meliputi garis tegak lurus dan garis miring dengan sudut 45° kemudian dibagi tiga lalu hasilnya dikurangi diameter lubang sumuran (Handajani, 2012).

$$\text{Rata-rata diameter zona hambat} = \frac{AB+CD+EF}{3} - X$$





Keterangan:

- AB = diameter garis horizontal pada zona hambatan
- CD = diameter garis vertikal pada zona hambatan
- EF = diameter garis miring dengan sudut 45° pada zona hambatan
- X = diameter lubang sumuran

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat dan Bahan Uji Identifikasi Bakteri

A. Alat

1. Ose
2. Pipet
3. Tabung reaksi
4. Mikroskop
5. *Tissue*
6. Lampu spiritus
7. *Glass object*
8. Inkubator

B. Bahan

1. Minyak emersi
2. Isolat *Staphylococcus aureus*
3. *Nutrient broth*
4. Kristal violet
5. Aquades
6. Larutan lugol
7. Alkohol 96%



8. Safranin
9. Hidrogen peroksida
10. Plasma darah
11. *Nutrient Agar Plate*
12. *Mannitol Salt Agar* (Hantantris, 2015).

4.7.2 Alat dan Bahan Pembuatan Suspensi Bakteri

A. Alat

1. Tabung reaksi
2. Pipet steril ukuran 1 mL dan 10 mL
3. Karet penghisap
4. Inkubator

B. Bahan

1. Isolat *Staphylococcus aureus*
2. *Nutrient broth* 9 mL
3. Larutan NaCl 9 mL (Chair, 2017).

4.7.3 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis

A. Alat

1. Oven
2. Blender
3. Timbangan
4. Gelas Erlenmeyer
5. Corong gelas



6. Kertas saring
7. Labu evaporator
8. Labu penampung etanol
9. Evaporator
10. *Rotary evaporator*/pendingin spiral
11. Selang *water pump*
12. *Water pump*
13. *Water bath*
14. *Vacum pump*
15. Botol

B. Bahan

1. kulit buah jeruk nipis
2. Etanol 96%
3. Aquades (Hantantris, 2015).

4.7.4 Alat dan Bahan Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis

A. Alat

1. Plate kosong steril
2. Mikropipet 1 mL
3. Inkubator
4. Lampu spiritus
5. Vorteks
6. Pelubang sumuran
7. Jangka sorong



B. Bahan

1. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dari *nutrient broth*
2. Ekstrak etanol kulit jeruk nipis
3. *Nutrient Agar*
4. Aquades
5. *Clindamycin* (Shabrina, 2017).

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

4.8.1.1 Inokulasi Pada *Nutrient Agar Plate*

1. Siapkan biakan *Staphylococcus aureus* pada *nutrient broth*
2. Lakukan *streaking* bakteri pada NAP
3. Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam
4. Amati koloni bakteri yang muncul. Koloni *Staphylococcus aureus* pada NAP akan berwarna kuning emas berbentuk bulat, berdiameter 1-2 mm, konveks dengan tepi rata, permukaan mengkilat dan lunak konsistensinya (Hantantris, 2015).

4.8.1.2 Pewarnaan Gram

1. Bersihkan *glass object* dengan *tissue* dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak lalu biarkan dingin
2. Teteskan satu ose aquades steril ke dalam *glass object* kemudian tambahkan dengan sedikit bakteri yang diambil dari NAP dengan menggunakan ose lalu ratakan dan biarkan hingga mengering



3. Lakukan fiksasi diatas api lalu tuang kristal violet dan diamkan selama 1 menit
4. Buang sisa bahan pewarna dan bilas dengan air
5. Tuang sediaan dengan larutan lugol selama 1 menit
6. Buang sisa lugol dan bilas dengan air
7. Tuang sediaan dengan safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik
8. Buang sisa safranin dan bilas dengan air
9. Keringkan sediaan dengan kertas penghisap dan tetesi dengan minyak imersi
10. Lihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Hasil gram positif ditunjukkan dengan warna ungu. Bakteri *Staphylococcus aureus* berbentuk kokus atau bulat menggerombol seperti anggur (Hantantris, 2015).

4.8.1.3 Uji Katalase

1. Ambil satu ose bakteri pada medium NAP yang telah dibuat lalu letakkan pada *glass object* dengan cara hapusan
2. Teteskan larutan hidrogen peroksida 3% sebanyak 1-2 tetes
3. Hasil uji katalase positif jika terbentuk gelembung gas O₂. Pada bakteri *Staphylococcus aureus* hasil uji katalase positif (Hantantris, 2015).

4.8.1.4 Uji Koagulase

1. Ambil satu lembar karton hitam kedap air khusus untuk uji koagulase dari ramel.



2. Teteskan larutan Staphaurex (latex koagulase) sebanyak 1 tetes ke atas kertas karton hitam tersebut.
3. Ambil 1 ose bakteri pada medium NAP, lalu letakkan di atas larutan Staphaurex.
4. Goyangkan kertas karton hitam selama 30-60 detik.
5. Uji koagulase positif jika terbentuk endapan seperti pasir-pasir kecil berwarna putih ke abu-abuan pada kertas karton hitam (Erikawati *et al.*, 2016).

4.8.1.5 Perbenihan Pada *Mannitol Salt Agar* (MSA)

1. Ambil satu ose bakteri dari media NAP
2. Lakukan inokulasi pada media MSA dengan suhu 37°C selama 20 jam
3. Amati koloni bakteri yang muncul. Hasil uji positif bila terlihat koloni bakteri berbentuk bulat, konveks dengan tepi rata, konsistensi lunak, dan pigmen berwarna kuning. Pigmen akan tampak jelas 1-2 jam setelah dikeluarkan dari inkubator karena adanya penyesuaian suhu inokulasi suhu ruang (Hantantris, 2015).

4.8.2 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

1. Ambil beberapa koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dari NAP dengan menggunakan ose lalu masukkan ke dalam larutan NB (*Nutrient broth*).
2. Inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C
3. Lakukan pengukuran kepadatan bakteri menggunakan spektrofotometri (panjang gelombang 625 nm) untuk mengetahui OD (*Optical Density*) dari



suspensi NB. Nilai OD sebesar 0,1 setara dengan kepadatan bakteri sebesar 10^8 CFU/mL (sesuai standar *Mc Farland*). Untuk mendapatkan kepadatan tersebut dilakukan perhitungan dengan rumus berikut ini:

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

Keterangan:

N_1 = hasil spektrofotometri

V_1 = volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^8 CFU/mL)

V_2 = volume suspensi bakteri uji (10 mL)

Hasil perhitungan dari spektrofotometri (10^8 CFU/mL) selanjutnya diencerkan sebanyak 100x dengan menggunakan NaCl, sehingga diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL (Chair, 2017).

4.8.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis

1. Jeruk nipis yang digunakan adalah buah yang sudah masak, berwarna hijau kekuningan
2. Cuci jeruk nipis hingga bersih lalu tiriskan
3. Kupas kulit jeruk nipis lalu iris tipis-tipis
4. Masukkan irisan kulit jeruk nipis ke dalam oven dengan suhu 40°C - 60°C hingga kering
5. Kulit jeruk nipis yang sudah kering dihaluskan dengan blender
6. Timbang serbuk sebanyak 100 gram lalu masukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran ± 1 L lalu direndam dengan etanol 96% sebanyak 900 mL



7. Dikocok selama \pm 30 menit dan direndam selama 1 malam sampai mengendap (dilakukan 3 kali)
8. Diambil lapisan atas yang merupakan campuran pelarut dan zat aktif (dilakukan 3 kali)
9. Masukkan ke dalam labu evaporasi 1 L
10. Pasang labu evaporasi pada evaporator
11. Isi *water bath* dengan air sampai penuh
12. Atur suhu *water bath* sampai 80°C dan sambungkan semua rangkaian alat dengan aliran listrik
13. Biarkan pelarut terpisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi
14. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung
15. Masukkan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik/kaca lalu disimpan dalam *freezer* (Hantantris, 2015).

4.8.4 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis

Ekstrak kulit jeruk nipis awal dianggap memiliki konsentrasi 100%.

Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 75%, 50%, 25%, dan

10% masing-masing sebanyak 300 μ l dengan rumus sebagai berikut:

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

75% $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$

$$V_1 \times 100 = 300 \times 75$$

$$V_1 = 225 \mu\text{l (ekstrak 100\%)} + 75 \mu\text{l aquades}$$

50% $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$



$$V_1 \times 100 = 300 \times 50$$

$$V_1 = 150 \mu\text{l (ekstrak 100\%)} + 150 \mu\text{l aquades}$$

$$25\% \quad V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 = 300 \times 25$$

$$V_1 = 75 \mu\text{l (ekstrak 100\%)} + 225 \mu\text{l aquades}$$

$$10\% \quad V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 = 300 \times 10$$

$$V_1 = 30 \mu\text{l (ekstrak 100\%)} + 270 \mu\text{l aquades}$$

4.8.5 Uji Antimikroba Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

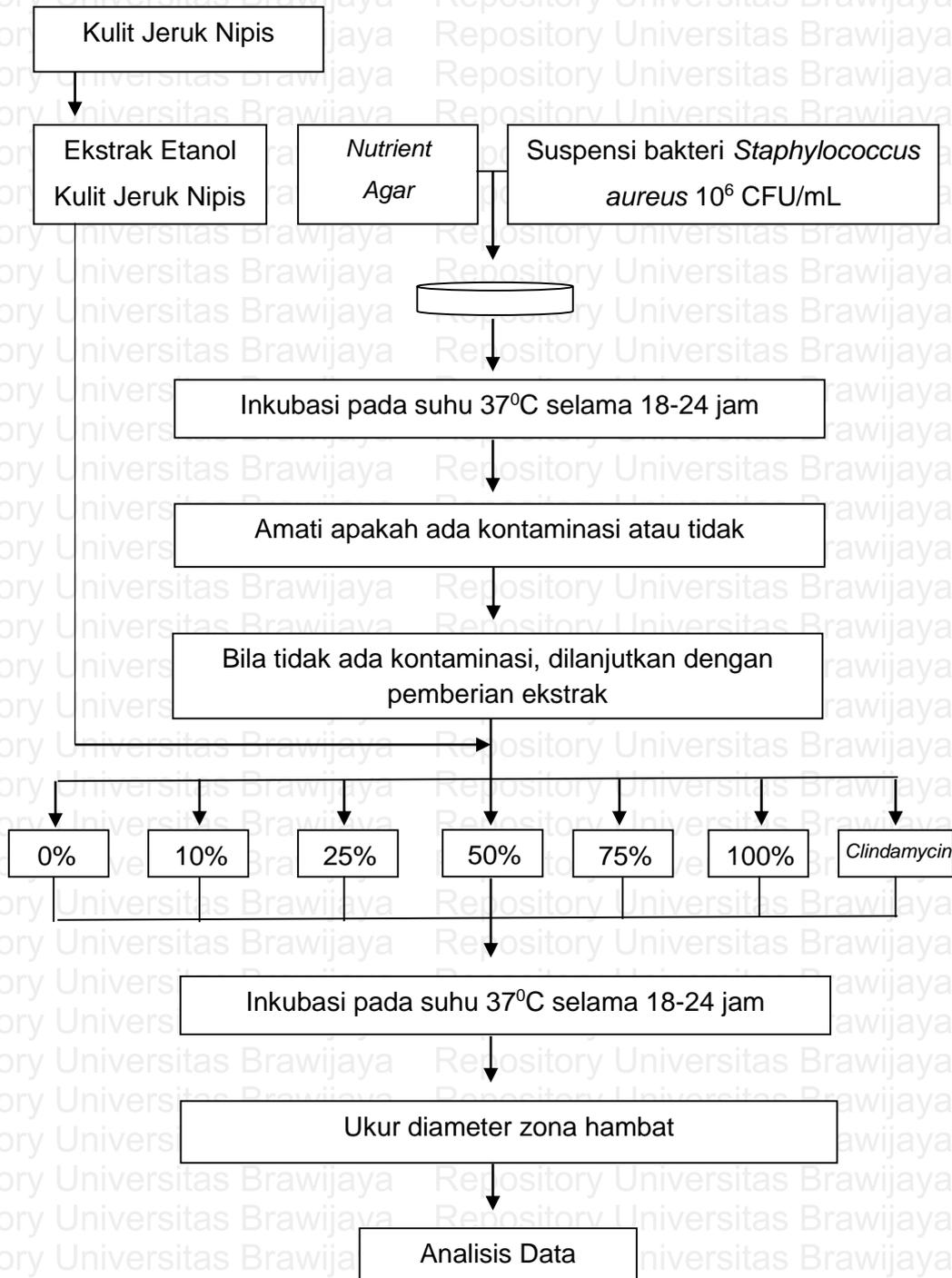
1. Ekstrak etanol kulit jeruk nipis disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit agar larutan ekstrak menjadi homogen dan tidak mengendap.
2. Sediakan 6 *petri dish* steril berdiameter 9 cm.
3. Campur suspensi bakteri dengan *nutrient agar* dalam *petri dish*. Diamkan hingga padat, lalu masukkan ke dalam inkubator semalam.
4. Ambil *petri dish* dari inkubator, amati apakah ada kontaminasi atau tidak. Bila tidak, lubangi agar dengan diameter 5 mm menggunakan *steril cork borer* sebanyak 6 lubang pada 5 *petri dish* dan 1 lubang pada 1 *petri dish*.
5. Masukkan konsentrasi ekstrak ke dalam lubang pada 5 *petri dish* dengan ketentuan sebagai berikut:
 - Lubang 1: 0% ekstrak kulit jeruk nipis, atau diisi dengan aquades steril
 - Lubang 2: 10% ekstrak kulit jeruk nipis
 - Lubang 3: 25% ekstrak kulit jeruk nipis
 - Lubang 4: 50% ekstrak kulit jeruk nipis



- Lubang 5: 75% ekstrak kulit jeruk nipis
 - Lubang 6: 100% ekstrak kulit jeruk nipis
 - Lubang 7: *clindamycin* 3.5 mg/mL
6. Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
 7. Ukur zona hambat yang nampak menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm) pada 4 *petri dish* yang berbeda (Shabrina, 2017).



4.8.6 Alur Kerja Penelitian





4.8.7 Analisis Data

Analisis statistik dilakukan dengan program SPSS (*Statistic Product of Service Solution*). Data kualitatif dan kuantitatif terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Ada 2 macam uji normalitas yang dapat dilakukan, yaitu *Kolmogorov-Smirnov* dan *Shapiro-Wilk* tergantung jumlah data yang ada. Distribusi data dikatakan normal (parametrik) apabila memiliki hasil signifikansi $p > 0.05$ dan distribusi data tidak normal apabila hasil signifikansi $p < 0.05$. Jika distribusi data normal maka uji yang digunakan adalah *One Way ANOVA*, jika distribusi data tidak normal (non parametrik) maka uji yang digunakan adalah *Kruskal-Wallis* dan Uji korelasi *Spearman*.

Dengan uji statistik *Kruskal-Wallis* dapat diketahui adanya pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Pada uji ini, jika nilai signifikansi $p < 0.05$ maka hipotesis diterima. Setelah itu untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan bermakna digunakan Uji *Mann Whitney*. Hasil uji menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna apabila nilai signifikansi $p < 0.05$. Setelah itu dilakukan uji statistik *Spearman* untuk mengetahui keeratan hubungan antara pemberian konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus*.



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Ekstraksi Etanol Kulit Jeruk Nipis

Dari jeruk nipis sebanyak 2 kilogram dihasilkan 200 gram serbuk simplisia kulit jeruk nipis. Simplisia diambil 100 gram untuk diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 3 liter. Setelah diekstraksi diperoleh ekstrak etanol kulit jeruk nipis sebanyak 11 gram. Ekstrak etanol kulit jeruk nipis yang dihasilkan berbentuk pasta kental, kasar, dan berwarna hijau tua kecoklatan.



Gambar 5.1 Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis

5.1.2 Hasil Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk memastikan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk nipis yang dibuat mengandung flavonoid, saponin, alkaloid, dan tanin. Ekstrak etanol kulit jeruk nipis diambil sebanyak 2 mL untuk dilakukan uji fitokimia di Materia Medika Batu Malang. Dari empat senyawa yang diujikan, yaitu alkaloid,



flavonoid, tanin, dan saponin hanya ada dua senyawa yang terkandung, yaitu flavonoid dan tanin. Hasil uji fitokimia pada ekstrak etanol kulit jeruk nipis adalah sebagai berikut

Tabel 5.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis

| Identifikasi Senyawa | Parameter | Hasil |
|----------------------|------------------------------------------------------|---------|
| Alkaloid | | |
| Meyer | Endapan putih | Negatif |
| Dragendrof | Endapan jingga | Negatif |
| Bouchardat | Endapan coklat | Negatif |
| Flavonoid | Merah bata, merah muda, merah tua | Positif |
| Tanin | Hijau kehitaman, biru kehitaman, coklat kehitaman | Positif |
| Saponin | Busa permanen | Negatif |

5.1.3 Hasil Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan untuk memastikan bahwa sampel bakteri yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya adalah benar *S. aureus*. Identifikasi bakteri *S. aureus* meliputi inokulasi pada *Nutrient Agar Plate* (NAP), pewarnaan gram, uji katalase, uji koagulase, dan perbenihan pada *Mannitol Salt Agar* (MSA).

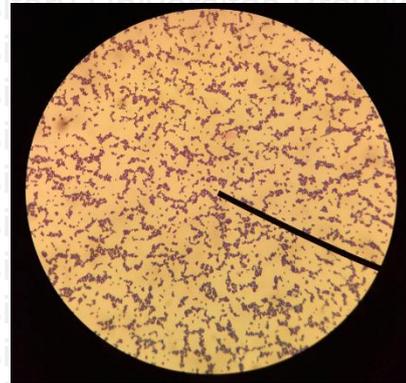
Hasil dari inokulasi pada NAP menunjukkan bahwa bakteri berwarna putih kekuningan, berbentuk bulat, dan lunak konsistensinya. Hasil ini mengindikasikan bahwa bakteri yang diuji adalah *Staphylococcus aureus* (Gambar 5.2). Hasil uji



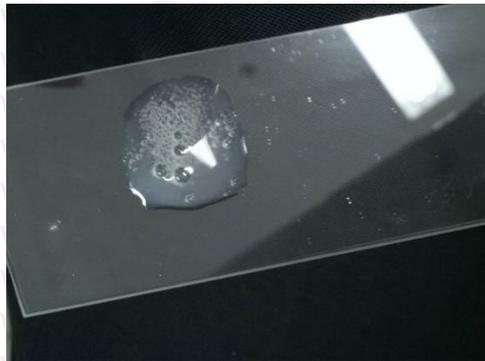
pewarnaan gram yang dapat diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x menunjukkan bahwa bakteri berwarna ungu (gram positif) dan berbentuk kokus menggerombol seperti anggur, hasil ini mengindikasikan bahwa bakteri yang diuji tergolong sebagai *S. aureus* (Gambar 5.3). Hasil uji katalase menunjukkan bahwa bakteri dapat memproduksi katalase yang ditandai dengan adanya gelembung gas O_2 , hasil ini mengindikasikan bahwa bakteri merupakan *S. aureus* (Gambar 5.4).



Gambar 5.2 Hasil Pada NAP



Gambar 5.3 Hasil Pewarnaan Gram



Gambar 5.4 Hasil Uji Katalase

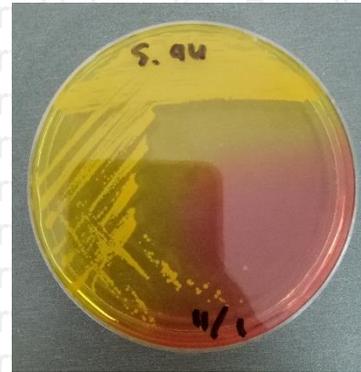
Hasil uji koagulase menunjukkan bahwa bakteri dapat memproduksi koagulase yang ditandai dengan terbentuknya gumpalan-gumpalan putih, hasil ini mengindikasikan bahwa bakteri merupakan *S. aureus* (Gambar 5.5). Hasil uji perbenihan pada *Mannitol Salt Agar* (MSA) menunjukkan bahwa bakteri dapat berfermentasi terhadap *mannitol*, hal ini ditandai dengan berubahnya warna media



MSA dari warna merah menjadi warna kuning. Hasil ini mengindikasikan bahwa bakteri merupakan *S. aureus* (Gambar 5.6). Dari berbagai uji yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa sampel bakteri yang diujikan merupakan *S. aureus*.



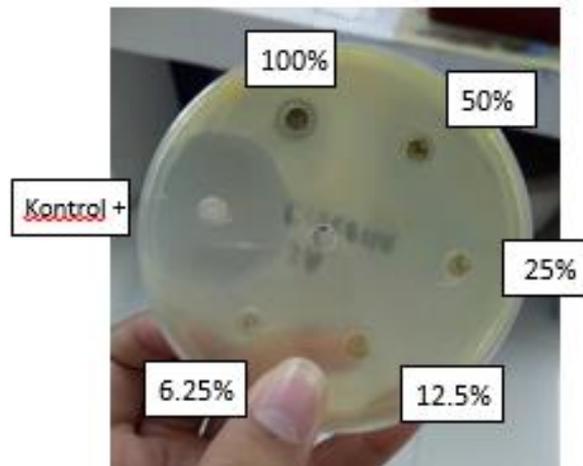
Gambar 5.5 Hasil Uji Koagulase



Gambar 5.6 Hasil Perbenihan Pada MSA

5.1.4 Hasil Penelitian Pendahuluan I

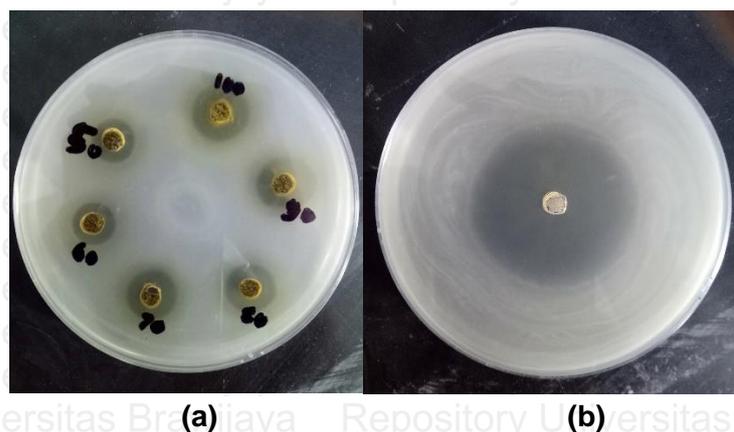
Penelitian pendahuluan ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak yang pertama kali menunjukkan adanya zona hambat pada media. Penelitian pendahuluan dilakukan secara *in vitro* dengan metode difusi sumuran. Suspensi bakteri *S. aureus* yang digunakan adalah 10^6 CFU/mL. Penelitian pendahuluan menggunakan 5 konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis dengan 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif. Konsentrasi yang digunakan adalah 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, dengan kontrol negatif 0%, dan kontrol positif *clindamycin* 3.5 mg/mL. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa zona hambat pertama kali terlihat jelas pada konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis 50%.



Gambar 5.7 Hasil Penelitian Pendahuluan I

5.1.5 Hasil Penelitian Pendahuluan II

Penelitian pendahuluan II dilakukan menggunakan 6 konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis dan 1 kontrol positif. Penelitian pendahuluan ini dilakukan untuk mengetahui diameter zona hambat pada konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, dan 1 kontrol positif *clindamycin* 3.5 mg/mL. Hasil dari penelitian pendahuluan II adalah sebagai berikut



Gambar 5.8 Hasil Penelitian Pendahuluan II

Keterangan:

- (a) = Zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% ekstrak etanol kulit jeruk nipis
- (b) = Zona hambat yang terbentuk pada kontrol positif, *clindamycin* 3.5 mg/mL



Tabel 5.2 Hasil Penelitian Pendahuluan II

| Konsentrasi Ekstrak | Rata-Rata Diameter Zona Hambat |
|---------------------|--------------------------------|
| 50% | 5.37 mm |
| 60% | 5.67 mm |
| 70% | 7.5 mm |
| 80% | 7.5 mm |
| 90% | 8.83 mm |
| 100% | 9.33 mm |
| Kontrol Positif | 27.83 mm |

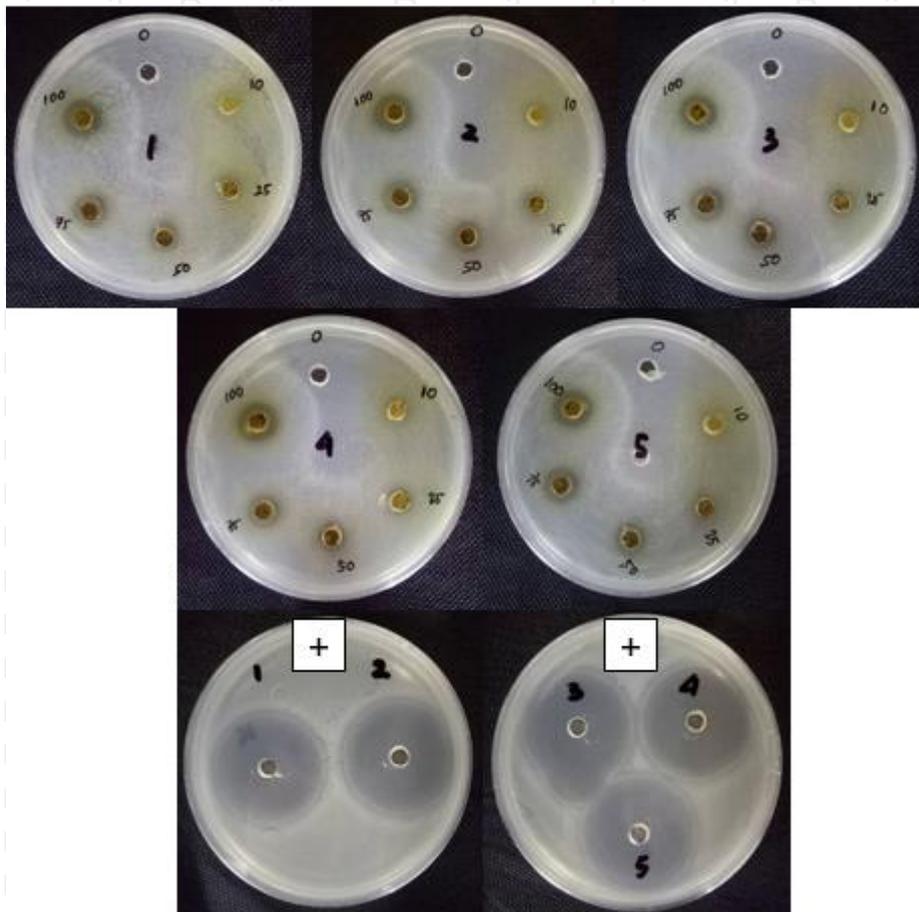
Dari hasil penelitian pendahuluan II menunjukkan bahwa diameter zona hambat pada konsentrasi 50% dan 60% adalah sama, begitu pula pada konsentrasi 70% dan 80%. Maka dari itu untuk melanjutkan penelitian digunakan konsentrasi 0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100% dan kontrol positif *clindamycin* 3.5 mg/mL.

5.1.6 Hasil Uji Antibakteri

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak etanol kulit jeruk nipis yang diekstraksi dengan metode maserasi. Uji antibakteri ekstrak etanol kulit jeruk nipis terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, dengan kontrol negatif 0%, dan kontrol positif *clindamycin* 3.5 mg/mL. Ekstrak etanol kulit jeruk nipis memiliki sifat antibakteri apabila terdapat zona hambat berwarna bening pada sekitar lubang sumuran. Diameter zona hambat yang melingkar di sekitar lubang sumuran diukur menggunakan jangka sorong



dengan satuan millimeter (mm). Penelitian ini dilakukan sebanyak lima kali pengulangan berdasarkan perhitungan rumus Federer. Hasil dari pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran adalah sebagai berikut



Gambar 5.9 Hasil Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis terhadap *Staphylococcus aureus*

Keterangan:

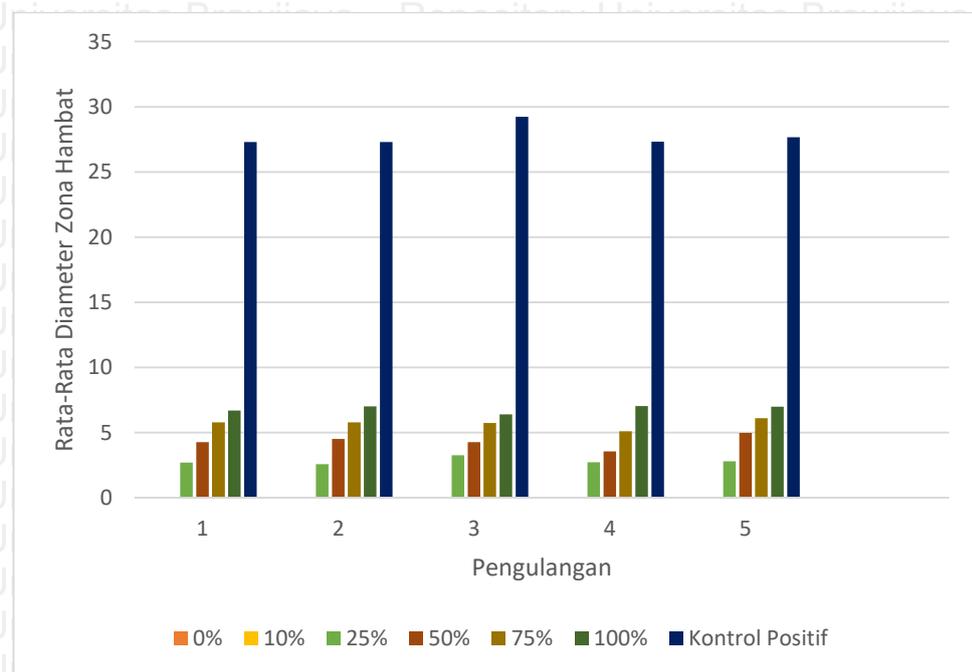
Angaka 1,2,3,4, dan 5 menunjukkan nomor pengulangan penelitian

(+) menandakan kontrol positif, yaitu *clindamycin*

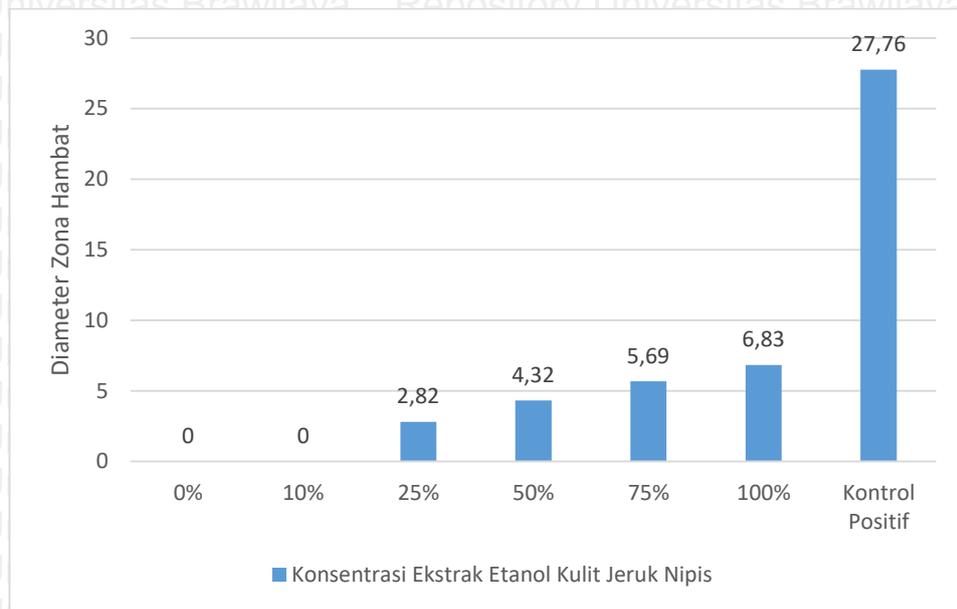


Tabel 5.3 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis terhadap *Staphylococcus aureus*

| Konsentrasi | Pengulangan | | | | | Rata-Rata (mm) |
|------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| | 1 (mm) | 2 (mm) | 3 (mm) | 4 (mm) | 5 (mm) | |
| 0% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25% | 2,7 | 2,58 | 3,27 | 2,73 | 2,8 | 2,82 |
| 50% | 4,28 | 4,51 | 4,28 | 3,55 | 4,97 | 4,32 |
| 75% | 5,78 | 5,78 | 5,73 | 5,1 | 6,1 | 5,69 |
| 100% | 6,7 | 7,01 | 6,41 | 7,03 | 6,98 | 6,83 |
| Kontrol Positif | 27,3 | 27,3 | 29,23 | 27,33 | 27,67 | 27,76 |



Gambar 5.10 Grafik Zona Hambat Beberapa Konsentrasi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*



Gambar 5.11 Grafik Rata-Rata Zona Hambat Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis terhadap *Staphylococcus aureus*

Berdasarkan hasil penelitian (Tabel 3.5) menunjukkan bahwa zona hambat terbentuk pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. Hal ini menandakan bahwa ekstrak kulit jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Namun, masih ada beberapa bakteri *Staphylococcus aureus* yang dapat bertahan terhadap ekstrak kulit jeruk nipis yang ditandai dengan tidak adanya zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi dibawah 25%.

Bila dibandingkan dengan kontrol positif, *clindamycin* lebih kuat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan hasil penelitian (Gambar 5.9) terlihat bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis maka semakin besar pula lingkaran diameter zona hambat yang terbentuk. Berdasarkan hasil pengukuran (Tabel 5.3) menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis maka semakin besar pula rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Sehingga



dapat disimpulkan bahwa ukuran zona hambat berbanding lurus dengan konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis.

5.2 Analisis Data

Pada penelitian ini, konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis merupakan variabel bebas dan zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan variabel tergantung. Hasil penelitian berupa adanya zona hambat berwarna bening di sekitar lubang sumuran yang dihitung diameternya menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter. Setelah dilakukan pengamatan, data dianalisis secara statistik.

5.2.1 Uji Normalitas

Langkah pertama dalam menganalisis data adalah melakukan uji normalitas. Karena jumlah data yang diujikan tidak lebih dari 50, maka digunakan Uji *Shapiro-Wilk*. Hasil analisis data dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* menunjukkan signifikansi $p = 0.000$, menandakan bahwa distribusi data tidak normal karena signifikansinya < 0.05 . Maka dari itu uji statistik yang digunakan adalah nonparametrik, yaitu Uji *Kruskal-Wallis* dan Uji *Mann-Whitney*.

Tabel 5.4 Hasil Uji Normalitas

| | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|-----------------------------|--------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Diameter Zona Hambat | .321 | 35 | .000 | .676 | 35 | .000 |

a. Lilliefors Significance Correction



5.2.2 Uji Kruskal-Wallis

Uji *Kruskal-Wallis* digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Hasil analisis dari Uji *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai signifikansi $p = 0.000$ ($p < 0.05$). Dari uji ini dapat disimpulkan bahwa pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis terdapat perbedaan efek yang bermakna terhadap diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

Tabel 5.5 Hasil Uji *Kruskal-Wallis*

| | Rata-Rata Diameter Zona Hambat |
|--------------------------------|--------------------------------|
| Chi-Square | 33.137 |
| df | 6 |
| Asymp. Sig. | .000 |
| a. Kruskal Wallis Test | |
| b. Grouping Variable: Kelompok | |

5.2.3 Uji Mann-Whitney

Uji *Mann-Whitney* digunakan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan bermakna. Hasil analisis dari Uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa antara konsentrasi satu dengan yang lainnya memiliki perbedaan yang bermakna kecuali pada konsentrasi 0% dengan 10% dan 75% dengan 100%.

Tabel 5.6 Hasil Uji *Mann-Whitney*

| | 0% | 10% | 25% | 50% | 75% | 100% | Kontrol |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|
| | | | | | | | Positif |
| 0% | - | 1.000 | 0.005* | 0.005* | 0.005* | 0.005* | 0.005* |
| 10% | 1.000 | - | 0.005* | 0.005* | 0.005* | 0.005* | 0.005* |
| 25% | 0.005* | 0.005* | - | 0.009* | 0.009* | 0.009* | 0.009* |
| 50% | 0.005* | 0.005* | 0.009* | - | 0.009* | 0.009* | 0.009* |
| 75% | 0.005* | 0.005* | 0.009* | 0.009* | - | 0.116 | 0.009* |
| 100% | 0.005* | 0.005* | 0.009* | 0.009* | 0.116 | - | 0.009* |
| Kontrol | 0.005* | 0.005* | 0.009* | 0.009* | 0.009* | 0.009* | - |
| Positif | | | | | | | |

Keterangan:

* = Berbeda signifikan

□ = Berbeda tidak signifikan

5.2.4 Uji *Spearman*

Uji *Spearman* merupakan uji korelasi nonparametrik yang digunakan untuk

mengetahui keeratan hubungan antara pemberian konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis dengan diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil analisis dari Uji

Spearman menunjukkan nilai signifikansi $p = 0.000$, menandakan bahwa adanya hubungan yang bermakna antara pemberian ekstrak etanol kulit jeruk nipis dengan diameter zona hambat. Besar koefisien korelasi adalah 0.965, menunjukkan bahwa hubungan korelasi kuat. Tanda positif koefisien korelasi menunjukkan hubungan berbanding lurus, artinya semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk.



Tabel 5.7 Hasil Uji Spearman

| | Konsentrasi | Diameter Zona Hambat |
|-------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Spearman's rho | Correlatiion Coefficient Sig. (2-tailed) | 1.000 .965** .000 |
| | N | 30 30 |
| | Diameter Zona Hambat | Correlatiion Coefficient Sig. (2-tailed) |
| | N | .000 .965** 30 30 |

** . Correlation is significant at the .01 level (2-tailed)



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi antibakteri ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* dengan metode difusi sumuran. Ekstrak etanol kulit jeruk nipis memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan melihat adanya zona hambat berwarna bening yang terdapat di sekitar lubang sumuran. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter.

Ekstrak kulit jeruk nipis yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit jeruk nipis yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Pemilihan kulit jeruk nipis sebagai ekstrak dikarenakan jeruk nipis memiliki konsentrasi flavonoid paling tinggi pada bagian kulitnya. Pemilihan etanol 96% sebagai pelarut dikarenakan sifatnya yang mampu melarutkan hampir semua zat yang bersifat polar, semi polar, maupun non polar, dan sulit ditumbuhi kuman (Hindun, 2017). Simplisia kulit jeruk nipis dibuat di Materia Medika Batu Malang dan diekstraksi di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi karena pengerjaan dan peralatan yang digunakan lebih sederhana, selain itu dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Setiawan *et al.*, 2017).



Metode maserasi dilakukan dengan merendam 100 gram serbuk simplisia kulit jeruk nipis dengan pelarut etanol sebanyak 3 liter selama 3 hari, lalu mengambil lapisan bagian atas yang mengandung campuran pelarut dan zat aktif. Setelah itu pelarut dipisahkan dengan zat aktif melalui proses evaporasi. Didapatkan hasil ekstrak etanol kulit jeruk nipis yang berbentuk kental seperti pasta dan berwarna hijau tua kecoklatan. Setelah itu dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan zat aktif yang terdapat dalam ekstrak etanol kulit jeruk nipis.

Berdasarkan hasil uji fitokimia yang dilakukan di Materia Medika Batu Malang menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk nipis mengandung senyawa flavonoid dan tanin. Hal ini dikarenakan flavonoid dan tanin merupakan senyawa polar yang mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol. Selain itu, flavonoid memiliki sifat termolabil sehingga aman bila diekstraksi menggunakan metode maserasi karena pengerjaannya aman untuk senyawa yang tidak tahan panas (proses ekstraksi tanpa pemanasan).

Sampel bakteri yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum uji antibakteri, dilakukan uji identifikasi bakteri terlebih dahulu untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus*. Uji identifikasi pertama yang dilakukan adalah inokulasi pada NAP, hasil uji menunjukkan bahwa bakteri merupakan *Staphylococcus aureus* ditandai dengan warna putih kekuningan, berbentuk bulat, dan lunak konsistensinya. Setelah itu melakukan uji pewarnaan gram, uji ini bertujuan untuk mengamati morfologi dan mengetahui kemurnian sel bakteri (Dewi, 2013). Hasil uji mengindikasikan bahwa bakteri merupakan gram positif ditandai dengan bentuk bakteri kokus menggerombol seperti anggur dan berwarna



ungu. Warna ungu disebabkan karena bakteri mempertahankan warna pertama, yaitu kristal violet. Setelah itu melakukan uji katalase yang bertujuan untuk membedakan bakteri *Staphylococcus* dengan *Streptococcus*, dimana kelompok *Staphylococcus* bersifat katalase positif ditandai dengan adanya gelembung gas O₂. Hasil uji katalase mengindikasikan bahwa bakteri merupakan *Staphylococcus*. Setelah itu melakukan uji koagulase, uji ini bertujuan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan spesies *Staphylococcus* yang lainnya. Hasil uji koagulase mengindikasikan bahwa bakteri adalah *Staphylococcus aureus* ditandai dengan terbentuknya gumpalan-gumpalan putih. Uji identifikasi yang terakhir adalah perbenihan pada *Mannitol Salt Agar* (MSA). Uji ini bertujuan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan *Staphylococcus epidermidis* karena *S. epidermidis* tidak menyebabkan fermentasi mannitol. Hasil uji mengindikasikan bahwa bakteri adalah *Staphylococcus aureus* ditandai dengan berubahnya warna media MSA dari warna merah menjadi kuning.

Langkah penelitian selanjutnya adalah melakukan uji antimikroba ekstrak etanol kulit jeruk nipis terhadap *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi sumuran sebanyak lima kali pengulangan. Penggunaan metode difusi sumuran pada penelitian ini dikarenakan prosedurnya yang sederhana dan mudah. Selain itu, dalam pengerjaannya ekstrak langsung dimasukkan ke dalam lubang sehingga efek untuk menghambat bakteri lebih kuat. Pada metode difusi sumuran, setiap lubang diisi dengan konsentrasi ekstrak maka osmolaritas lebih menyeluruh dan homogen sehingga konsentrasi ekstrak yang dihasilkan lebih tinggi dan lebih kuat untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Misna dan Diana, 2016).

Metode difusi sumuran dilakukan dengan membuat lubang berdiameter 5 mm pada media nutrient agar padat yang telah tercampur dengan suspensi bakteri



S. aureus. Kemudian memasukkan ekstrak dengan masing-masing konsentrasi ke dalam lubang tersebut. Pada penelitian ini konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, dan *clindamycin* sebagai kontrol positif. Setelah itu, inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Besar daya antibakteri ekstrak kulit jeruk nipis dapat dilihat dari besarnya diameter zona bening di sekitar lubang sumuran. Zona bening tersebut merupakan zona hambat pertumbuhan *S. aureus* yang diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan millimeter.

Hasil penelitian pada konsentrasi 0% tidak terlihat adanya zona hambat di sekitar lubang sumuran karena yang digunakan adalah aquades tanpa diberi ekstrak sebagai kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa aquades tidak memiliki aktivitas antibakteri. Pada konsentrasi 10% juga tidak terlihat adanya zona hambat di sekitar lubang sumuran, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk nipis pada konsentrasi 10% belum mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Zona hambat mulai terlihat pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% dengan rata-rata diameter zona hambat dari 5 kali pengulangan secara berurutan adalah 2.82 mm, 4.32 mm, 5.69 mm, dan 6.83 mm. Pada hasil penelitian ini diameter zona hambat terbesar ada pada konsentrasi 100%, yaitu 6.83 mm, namun masih belum bisa mengimbangi antibiotik *clindamycin* sebagai kontrol positif dengan diameter zona hambat sebesar 27.76 mm. Hal ini menandakan bahwa *clindamycin* memiliki kekuatan yang lebih tinggi dalam menghambat dan membunuh bakteri *S. aureus*.

Clindamycin merupakan antibiotik golongan linkosamida yang memiliki spektrum luas, dimana selain diindikasikan untuk mengobati penyakit infeksi akibat bakteri gram positif juga dapat membasmi bakteri gram negatif. *Clindamycin* sebagai antibiotik berfungsi menghambat sintesis protein mikroba dengan mengikat rRNA 23S pada subunit ribosom 50S dan mencegah penempelan rantai



oligosakarida pada glikoprotein sehingga terjadi kesalahan kode genetik (Morar *et al.*, 2009; Zulfa *et al.*, 2014).

Berdasarkan hasil pengukuran dengan jangka sorong pada penelitian pendahuluan I, II, dan III terlihat adanya perbedaan efek ekstrak etanol kulit jeruk nipis terhadap diameter zona hambat. Semakin lama penelitian dilakukan, semakin berkurang diameter zona hambat yang terbentuk meskipun menggunakan konsentrasi yang sama. Hal ini menunjukkan lamanya penyimpanan ekstrak mempengaruhi efektivitas antibakteri. Penurunan daya hambat ekstrak etanol kulit jeruk nipis dikarenakan ekstrak mengalami penurunan kualitas akibat kerusakan dan pengurangan zat aktif antibakteri. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Kusuma *et al.* (2017), menunjukkan bahwa perlakuan lama penyimpanan pada ekstrak daun sirih hijau berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat bakteri *Streptococcus agalactiae*. Namun, pada hasil analisis varian menunjukkan bahwa suhu tidak mempengaruhi ekstrak yaitu pada suhu ruang (26°C-28°C) dan suhu *refrigerator* (3°C-5°C) memiliki daya hambat yang tidak jauh berbeda.

Ekstrak etanol kulit jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* karena memiliki kandungan zat aktif flavonoid dan tanin yang bersifat sebagai antibakteri. Flavonoid dan tanin merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar, hal ini yang menyebabkan flavonoid dan tanin mudah menembus lapisan peptidoglikan pada dinding sel bakteri *S. aureus* yang juga bersifat polar. Tanin memiliki kemampuan menyerang polipeptida dinding sel yang dapat menyebabkan pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna sehingga sel bakteri lisis dan mati (Setiawan *et al.*, 2017). Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri dapat dibagi menjadi tiga bagian, yaitu menghambat sintesis asam



nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi. Flavonoid menghambat sintesis asam nukleat dengan menumpuk asam basa nukleat ketika pembentukan DNA dan RNA, pada hal ini cincin A dan B yang berperan penting dalam proses interkalasi atau ikatan hidrogen. Flavonoid menghambat fungsi membran sitoplasma dengan merusak fluiditas membran pada bagian hidrofilik dan hidrofobik sehingga fluiditas lapisan luar maupun dalam menurun. Flavonoid menghambat metabolisme energi dengan mengurangi penggunaan oksigen oleh bakteri dan menghambat sitokrom C reduktase (Cushnie dan Lamb, 2005; Carolia dan Noventi, 2016).

Analisis data pada penelitian ini menggunakan Uji *Kruskal Wallis*, didapatkan nilai signifikansi $p < 0.05$, sehingga hasil uji menunjukkan bahwa pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis terdapat perbedaan efek yang bermakna terhadap diameter zona hambat yang terbentuk. Setelah itu, untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan bermakna dilakukan Uji *Mann-Whitney*. Hasil Uji *Mann-Whitney* menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara konsentrasi satu dengan yang lainnya, kecuali pada konsentrasi 0% dengan 10% dan konsentrasi 75% dengan 100%. Untuk mengetahui keeratan hubungan antara pemberian konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis dengan diameter zona hambat yang terbentuk maka dilakukan Uji Korelasi *Spearman*. Hasil Uji *Spearman* menunjukkan hubungan yang sangat kuat dan bermakna dengan arah korelasi positif. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk. Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk nipis memiliki efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Zona hambat yang terbentuk pada konsentasi ekstrak etanol kulit



jeruk nipis sebesar 25%, 50%, 75%, dan 100%. Hal ini membuktikan bahwa hipotesis penelitian gagal ditolak.

Sebelumnya telah dilakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri minyak atsiri kulit jeruk nipis terhadap *S. aureus* dengan metode difusi cakram Kirby-Bauer. Hasil penelitian menyatakan bahwa pada konsentrasi 50% rata-rata diameter zona hambat adalah 15.37 mm. Hasil ini lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi 50% ekstrak etanol kulit jeruk nipis karena pengaruh perbedaan kandungan zat aktif dalam masing-masing ekstrak. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri lebih kuat dalam menghambat pertumbuhan *S.aureus* (Vajriana, 2015). Selain itu, air perasan jeruk nipis sebagai antibakteri juga pernah diuji terhadap bakteri *S. aureus* menggunakan metode difusi sumuran.

Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan pada konsentrasi 25% diameter zona hambat yang terbentuk adalah 2.82 mm. Jika dibandingkan dengan ekstrak etanol kulit jeruk nipis, daya hambat yang dimiliki ekstrak etanol kulit jeruk nipis lebih baik dibandingkan dengan air perasan jeruk nipis. Hal ini dapat terjadi karena pengaruh perbedaan metode ekstraksi yang digunakan dan jumlah zat aktif yang dimiliki (Pradani, 2012). Ekstrak etanol kulit jeruk nipis juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Acinetobacter baumannii* pada konsentrasi 10%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk nipis selain memiliki efek antibakteri terhadap bakteri gram positif juga memiliki efek antibakteri terhadap bakteri gram negatif (Shabrina, 2017).

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, seperti tidak diketahui secara pasti berapa banyak senyawa yang terkandung dan persentase kadar masing-masing senyawa dalam ekstrak etanol kulit jeruk nipis. Selain itu, tidak dapat diketahui Kadar Bunuh Minimum (KBM) karena sulit untuk menghitung



jumlah zat antimikroba yang berdifusi ke dalam medium agar. Maka dari itu perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan metode lain seperti dilusi agar dan tabung. Selain itu, tidak dapat menentukan apakah antimikroba bersifat bakteriosidal karena penghambatan pertumbuhan bakteri tidak bisa memastikan bahwa bakteri benar-benar mati (Balouri *et al.*, 2016).

Aplikasi klinis ekstrak etanol kulit jeruk nipis masih memerlukan penelitian lebih lanjut lagi berupa penelitian secara *in vivo*. Hal ini diperlukan untuk mengetahui farmakodinamik, farmakokinetik, efek toksik, efek samping, dan lama penyimpanan efektif dari ekstrak etanol kulit jeruk nipis. Dengan dilakukannya penelitian lebih lanjut diharapkan dapat menjadi obat alternatif untuk mengatasi mastitis pada ibu nifas.



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka dapat ditarik kesimpulan bahwa:

- A. Ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terbukti memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.
- B. Ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.
- C. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang diberikan maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk.

7.2 Saran

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya adalah:

- A. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut mengenai kadar masing-masing senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit jeruk nipis agar dapat menjadi landasan teori bagi peneliti selanjutnya.



- B. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui nilai KBM dengan menggunakan metode lain, seperti dilusi tabung atau pun agar.
- C. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh lama dan suhu penyimpanan ekstrak etanol kulit jeruk nipis terhadap daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus* agar dapat mengetahui lama waktu penyimpanan ekstrak untuk menghambat bakteri.
- D. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk mengetahui efek toksik dan efek samping dari penggunaan ekstrak kulit jeruk nipis agar nantinya dapat diaplikasikan secara klinis sebagai obat mastitis pada ibu nifas.



DAFTAR PUSTAKA

Abdullah M, Pratiwi D, Suswati I. Efek Antibakteri Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*) terhadap *Salmonella typhi* secara *in Vitro*, *Ejournal UMM*, 2013, 9 (2): 110-115.

Afifurrahman, Samadin K.H., Aziz S. Pola Kepekaan Bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap Antibiotik *Vancomycin* di RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang, *Majalah Kedokteran Sriwijaya*, 2014, 46 (4): 266-270.

Agoes A., 2010. *Tanaman Obat Indonesia*, Salemba Medika, Jakarta

Alasiry E., 2013. *Buku Indonesia Menyusui: Mastitis*. IDAI: Jakarta

Aldi A.T. 2016. *Efektivitas Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia) dengan NaOCl 5,25% Sebagai Alternatif Larutan Irigasi Saluran Akar dalam Menghambat Bakteri Enterococcus faecalis*. Skripsi. Diterbitkan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin, Makassar.

Astuti S., Judistiani R.T.D., Rahmiati L., Susanti A.I., 2015. *Asuhan Kebidanan Nifas & Menyusui*, Erlangga, Jakarta.

Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. K. Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 2016, 6 (2): 71-79.

Bintari S., Maftuhah A., Mustikaningtyas D. Pengaruh Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Unnes Journal of Life Science* 4 (1) (2015): 60-65

Brooks G.F., Carroll K.C., Butel J.S., Morse S.A., Mietzner T.A. 2013. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 26th Edition*. The McGraw-Hill Companies: America.

Carolia N., Noventi W. Potensi Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) sebagai alternatif terapi Acne vulgaris. *Jurnal Majority*, 2016, 5 (1), 140-145.

Chair, M. M. E., 2017. *Potensi Antimikroba Ekstrak Etanol Buah Pare (Momordica charantia L) terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus Secara In Vitro dengan Metode Dilusi Agar*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Cushnie T.P.T., Lamb A.J. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005, 26: 343-356.

Dalimartha S., 2000. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, Trobus Agriwidya, Bogor.



Depkes RI Angka Kematian Ibu (AKI): 2010 [di unduh pada tanggal 29 Mei 2018]
<http://www.depkes.go.id>

Depkes RI. 2013. Riset Kesehatan Dasar. Jakarta: Badan Penelitian dan pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.

Dermawan D., 2015. *Farmakologi untuk Keperawatan*, Gosyen Publishing, Yogyakarta.

Dewi A.K. Isolasi, Identifikasi dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap Amoxicillin dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis Di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. *Jurnal Sain Veteriner*, 2013, 31 (2): 138-150.

Ditjen POM. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI

Dixon J.M., Khan L.R. (2011). Treatment of Breast infection. *Bmj*, 2011, 342: d396.

Erikawati D., Santosaningsih D., Santoso, S. Tingginya Prevalensi MRSA pada Isolat Klinik Periode 2010-2014 di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang, Indonesia. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 2016, 29 (2), 149-156.

Garcia A., Montemayor N.E.S., Trevino E.E., Gonzalez E.G., Alvarez L., Corona M.R.C., Chemical Compositon of Hexane Extract of *Citrus aurantifolia* and Anti-*Myobacterium tuberculosis* Activity of Some of Its Constituents, *Molecules*, 2012, 17, 11173-11184.

Handajani J. Efek Antimikroba Pasta Gigi Kandungan Ekstrak Daun Teh 2% (*Camellia sinensis*) Terhadap *A. Actinomycetemcomitans*. *Maj Ked Gi*, 2012, 19(1): 9-12.

Hantantris D. 2015. *Efek Antibakteri Ekstrak Kulit Jeruk Purut (Citrus hystrix) Terhadap Pertumbuhan Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Harti A.S., 2015. *Mikrobiologi Kesehatan; Peran Mikrobiologi Bagi Kesehatan*. Andi, Yogyakarta.

Hindun S., Rusdiana T., Abdasah M., Hindritiani R. Potensi Limbah Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai Inhibitor Tirosinase, *IJPST*, 2017, 4 (2): 64-69

Khasanah. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Nipis (*citrus aurantifolia*) dengan Metode dpph (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Semarang: Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

Kusuma S.A.F., 2009. *Staphylococcus aureus*. Makalah, Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Jatinangor.



Kusuma M. S., Susilorini T. E., Surjowardojo P. Pengaruh Lama dan Suhu Penyimpanan Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle linn*) Dengan Aquades Terhadap Daya Hambat Bakteri *Streptococcus agalactiae* Penyebab Mastitis pada Sapi Perah. *TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production*, 2017, 18 (2): 14-21.

Locke T., Keat S., Walker A., Mackinnon R. 2012. *Microbiology and Infectious Disease on the move*. Rizqi Akbarini (penerjemah), 2013, PT Indeks, Jakarta.

Madduluri S., Rao K.B., Sitaram B. In Vitro Evaluation of Antibacterial Activity of Five Indegenous Plants Extract Against Five Bacterial Pathogens of Human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013;5(4): 679-684.

Mansyur N. dan Dahlan A.K. 2014. *Buku Ajar: Asuhan Kebidanan Masa Nifas Dilengkapi dengan Penuntun Belajar*. Selaksa Media. Malang.

Miksusanti. 2008. *Kajian Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Temu Kunci dan Aplikasinya dalam Film Edibel Antibakteri*. Proposal Disertasi. Diterbitkan, Fakultas Ilmu Teknologi Pangan IPB, Bogor.

Misna dan Diana K. Aktifitas Antibakteri Ekstrak Kulit Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *GALENIKA Journal of Pharmacy*, 2016, 2 (2): 138-144.

Morar M., Bhullar K., Hughes D. W., Junop M., Wright G. D. Structure and mechanism of the lincosamide antibiotic adenylyltransferase LinB. *Structure*, 2009, 17 (12): 1649-1659.

Mukhriani. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif, *Jurnal Kesehatan*, 2014, 7(2): 361-367

Pasaribu F. 2017. *Uji Efektivitas ESkrak Kulit Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia (Chrism.) Swingle) Terhadap Beberapa Bakteri Patogen Periodontal Secara In Vitro*. Tesis. Diterbitkan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sumatera Utara, Medan.

Pathan R.K., Gali P.R., Pathan P., Gowtham T., Pasupuleti S. *In Vitro* Antimicrobial Activity of *Citrus aurantifolia* and Its Phytochemical Screening, *Asian Pasific Journal of Tropical Disease*, 2012, S328-S331

Pradani N.R. 2012. *Uji Aktivitas Antibakteri Air Perasan Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia, Swingle) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Skripsi. Diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Jember.

Purnomosidhi P., Suparman J.M., Roshetko dan Mulawarman. 2007. *Perbanyakan dan Budidaya Tanaman Buah-Buahan: Durian, Mangga, Jeruk, Melinjo*,



dan Sawo. Pedoman Lapang, Edisi kedua. World Agroforestry Centre (ICRAF) dan Winrock International, Bogor.

Putra D.P. 2012. *Cemaran Staphylococcus aureus pada Daging Ayam yang Dijual di Pasar-Pasar di Tangerang Selatan*. Skripsi. Diterbitkan, Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor.

Rukmana H.R., 2003. *Jeruk Nipis: Prospek Agribisnis. Budidaya, dan Pascapanen*, Kanisius, Yogyakarta.

Saifuddin A.B. 2014. *Ilmu Kebidanan Sarwono Prawirohardjo*. PT Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. Jakarta.

Saparinto C. dan Susiana R., 2016. *Panduan Praktis Menanam 51 Tanaman Obat Populer di Pekarangan*, Lily Publisher, Yogyakarta.

Setiadi dan Parimin. 2004. *Budidaya Jeruk Asam di Kebun dan di Pot*, Penebar Swadaya, Jakarta, hal. 136

Setiawan E., Setyaningtyas T., Kartika D., Ningsih, D. R. Potensi Ekstrak Metanol Daun Mangga Bacang (*Mangifera foetida L.*) Sebagai Antibakteri Terhadap *Enterobacter aerogenes* dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya. *Jurnal Kimia Riset*, 2017, 2(2), 108-117.

Shabrina L. 2017. *Uji Efek Antimikroba Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Soedarto, 2015. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Sagung Seto.

Soleha T.U. Uji Kepekaan terhadap Antibiotik, *Juke Unila*, 2015, 5,9,119-123.

Spencer J.P. Management of Mastitis in Breastfeeding Women, *American Family Physician*, 2008, 78(7): 727-732.

Sunaryo, 2014. *Kimia Farmasi*, EGC, Jakarta.

Vajriana E. 2015. *Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia) terhadap Isolat Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh.

Warsa U.C. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran Edisi Revisi*, Binarupa Aksara, Jakarta.

WHO. 2003. *Mastitis: Penyebab & Penatalaksanaan*. Widya Medika, Jakarta

Yanuhar U. 2016. *Mikroalga Laut Nannochloropsis oculata*. Malang: UB Press



Zulfa M., Dewantiningrum J., dan Ciptaningtyas V. R. 2014. *Perbedaan Keberhasilan Terapi Klindamisin Oral Dan Metronidazol Oral Terhadap Bakterial Vaginosis Pada Kehamilan*. Karya Tulis Ilmiah. Diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Normalitas dan *Kruskal-Wallis*

Tests of Normality

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Diameter Zona Hambat | .321 | 35 | .000 | .676 | 35 | .000 |

a. Lilliefors Significance Correction

Keterangan: Hasil Uji Normalitas

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank |
|----------------------|----------|----|-----------|
| Diameter Zona Hambat | 0% | 5 | 5.50 |
| | 10% | 5 | 5.50 |
| | 25% | 5 | 13.00 |
| | 50% | 5 | 18.00 |
| | 75% | 5 | 24.00 |
| | 100% | 5 | 27.00 |
| | K Pos | 5 | 33.00 |
| | Total | 35 | |

Test Statistics^{a,b}

| | Diameter Zona Hambat |
|-------------|-------------------------|
| Chi-Square | 33.137 |
| df | 6 |
| Asymp. Sig. | .000 |

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

Keterangan: Hasil Uji *Kruskal-Wallis*

Lampiran 2. Hasil Uji *Mann-Whitney*

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 0% | 5 | 5.50 | 27.50 |
| | 10% | 5 | 5.50 | 27.50 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | 12.500 |
| Wilcoxon W | 27.500 |
| Z | .000 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | 1.000 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | 1.000 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 0% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 25% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.785 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .005 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok



Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 0% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 50% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.795 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .005 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 0% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 75% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.795 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .005 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok



Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 0% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 100% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.785 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .005 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 0% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | K Pos | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.795 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .005 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok



Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 10% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 25% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.785 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .005 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 10% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 50% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.795 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .005 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok



Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 10% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 75% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.795 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .005 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 10% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 100% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.785 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .005 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok



Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 10% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | K Pos | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.795 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .005 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 25% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 50% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.619 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok



Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 25% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 75% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.619 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 25% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 100% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.611 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok



Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 25% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | K Pos | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.619 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 50% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 75% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.627 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok



Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 50% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | 100% | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.619 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 50% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | K Pos | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.627 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok



Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 75% | 5 | 4.00 | 20.00 |
| | 100% | 5 | 7.00 | 35.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | 5.000 |
| Wilcoxon W | 20.000 |
| Z | -1.571 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .116 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .151 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 75% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | K Pos | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.627 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok



Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------------|----------|----|-----------|--------------|
| Diameter Zona Hambat | 100% | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | K Pos | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^b

| | Diameter Zona Hambat |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.619 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Correlations

| | | | Konsentrasi | Diameter Zona Hambat |
|----------------|----------------------|-------------------------|-------------|-------------------------|
| Spearman's rho | Konsentrasi | Correlation Coefficient | 1.000 | .965** |
| | | Sig. (2-tailed) | . | .000 |
| | | N | 30 | 30 |
| | Diameter Zona Hambat | Correlation Coefficient | .965** | 1.000 |
| | | Sig. (2-tailed) | .000 | . |
| | | N | 30 | 30 |

** . Correlation is significant at the .01 level (2-tailed).

Keterangan: Hasil Uji Korelasi *Spearman*



Lampiran 3. Sertifikat Determinasi Tanaman



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU

Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396

KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 350A/ 102.7/ 2018
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Jeruk Nipis**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : GRECELLA JANETA A.
NIM : 155070607111012
Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman jeruk nipis

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Rutales
Suku : Rutaceae
Marga : Citrus
Jenis : *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle
Nama Daerah : Limau tipis (Melayu), jeruk nipis (Jawa Tengah).
Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-15b-197b-208b- 219b-220b-224b-225b-227b-229a-1a-1b-3b.

2. Morfologi

: Habitus: Perdu, tinggi ± 3.5 m. Batang: Berkayu, bulat, berduri, putih kehijauan. Daun: Majemuk, elips atau bulat telur, pangkal membulat, ujung tumpul, tepi berbinggit, panjang 2.5-9 cm, lebar 2-5 cm, pertulangan menyirip, tangkai 5-25 mm, bersayap, hijau. Bunga: Majemuk atau tunggal, di ketiak daun atau di ujung batang, diameter 1.5-2.5 cm, kelopak bentuk mangkok, berbagi empat sampai lima, diameter 0.4-0.7 cm, putih kekuningan, benang sari 0.5-0.9 cm, tangkai sari 0.35-0.40 cm, kuning, bakal buah bulat, hijau kekuningan, tangkai putik silindris, putih kekuningan, kepala putik bulat, tebal, kuning, daun mahkota empat sampai lima, bulat telur atau lanset, panjang 0.7-1.25 cm, lebar 0.25-0.50 cm, putih. Buah: Buni, diameter 3.5-5 cm, masih muda hijau setelah tua kuning. Biji: Bulat telur, pipih, putih kehijauan. Akar: Tunggang, bulat, putih kekuningan.

3. Nama Simplisia

: Citri aurantiifoliae Pericarpium/ Kulit buah jeruk nipis.

4. Kandungan Kimia

: Kulit buah mengandung saponin dan flavonoida, minyak atsiri, asam sitrat, hesperidin, dan aurantiamarin, serta asam sitral, linna, lisasetat, d-limonen, L-linaliol, dihidrokumarinalkohol, terpenool, pinen, kamfen, limonen, linalin asetat, geranil asetat, fellandren dan sitral. Di samping itu, jeruk nipis mengandung asam sitrat.

5. Penggunaan

: Penelitian.

6. Daftar Pustaka

- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.





Lampiran 4. Surat Hasil Uji Fitokimia



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

Nomor : 074 / 128D / 102.7 / 2018
Sifat : Biasa
Perihal : Surat Keterangan Analisa Kualitatif

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

- Identitas Pemohon
 - Nama : Grecella Janeta Agape
 - NIM : 155070607111012
 - Instansi : Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya
 - Alamat Instansi : Malang
 - Nomor Telp. Instansi : -

- Identitas Sampel
 - Nama daerah sampel : Jeruk Nipis
 - Nama latin : *Citrus aurantifolia*
 - Bagian sampel : Kulit
 - Bentuk sampel : Ekstrak
 - Pelarut : Etanol 96%
 - Asal sampel : -
 - Tanggal penerimaan : 14 November 2018
 - Tanggal pemeriksaan : 14 November 2018

3. Hasil

| No | Identifikasi Senyawa | Parameter | Hasil |
|----|----------------------|---------------------------------------------------|---------|
| 1. | Alkaloid | | |
| | Meyer | Endapan Putih | Negatif |
| | Dragendrof | Endapan Jingga | Negatif |
| | Bouchardat | Endapan Cokelat | Negatif |
| 2. | Flavonoid | Merah Bata, Merah Muda, Merah Tua | Positif |
| 3. | Tanin | Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman, Coklat Kehitaman | Positif |
| 4. | Saponin | Busa Permanen | Negatif |

4. Lampiran

| Nama Sampel | Alkaloid | | |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------|------------|
| | Meyer | Dragendrof | Bouchardat |
| Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>) | | | |
| Nama Sampel | Flavonoid | Tanin | Saponin |
| | Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>) | | |

5. Pustaka

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1978. "Materia Medika Indonesia", Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya

Batu, 15 November 2018

Kepala UPT MATERIA MEDICA BATU



M. Husin RM, Drs., Apt., MKes.
NIP.19611102 199103 1 003