

**SKRIPSI**

**UJI POTENSI ANTITUBERKULOSIS EKSTRAK N-HEKSAN  
DAN EKSTRAK ETANOL DAUN JERUK NIPIS  
(*Citrus aurantiifolia*) SECARA *IN VITRO***

**OLEH:  
ALYA ROSANDIYUS PUTRI  
NIM: 2005002**



**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI  
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN INDAH MEDAN  
MEDAN  
2024**

## **SKRIPSI**

# **UJI POTENSI ANTITUBERKULOSIS EKSTRAK N-HEKSAN DAN EKSTRAK ETANOL DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantiifolia*) SECARA *IN VITRO***

Diajukan Untuk Melengkapi dan Memenuhi Syarat-syarat Untuk Memperoleh  
Gelar Sarjana Farmasi Pada Program Studi Sarjana Farmasi  
Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Indah Medan

**OLEH:**  
**ALYA ROSANDIYUS PUTRI**  
**NIM: 2005002**



**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI  
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN INDAH MEDAN  
MEDAN  
2024**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI**  
**SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN INDAH MEDAN**

---

**TANDA PERSETUJUAN SKRIPSI**

Nama : Alya Rosandiyus Putri  
NIM : 2005002  
Program Studi : Sarjana Farmasi  
Jenjang Pendidikan : Strata Satu (S-1)  
Judul Skripsi : Uji Potensi Antituberkulosis Ekstrak N-Heksan Dan Ekstrak  
Etanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantiifolia*) Secara *In Vitro*

**Pembimbing I**



(Dr. apt. Cut Fatimah., M.Si.)  
NIDK. 9990275012

**pembimbing II**



(apt. Drs. Muhammad Gunawan., M.Si.)  
NIDN. 0003056711

**Penguji**



(apt. Safriana, S.Farm., M.Si.)  
NIDN. 0116099102

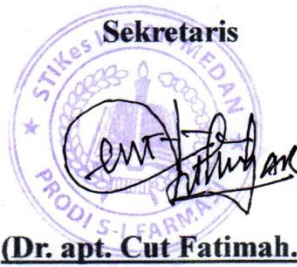
**DIUJI PADA TANGGAL : 19 September 2024**  
**YUDISIUM : 19 September 2024**

**Ketua**



(Andila, S.Kep., Ners., M.K.M.)  
NIDN. 0129017901

**Sekretaris**



(Dr. apt. Cut Fatimah., M.Si.)  
NIDK. 9990275012

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

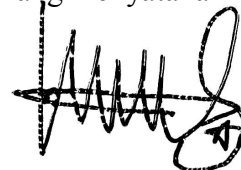
Nama : Alya Rosandiyus Putri  
NIM : 2005002  
Program Studi : Sarjana Farmasi  
Jenjang Pendidikan : Strata Satu (S-1)  
Judul Skripsi : Uji Potensi Antituberkulosis Ekstrak N-Heksan Dan  
Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantiifolia*)  
Secara *In Vitro*

Menyatakan skripsi yang saya buat ini adalah untuk memenuhi persyaratan kelulusan di Program Studi Sarjana Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Indah Medan. Skripsi ini adalah hasil karya sendiri, bukan duplikasi dari karya orang lain yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan yang lain atau yang pernah dimuat di suatu publikasi ilmiah, kecuali dalam bentuk kutipan yang telah disebutkan sumbernya dalam pustaka.

Selanjutnya apabila dikemudian hari ada pengaduan dari pihak lain, bukan menjadi tanggung jawab Dosen Pembimbing, Penguji dan/atau pihak Program Studi Sarjana Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Indah Medan, tetapi menjadi tanggung jawab sendiri. Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya dan tanpa paksaan dari siapapun.

Medan, 19 September 2024

Yang menyatakan



Alya Rosandiyus Putri

# UJI POTENSI ANTITUBERKULOSIS EKSTRAK N-HEKSAN DAN EKSTRAK ETANOL DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantiifolia*) SECARA *IN VITRO*

ALYA ROSANDIYUS PUTRI  
2005002

## ABSTRAK

Tuberkulosis adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* banyak diderita oleh masyarakat dan menyebabkan kematian. Saat ini pengobatan antituberkulosis banyak menggunakan obat dari bahan kimia sintetis dan telah banyak yang resisten terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Sehingga banyak penderita sulit mengalami penyembuhan, sementara penemuan obat baru antituberkulosis masih jarang ditemukan, oleh karena itu perlu dicari obat dari bahan alam yang telah digunakan oleh masyarakat untuk mengobati batuk berdarah dan berdarah yang merupakan salah satu gejala tuberkulosis. Salah satu tumbuhan yang telah digunakan masyarakat untuk mengobati batuk berdarah dan berdarah adalah daun jeruk nipis. Oleh karena itu peneliti mencoba menguji potensi ekstrak jeruk nipis ini terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.

Ekstrak daun jeruk nipis dibuat dengan cara perkolasi menggunakan n-heksan dilanjutkan fraksinasi etanol selanjutnya dilakukan uji skrining fitokimia terhadap daun segar, simplisia, ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan. Uji antituberkulosis dilakukan dengan metode *Loweinsten-Jensen* menggunakan sputum penderita yang pasien tuberkulosis telah diidentifikasi menggunakan pewarnaan *Ziehl-Nelsen*.

Hasil uji skrining fitokimia menunjukkan terdapat golongan senyawa kimia yang sama pada daun segar, simplisia dan ekstrak etanol daun jeruk nipis yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan glikosida, sedangkan pada ekstrak n-heksan hanya mengandung steroid dan glikosida. Efektifitas terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* terlihat dari ekstrak etanol lebih kuat dibandingkan ekstrak n-heksan yaitu pada minggu ke 1 terjadi penghambatan terhadap *Mycobacterium tuberculosis* sedangkan ekstrak n-heksan dari minggu ke 1 sampai minggu ke 4 tidak terjadi penghambatan.

**Kata kunci:** *Ekstrak n-heksan, ekstrak etanol, uji antituberkulosis, sputum penderita*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT. Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan berkat, rahmat dan kasih karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul “Uji Potensi Antituberkulosis Ekstrak n-heksan Dan Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantiifolia*) Secara *In Vitro*” sebagai tugas akhir salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Indah Medan.

Penulis menyadari tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sangat tidak mungkin penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Untuk itu dengan segala kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada orang tua kami ayah Mardiyus dan ibu Samsi Warni dan saudara kandung Titik Istianah yang tidak henti-hentinya begitu banyak mendo’akan dan memberikan semangat serta dukungan baik dari segi material maupun non-material sampai saat ini.

Pada kesempatan ini penulis juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

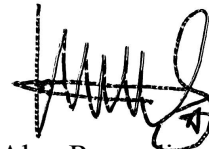
1. Bapak H. Abdul Haris Syarif Hasibuan, S.E., selaku Pembina Yayasan Indah Medan dan Bapak dr. Muhammad Riski Ramadhan Hasibuan, SH, SE, M.K.M, selaku Ketua Yayasan Indah Medan yang telah menyediakan sarana dan prasarana di STIKes Indah Medan.
2. Bapak Andilala, S.Kep., Ners., M.K.M. selaku Ketua Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Indah Medan yang telah memberikan arahan dan bimbingan selama pendidikan.

3. Ibu Dr. apt. Cut Fatimah, M.Si., selaku Ketua Prodi S-1 Farmasi STIKes Indah Medan sekaligus menjadi pembimbing 1 yang telah membimbing, memberi masukan, arahan serta doa dan membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi.
4. Bapak apt. Drs. Muhammad Gunawan, M.Si., selaku pembimbing ke 2 yang selalu memberikan arahan, dukungan, serta doa dan selalu membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi.
5. Bapak/Ibu dosen serta staff pegawai di Prodi S-1 Farmasi STIKes Indah Medan yang telah mendidik dan membantu penulis sampai sekarang ini.
6. Terima kasih juga kepada teman seangkatan yang telah kebersamaan selama kuliah dan memberi dukungan kepada penulis.

Semoga seluruh kebaikan dan bimbingan bapak/ibu mendapatkan balasan dari Allah SWT. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, Untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang sifatnya membangun demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bermanfaat untuk kita semua demi menambah ilmu pengetahuan khususnya di bidang farmasi.

Medan, 19 September 2024

Penulis



Alya Rosandiyus Putri

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>TANDA PERSETUJUAN SKRIPSI.....</b>	<b>vi</b>
<b>SURAT PERNYATAAN.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>vii</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvii</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
1.6 Kerangka Pikir Penelitian.....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Tumbuhan Jeruk Nipis.....	6
2.1.1 Taksonomi tumbuhan jeruk nipis .....	6
2.1.2 Morfologi tumbuhan jeruk nipis .....	7
2.1.3 Kandungan daun jeruk nipis .....	7



2.1.4 Manfaat daun jeruk nipis .....	8
2.2 Simplisia .....	8
2.2.1 Jenis-jenis simplisia .....	9
2.2.2 Tahap pembuatan simplisia.....	9
2.2.3 Karakteristik simplisia .....	12
2.3 Ekstraksi .....	12
2.3.1 Cara dingin.....	13
2.3.2 Cara panas.....	14
2.4 Senyawa Metabolit Sekunder .....	15
2.4.1 Alkaloid.....	15
2.4.2 Flavonoid .....	16
2.4.3 Steroid/triterpenoid .....	17
2.4.4 Tanin .....	17
2.4.5 Glikosida.....	18
2.4.6 Saponin .....	19
2.5 Tuberkulosis .....	20
2.5.1 Gejala klinis tuberkulosis.....	20
2.5.2 Diagnosis laboratorium tuberkulosis .....	20
2.5.3 Kategori penyakit tuberkulosis .....	22
2.5.4 Tindakan terapi tuberkulosis.....	23
2.6 Macam-Macam Obat Antituberkulosis .....	23
2.6.1 Etambutol .....	23
2.6.2 Rifampisin.....	24
2.6.3 Isoniazid .....	25

2.6.4 Pirazinamid.....	26
2.6.5 Streptomisin.....	26
2.7 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	27
2.7.1 Sistematika bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	27
2.7.2 Sifat- sifat umum <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	27
2.7.3 Morfologi dan fisiologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	27
2.7.4 Daya tahan <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	28
2.7.5 Perjalanan <i>Mycobacterium tuberculosis</i> di dalam tubuh .....	28
2.7.6 Kultur <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	28
2.7.7 Uji potensi antituberkulosis terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	29
2.7.8 Standarisasi uji kepekaan <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	31
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>32</b>
3.1 Rancangan Penelitian .....	32
3.1.1 Variabel penelitian .....	32
3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian .....	32
3.3 Alat dan Bahan .....	32
3.3.1 Alat-alat yang digunakan .....	32
3.3.2 Bahan-bahan yang digunakan.....	33
3.4 Persiapan Sampel.....	33
3.4.1 Pengambilan sampel jeruk nipis .....	33
3.4.2 Identifikasi/determinasi tumbuhan .....	33
3.4.3 Pembuatan simplisia daun jeruk nipis .....	33
3.5 Pemeriksaan Karakteristik Simplisia .....	34
3.5.1 Pemeriksaan makroskopik simplisia.....	34

3.5.2 Pemeriksaan mikroskopik simplisia .....	34
3.5.3 penetapan kadar air simplisia.....	34
3.6 Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Nipis .....	35
3.7 Pembuatan Larutan Pereaksi .....	36
3.7.1 Larutan pereaksi Mayer .....	36
3.7.2 Larutan pereaksi Dragendroff.....	37
3.7.3 Larutan pereaksi Bouchardat .....	37
3.7.4 Larutan pereaksi Liebarmann-Bourchard .....	37
3.7.5 Larutan Pereaksi Molish .....	37
3.7.6 Larutan timbal asetat.....	37
3.7.7 Larutan natrium hidroksida 2 N.....	37
3.7.8 Larutan asam klorida 2 N.....	38
3.7.9 Larutan asam sulfat.....	38
3.7.10 Larutan besi (III) klorida 1% .....	38
3.7.11 Larutan pereaksi kloralhidrat .....	38
3.8 Skrining Fitokimia.....	38
3.8.1 Pemeriksaan alkaloid .....	38
3.8.2 Pemeriksaan flavonoid.....	39
3.8.3 Pemeriksaan tanin.....	39
3.8.4 Pemeriksaan steroid/triterpenoid .....	39
3.8.5 Pemeriksaan saponin.....	40
3.8.6 Pemeriksaan glikosida .....	40
3.9. Persiapan Bahan Pereaksi dan Media Bakteri .....	41
3.9.1 Pembuatan malachit green 2%.....	41

3.9.2 Pembuatan pereaksi untuk pewarnaan <i>Zeihl-Nelsen</i> .....	41
3.9.3 Pembuatan media <i>Loweinstein-Jensen</i> (LJ).....	42
3.9.4 Pembuatan media <i>Loweinstein-Jensen</i> yang mengandung bahan uji .	44
3.10 Persiapan Bahan Obat (Pembanding) dan Bahan Uji.....	44
3.11 Uji Potensi Antituberkulosis Secara <i>In Vitro</i> .....	47
3.11.1 Pengambilan spesimen sputum .....	47
3.11.2 Identifikasi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (pewarnaan <i>Ziehl-Nelsen</i> )	47
3.11.3 Kultivasi dan isolasi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pada media LJ ...	48
3.11.4 Uji potensi/efektifitas antituberkulosis .....	49
3.12 Pembuatan Suspensi Bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	49
3.13 Inokulasi Suspensi Bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	49
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>50</b>
4.1 Hasil Determinasi Sampel .....	50
4.2 Hasil Pemeriksaan Makroskopik Daun Jeruk Nipis.....	50
4.3 Hasil Pemeriksaan Mikroskopik Serbuk Simplisia .....	50
4.4 Hasil Penetapan Kadar Air .....	51
4.5 Hasil Ekstraksi.....	51
4.6 Hasil Skrining Fitokimia .....	52
4.7 Identifikasi Bakteri .....	53
4.8 Hasil Uji Potensi Antituberkulosis <i>In Vitro</i> .....	53
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>59</b>
5.1 Kesimpulan.....	59
5.2 Saran.....	59
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>60</b>

LAMPIRAN.....	63
---------------	----

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1.1</b> Kerangka pikir Penelitian .....	5
<b>Gambar 2.1</b> Tumbuhan jeruk nipis ( <i>Citrus aurantiifolia</i> ) .....	6
<b>Gambar 2.2</b> Contoh struktur alkaloid .....	16
<b>Gambar 2.3</b> Contoh struktur dasar flavonoid .....	16
<b>Gambar 2.4</b> Contoh struktur dasar steroid dan triterpenoid .....	17
<b>Gambar 2.5</b> Contoh struktur tanin .....	17
<b>Gambar 2.6</b> Contoh struktur glikosida.....	19
<b>Gambar 2.7</b> Contoh struktur saponin.....	19
<b>Gambar 2.8</b> Struktur etambutol .....	23
<b>Gambar 2.9</b> Struktur rifampisin.....	24
<b>Gambar 2.10</b> Struktur isoniazid.....	25
<b>Gambar 2.11</b> Struktur pirazinamid .....	25
<b>Gambar 2.12</b> Struktur streptomisin .....	26
<b>Gambar 4.1</b> Media LJ sebelum diberikan bahan uji dan spesimen sputum tuberkulosis .....	54
<b>Gambar 4.2</b> Hasil pengamatan spesimen pada minggu ke-1 <i>in vitro</i> dalam media LJ terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	77

## **DAFTAR TABEL**

<b>Tabel 3.1</b>	Hasil perhitungan bahan obat dan bahan uji dalam media ogawa.....	46
<b>Tabel 4.1</b>	Hasil uji skrining fitokimia.....	52
<b>Tabel 4.2</b>	Hasil Uji efektifitas antituberkulosis bahan uji dan pembanding.....	55

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b> Hasil determinasi tumbuhan daun jeruk nipis .....	63
<b>Lampiran 2.</b> Gambar tumbuhan jeruk nipis.....	64
<b>Lampiran 3.</b> Hasil pemeriksaan mikroskopik simplisia daun jeruk nipis .....	65
<b>Lampiran 4.</b> Cara kerja penetapan kadar air simplisia daun jeruk nipis .....	66
<b>Lampiran 5.</b> Hasil penetapan kadar air simplisia daun jeruk nipis .....	67
<b>Lampiran 6.</b> Bagan pembuatan ekstrak etanol daun jeruk nipis.....	68
<b>Lampiran 7.</b> Hasil ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan.....	69
<b>Lampiran 8.</b> Hasil skrining fitokimia .....	70
<b>Lampiran 9.</b> Cara kerja identifikasi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	71
<b>Lampiran 10.</b> Hasil identifikasi bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	72
<b>Lampiran 11.</b> Bagan kerja pembuatan pembenihan media telur .....	73
<b>Lampiran 12.</b> Bagan kerja pemeriksaan kultur isolasi/biakan .....	74
<b>Lampiran 13.</b> Bagan kerja tes kepekaan terhadap obat .....	75
<b>Lampiran 14.</b> Media LJ sebelum diberikan bahan uji dan spesimen sputum tuberculosis.....	76
<b>Lampiran 15.</b> Hasil inkubasi dari minggu 1 sampai minggu 4 pada spesimen....	77





# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

*World Health Organization* (WHO) memperkirakan bahwa jumlah seluruh kasus tuberkulosis di dunia terus meningkat dari 7,5 juta menjadi 10,2 juta di atas tahun 2000. Sekitar tahun 2023 Indonesia menduduki urutan kedua dalam jumlah penderita tuberkulosis setelah India dan Cina. Kenaikan tersebut sebagian disebabkan oleh bertambahnya penduduk di negara yang sedang berkembang pertumbuhan penyakit tuberkulosis dapat dikurangi bila banyak negara yang menyelenggarakan program penanggulangan tuberkulosis yang efektif (Syahrial, 2013).

Tuberkulosis adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang banyak diderita oleh masyarakat dan menyebabkan kematian. *Mycobacterium tuberculosis* ditransmisikan dari orang ke orang melalui batuk dan berhubungan terlalu dekat dengan penderita tuberkulosis akan memperbesar kemungkinan penularan. *Mycobacterium tuberculosis* adalah kuman obligat aerob dengan pertumbuhan optimal pada suhu 35°C-37°C. *Mycobacterium tuberculosis* berbentuk batang dan tahan terhadap zat peluntur alkohol asam, oleh sebab itu disebut Basil Tahan Asam (BTA) (Haribi & Harahap, 2009).

Peningkatan jumlah penderita tuberkulosis disebabkan oleh berbagai faktor, yakni harga obat yang mahal, timbulnya resistensi ganda, kurangnya daya bakterisid obat yang ada, meningkatnya kasus HIV/AIDS dan krisis ekonomi. Dalam pengobatan tuberkulosis membutuhkan waktu yang panjang dan kurangnya tingkat kepatuhan penderita untuk berobat dan mengkonsumsi obat

menyebabkan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* sudah banyak yang resisten terhadap obat sintesis yang telah digunakan selama ini. Saat ini pengobatan tuberkulosis yang menggunakan obat sintetis telah banyak yang gagal dikarenakan kepatuhan penderita tersebut. Oleh karena itu perlu dicari obat alternatif dari bahan alam yaitu tumbuhan yang secara empirik terbukti mengobati batuk berdahak dan berdarah. (Depkes RI, 2005).

Secara tradisional terdapat bahan alam tumbuhan yang dapat mengobati batuk berdahak dan berdarah yang digunakan secara meminum hasil rendaman atau rebusan bahan tumbuhan tersebut. Batuk yang berdahak dan berdarah adalah salah satu gejala penyakit tuberkulosis. Jadi kemungkinan bahan tumbuhan selama ini bermanfaat untuk pengobatan batuk berdahak dan berdarah mempunyai potensi menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*.

Salah satu bahan tumbuhan tersebut adalah daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*), namun secara langsung penggunaannya kurang disenangi oleh masyarakat karena kurang praktis, rasanya pahit dan membutuhkan volume besar maka dari itu perlu dibuat ekstrak.

Ekstrak dari tumbuhan bahan alam ini menggunakan penyari berbeda kemungkinan akan berbeda khasiatnya. Maka diperlukan berbagai bahan penyari polar, dan non polar. Adapun khasiat dari bahan alam dalam pengobatan tentunya karena adanya kandungan bahan alamiah di dalamnya, misalnya senyawa metabolit sekunder untuk itu perlu dilakukan uji skrining fitokimia.

*Citrus aurantiifolia* adalah sejenis obat tradisional yang mengandung zat aktif dan bersifat sebagai anti bakteri. Zat aktif yang terkandung dalam tumbuhan

ini, terdiri dari alkaloid, polifenol, saponin, flavonoid, quinon dan steroid (Mustiqawati & Yolandari, 2022).

Berdasarkan hal di atas peneliti melakukan penelitian menguji potensi ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan terhadap *Mycobacterium tuberculosis* yang diisolasi langsung dari sputum penderita tuberkulosis di Rumah Sakit Umum Haji Medan Sumatera Utara, sehingga diketahui efektifitas antituberkulosis ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan di dalam daun jeruk nipis. Dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode *Loweinstein-Jensen* dan dibandingkan dengan bahan obat antituberkulosis sintetis rifampisin, etambutol, dan isoniazid.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dapat dirumuskan masalah penelitian ini adalah:

- a. Golongan senyawa kimia metabolit sekunder apa sajakah yang terkandung dalam daun segar, simplisia, ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan pada daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*)?
- b. Apakah ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis mempunyai potensi antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis*?
- c. Apakah terdapat perbedaan kekuatan potensi antibakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan manakah yang paling kuat antara ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan dari daun jeruk nipis?

## 1.3 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah di atas maka dibuat hipotesis sebagai berikut:

- a. Daun segar, simplisia, ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis mengandung berbagai golongan kimia metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan glikosida.

- b. Ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis mempunyai potensi antibakteri *Mycobacterium tuberculosis*.
- c. Terdapat perbedaan kekuatan potensi antibakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan yang paling kuat antara ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan dari daun jeruk nipis.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

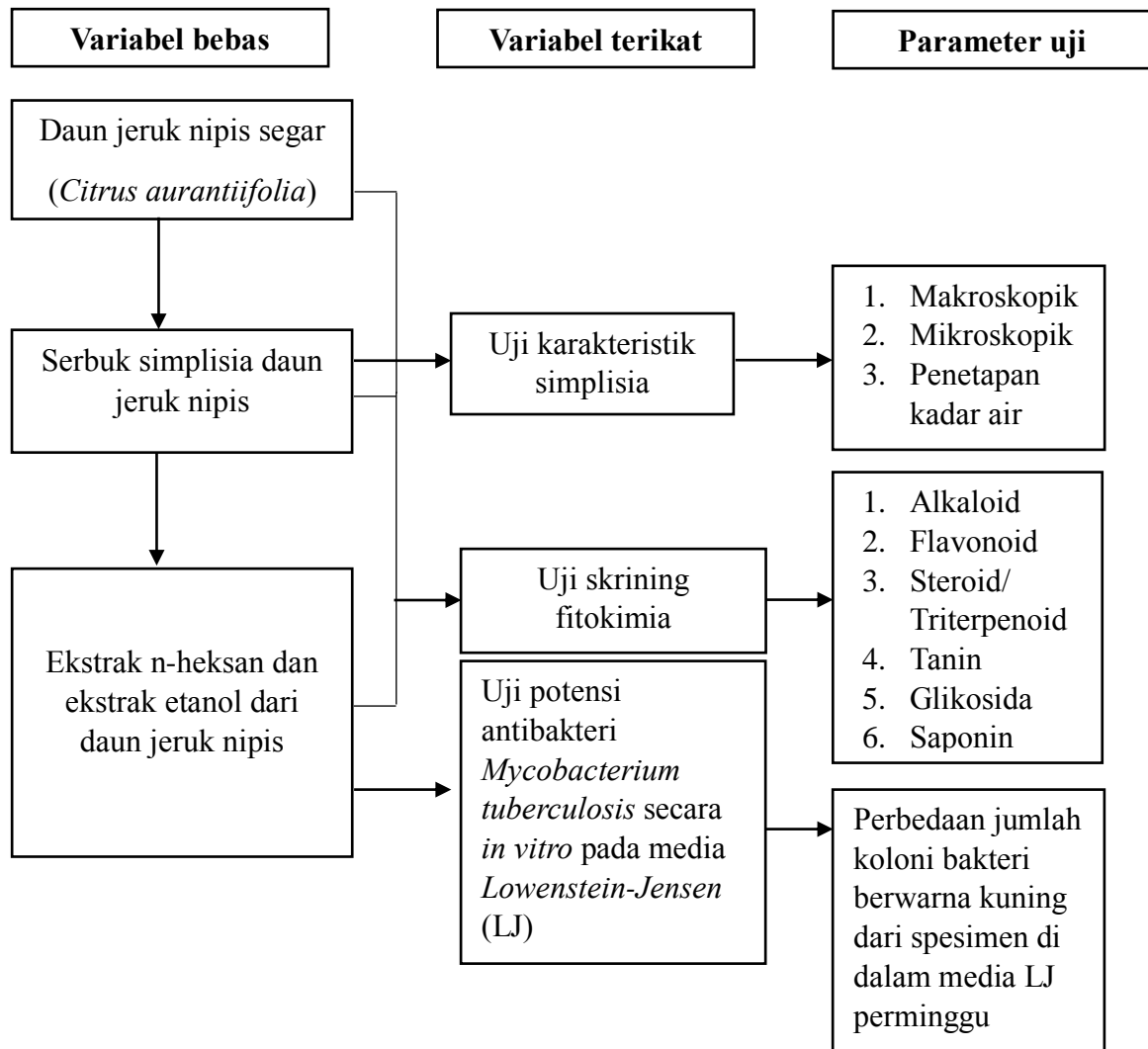
Berdasarkan rumusan masalah penelitian dan hipotesis, dibuat tujuan penelitian sebagai berikut:

- a. Untuk mengetahui daun segar, simplisia, ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis mengandung berbagai golongan kimia metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan glikosida.
- b. Untuk membuktikan ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis mempunyai potensi antibakteri *Mycobacterium tuberculosis*.
- c. Untuk mengetahui adanya perbedaan kekuatan potensi antibakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan yang paling kuat antara ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan informasi tentang kandungan berbagai senyawa di dalam daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) sehingga dapat dimanfaatkan sebagai alternatif pengobatan TBC. Penelitian ini bermanfaat sebagai informasi bahwa ekstrak daun jeruk nipis mempunyai potensi sebagai antituberkulosis jika penelitian ini berhasil dapat dikembangkan pada pengobatan dan mempunyai nilai ekonomis.

### 1.6 Kerangka Pikir Penelitian



**Gambar 1.1.** Kerangka Pikir Penelitian

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tumbuhan Jeruk Nipis

##### 2.1.1 Taksonomi tumbuhan jeruk nipis

Berdasarkan hasil identifikasi di *Herbarium Medanense (MEDA)*

Universitas Sumatera Utara sistematika tumbuhan jeruk nipis adalah:

Kingdom : Plantae  
Divisi : Spermatophyta  
Kelas : Dicotyledoneae  
Ordo : Sapindales  
Famili : Rutaceae  
Genus : Citrus  
Spesies : *Citrus aurantiifolia* (Cristm.) Swingle  
Nama lokal : Jeruk nipis



**Gambar 2.1** tumbuhan jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*)

### **2.1.2 Morfologi tumbuhan jeruk nipis**

Pohon jeruk nipis dapat mencapai tinggi 3-6 m, bercabang banyak dan berduri, daun lonjong, tangkai daun bersayap kecil. Daun pada tanaman jeruk nipis terbagi menjadi 3 bagian, ada helai daun, tangkai daun, dan tangkai anak daun. Untuk helai daunnya berbentuk oval, bagian pangkal daunnya membulat dan ujung daunnya berbentuk tumpul. Bagian tepi daunnya beringgit. Ukuran daun jeruk nipis sendiri berkisar pada panjang mencapai 2,5-9 cm dan lebarnya 2,5 cm. Bagian atas permukaan daun memiliki warna hijau mengkilat dan bagian bawahnya hijau muda. Untuk daging daunnya menyerupai kertas, tulang daunnya menyirip, dan tangkai yang bersayap. Perbungaan muncul dari ketiak daun dan bunga kecil, putih berbau harum (Yudiyanto *et al.*, 2021).

Bunga jeruk nipis memiliki putik, benang sari dan mahkota bunga. Bunganya ini termasuk dalam kelompok bunga majemuk, dimana tersusun dalam malai yang muncul dari daun ketiak. Tangkai putik dari bunganya berbentuk silindris, sedangkan bunganya sendiri seperti mangkuk, daun mahkota pada bunga berbentuk lanset dan memiliki warna putih. Bunga tanaman jeruk nipis ini dikenal juga dengan bunga hemaprodit dimana putik dan benang sarinya terdapat dalam satu tanaman. Buahnya berbentuk bulat, berwarna hijau sampai kuning dan kulit buah tipis mengandung banyak minyak atsiri. Daging buah berwarna putih kehijauan, sangat asam, mengandung banyak vitamin c dan asam sitrat. Biji banyak, kecil, bersifat poliembrioni (Yudiyanto *et al.*, 2021).

### **2.1.3 Kandungan daun jeruk nipis**

Daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) mengandung minyak atsiri yang memiliki efek sebagai antibakteri. Senyawa aktif sebagai antibakteri yang

tergantung dalam minyak atsiri adalah limonene. Minyak atsiri merupakan golongan senyawa terpena. Aktifitas kerja minyak atsiri daun jeruk nipis dalam menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri yaitu dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel sehingga membran atau dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk secara tidak sempurna. Di dalam daun jeruk nipis juga terkandung zat-zat antibakteri seperti alkaloid, tanin, polifenol, saponin, flavonoid dan triterpenoid (Cahyani, 2004).

#### **2.1.4 Manfaat daun jeruk nipis**

Daun jeruk nipis merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki banyak sekali khasiat yang jarang diketahui oleh orang-orang. Sudah sering didengar bahwa daun jeruk nipis dapat digunakan sebagai bahan untuk memasak, namun tidak hanya itu daun jeruk nipis juga mempunyai manfaat seperti, untuk menyembuhkan luka, mengobati batuk berdahak dan berdarah, mengatasi gangguan pernapasan, sebagai antibakteri, dan lain sebagainya (Meiyanti et al., 2021).

#### **2.2 Simplisia**

Kata simplisia berasal dari kata simpleks atau simple yang berarti sederhana. Dalam hubungannya dengan pemanfaatan tanaman obat, istilah simplisia digunakan untuk menjelaskan bahan baku obat yang berasal dari alam dan bentuknya masih belum berubah atau masih asli. Sementara itu, Kementerian Kesehatan menerangkan definisi simplisia ialah bahan alami yang digunakan untuk obat dan belum mengalami perubahan melalui proses apapun, kecuali dinyatakan lain misalnya berupa bahan yang telah dikeringkan (Widaryanto, 2018).



### **2.2.1 Jenis-jenis simplisia**

#### **a. Simplisia nabati**

Simplisia nabati ialah simplisia yang dibuat dari tanaman, baik berupa keseluruhan, bagian organ ataupun eksudat tanaman. Eksudat ialah bagian isi sel yang keluar secara spontan atau sengaja dikeluarkan dari selnya dengan teknik tertentu, atau zat nabati yang diekstrak dari tanaman. Contoh bagian organ tanaman yang dapat dimanfaatkan untuk membuat simplisia ialah herba (seluruh bagian tanaman), akar, umbi, rimpang, batang, daun, bunga, buah, biji, pati, getah, damar, minyak, malam, dan kulit kayu (Widaryanto, 2018).

#### **b. Simplisia hewani**

Simplisia hewani ialah simplisia yang bahan dasarnya dari hewan. Simplisia jenis ini dapat berupa hewan utuh atau zat yang dihasilkan oleh hewan dan belum berwujud senyawa kimia murni, seperti madu dan minyak ikan (*Oleum iecoris asselli*) (Widaryanto, 2018).

#### **c. Simplisia pelikan**

Simplisia pelikan ialah simplisia yang berwujud bahan mineral atau pelikan, masih belum mengalami proses pengolahan atau sudah diolah namun masih dengan teknik yang sederhana dan masih belum berbentuk zat kimia murni. Sebagai contoh adalah serbuk tembaga dan seng (Widaryanto, 2018).

### **2.2.2 Tahap pembuatan simplisia**

Adapun berbagai tahapan pengolahan simplisia sebagai berikut:

#### **a. Pengumpulan bahan baku**

Kandungan senyawa aktif atau metabolit sekunder dalam suatu simplisia berbeda-beda dikarenakan tergantung pada faktor lingkungan tempat tumbuh tanaman, bagian tanaman yang digunakan dalam pembuatan simplisia, waktu pemanenan dan umur tanaman ketika di panen (Ghozaly, 2023).

#### b. Sortasi basah

Pemisahan kotoran ataupun bahan asing dari bahan simplisia adalah tujuan dari sortasi basah. Kotoran ataupun bahan asing yang sering mencemari simplisia antara lain tanah, kerikil, rumput, batang, dan daun yang sudah rusak wajib dibuang. Tanah memiliki beragam mikroba dalam jumlah yang besar, oleh sebab itu pembersihan simplisia dari tanah yang terikut bisa mengurangi jumlah mikroba dari bahan simplisia (Ghozaly, 2023).

#### c. Pencucian

Tujuannya untuk menghilangkan kotoran dan mengurangi mikroba yang menempel pada bahan. Pencucian harus dilakukan segera setelah panen karena dapat mempengaruhi mutu bahan. Pencucian dilakukan dengan air bersih dan dilakukan pengulangan sampai kotoran hilang. Perlu diperhatikan bahwa pencucian harus dilakukan dalam waktu yang sesingkat mungkin untuk menghindari larut dan terbuangnya zat yang terkandung dalam bahan (Ghozaly, 2023).

#### d. Perajangan

Perajangan pada bahan dilakukan untuk mempermudah proses selanjutnya, seperti pengeringan, pengemasan, penyulingan minyak atsiri, dan penyimpanan. Perajangan biasanya hanya dilakukan pada bahan yang ukurannya agak besar dan tidak lunak, seperti akar, rimpang, batang, buah, dan lain-lain. Ukuran perajangan

tergantung dari bahan yang digunakan dan berpengaruh terhadap kualitas simplisia yang dihasilkan. Perajangan terlalu tipis dapat mengurangi zat aktif yang terkandung dalam bahan. Jika terlalu tebal, pengurangan kadar air dalam bahan agak sulit dan memerlukan waktu yang lama dalam penjemuran dan kemungkinan besar bahan mudah ditumbuhi oleh jamur (Ghozaly, 2023).

#### e. Pengerinan

Setelah pencucian, bahan langsung ditiriskan di rak-rak pengering khusus untuk bahan rimpang penjemuran dilakukan selama 4-6 hari. Selesai pengerinan dilakukan kembali penyortiran apabila bahan langsung digunakan dalam bentuk segar sesuai dengan permintaan. Pengerinan adalah suatu cara pengawetan atau pengolahan pada bahan dengan cara mengurangi kadar air sehingga proses pembusukan dapat terhambat. Dengan demikian, dapat dihasilkan simplisia terstandar, tidak mudah rusak, dan tahan disimpan dalam waktu yang lama dalam proses ini, kadar air dan reaksi-reaksi zat aktif dalam bahan akan berkurang sehingga suhu dan waktu pengerinan perlu diperhatikan. Suhu pengerinan tergantung pada jenis bahan yang dikeringkan. Pada umumnya, suhu pengerinan adalah antara 40-60°C dan hasil yang baik dari proses pengerinan adalah simplisia yang mengandung kadar air 10% (Ghozaly, 2023).

#### f. Sortasi kering

Penyortiran bertujuan untuk memisahkan benda-benda asing yang terdapat pada simplisia, misalnya akar-akar, pasir, kotoran unggas, atau benda asing lainnya. Proses penyortiran merupakan tahap akhir dari pembuatan simplisia kering sebelum dilakukan pengemasan, penyimpanan, atau pengolahan lebih

lanjut. Setelah penyortiran, simplisia ditimbang untuk mengetahui rendemen hasil dari proses pasca panen yang dilakukan (Ghozaly, 2023).

#### g. Pengemasan

Pengemasan dapat dilakukan terhadap simplisia yang sudah dikeringkan. Jenis kemasan yang digunakan dapat berupa plastik, kertas, maupun karung goni. Persyaratan jenis kemasan dapat menjamin mutu produk yang dikemas, mudah dipakai, tidak mempersulit penanganan, dapat melindungi isi pada waktu pengangkutan, tidak beracun, dan tidak bereaksi dengan isi dan kalau boleh mempunyai bentuk dan rupa yang menarik (Ghozaly, 2023).

#### **2.2.3 Karakteristik simplisia**

Identifikasi simplisia dilakukan dengan memeriksa pemerian dan melakukan pengamatan simplisia baik secara makroskopik maupun secara mikroskopik, penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu, penetapan kadar abu tidak larut dalam asam, selanjutnya dilakukan skrining fitokimia (Mayasari & Laoli, 2018).

#### **2.3 Ekstraksi**

Ekstraksi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu cara dingin dan cara panas. Ekstraksi cara dingin adalah tidak ada proses pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung, tujuannya untuk menghindari rusaknya senyawa yang dimaksud rusak karena pemanasan. Ekstraksi cara dingin terdiri dari maseri dan perkolasi. Ekstraksi cara panas metode ekstraksi yang menggunakan pemanasan dalam

mengeksktraksi simplisia dengan pelarut yang lebih sedikit dan waktu yang digunakan lebih cepat yang terdiri dari sokhletasi, infundasi dan dekoktasi.

### **2.3.1 Cara dingin**

#### **a. Metode maserasi**

Maserasi merupakan salah satu jenis ekstraksi padat cair yang paling sederhana. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara merendam sampel pada suhu kamar menggunakan pelarut yang sesuai sehingga dapat melarutkan analit dalam sampel. Sampel biasanya direndam selama 3-5 hari sambil diaduk sesekali untuk mempercepat proses pelarutan analit. Ekstraksi dilakukan berulang kali sehingga analit terekstraksi secara sempurna. Indikasi bahwa semua analit telah terekstraksi secara sempurna adalah pelarut yang digunakan tidak warna. Kelebihan ekstraksi ini adalah alat dan cara yang digunakan sangat sederhana, dapat digunakan untuk analit baik yang tahan terhadap pemanasan maupun yang tidak tahan terhadap pemanasan. Kelemahannya adalah menggunakan banyak pelarut (Leba, 2017).

#### **b. Metode perkolasi**

Perkolasi merupakan salah satu jenis ekstraksi padat cair yang dilakukan dengan jalan mengalirkan pelarut secara perlahan pada sampel dalam suatu perkulator. Pada ekstraksi jenis ini, pelarut ditambahkan secara terus menerus, sehingga proses ekstraksi selalu dilakukan dengan pelarut yang baru. Pola penambahan pelarut yang dilakukan adalah menggunakan pola penetesan pelarut dari bejana terpisah disesuaikan dengan jumlah pelarut yang keluar atau dilakukan dengan penambahan pelarut dalam jumlah besar secara berkala (Leba, 2017).

### 2.3.2 Cara panas

#### a. Metode sokhletasi

Sokhletasi merupakan salah satu jenis ekstraksi menggunakan alat sokhlet. Pada ekstraksi ini pelarut dan sampel ditempatkan secara terpisah. Prinsipnya adalah ekstraksi dilakukan secara terus menerus menggunakan pelarut yang relatif sedikit. Bila ekstraksi telah selesai maka pelarut dapat diuapkan sehingga akan diperoleh ekstrak. Biasanya pelarut yang digunakan adalah pelarut-pelarut yang mudah menguap atau mempunyai titik didih yang rendah. Sokhletasi dilakukan dengan cara pemanasan pelarut. Uap pelarut yang dihasilkan mengalami pendinginan dalam kondensor dan secara kontinyu akan membasahi sampel dan secara teratur pelarut tersebut dimasukkan kembali ke dalam labu dengan membawa analit (Leba, 2017).

#### b. Metode infundasi

Infundasi adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara mengekstraksi simplisia nabati dengan pelarut air menggunakan suhu 90°C selama 15 menit. Ada beberapa hal yang harus diperhatikan apabila akan menggunakan metode infundasi, di antaranya adalah adanya penambahan air ekstrak umumnya diperlukan penambahan air sebanyak 2 kali berat simplisia, dan penyaringan pada simplisia yang mengandung lendir tidak boleh diperas (Arvian *et al.*, 2023).

#### c. Metode dekoktasi

Dekoktasi memiliki prinsip yang hampir sama dengan infundasi. perbedaannya terletak pada lama waktu ekstraksinya. Dekoktasi merupakan ekstraksi dengan cara perebusan menggunakan pelarut air, pada temperature 90°C selama 30 menit (Arvian *et al.*, 2023).

## **2.4 Senyawa Metabolit Sekunder**

Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas dan berfungsi untuk mempertahankan diri dari lingkungan yang kurang menguntungkan seperti suhu, iklim, maupun gangguan hama dan penyakit tanaman. Skrining fitokimia merupakan metode yang digunakan untuk mendapatkan senyawa aktif yang terdapat pada tumbuhan (Agustina, 2016).

Adapun senyawa metabolit sekunder terdiri dari alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan glikosida.

### **2.4.1 Alkaloid**

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa yang tersebar luas hampir pada semua jenis tumbuhan. Alkaloid bersifat basa mengandung paling sedikit satu atom nitrogen dan umumnya membentuk cincin heterosiklik (Harborne, 1984). Alkaloid dapat ditemukan pada biji, daun, ranting dan kulit kayu dari tumbuh-tumbuhan. Kadar alkaloid dari tumbuhan dapat mencapai 10-15%. Alkaloid kebanyakan bersifat racun, tetapi ada pula yang sangat berguna dalam pengobatan. Alkaloid merupakan senyawa tanpa warna, sering kali bersifat optik aktif, kebanyakan berbentuk kristal dan sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotin) pada suhu kamar (Sabirin, et al., 1994).

Suatu cara mengklasifikasi alkaloid adalah didasarkan pada jenis cincin heterosiklik nitrogen yang terikat. Menurut klasifikasi ini alkaloid dibedakan menjadi pirolidin, piperidin, isoquinolin, quinolin dan indol. Alkaloid yang berwarna sangat jarang ditemukan misalnya berberina berwarna kuning. Kebiasaan alkaloid menyebabkan senyawa ini mudah terdekomposisi terutama oleh panas,

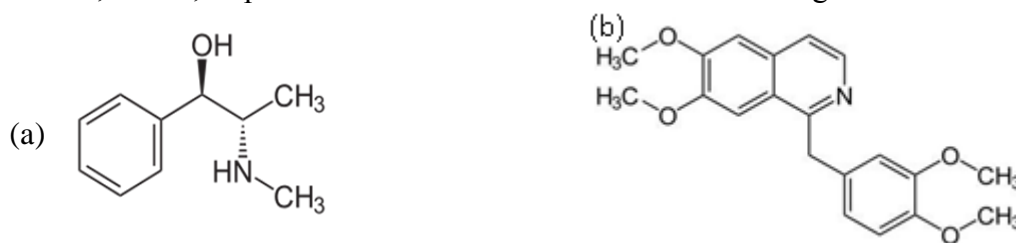
sinar dan oksigen membentuk N-oksida. Jaringan yang masih mengandung lemak, maka dilakukan ekstraksi pendahuluan petroleum eter (Minarno, 2015). Dilihat letak unsur N pada golongan alkaloid sebagai berikut:

#### 1. Alkaloid Non heterosiklis

Alkaloid Non heterosiklis yaitu unsur N nya tidak terletak pada rantai heterosiklis, tetapi pada rantai alifatis sering disebut dengan istilah aminalkaloid atau protoalkaloid. Contoh : efedrin, meskain dan capcaisin

#### 2. Alkaloid heterosiklis

Alkaloid heterosiklis yaitu unsur N nya terletak pada rantai heterosiklis dan dikenal bermacam-macam inti antara lain pirolidin, piperidin, kuinolin, isokuinolin, xantin, tropan dan indol. Contoh struktur alkaloid sebagai berikut:

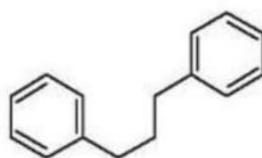


**Gambar 2.2** Contoh struktur kimia alkaloid

(a) Efedrin (Golongan non heterosiklik) (b) Kofein (inti xantin), (Golongan heterosiklik)  
(Sumber: Harbone, 1984)

#### 2.4.2 Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa polifenol yang strukturnya terdiri dari 15 atom karbon tersusun dalam C6-C3-C6 yang umumnya tersebar di dunia tumbuhan yang mempunyai banyak fungsi. Flavonoid berupa pigmen tanaman untuk memproduksi warna bunga merah atau biru pigmentasi kuning pada kelopak yang digunakan untuk menarik hewan penyerbuk (Minarno, 2015).



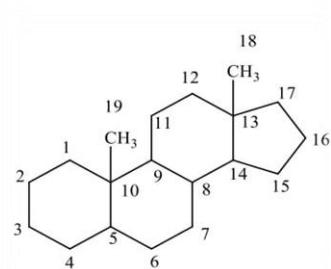


### Gambar 2.3 Contoh struktur dasar flavonoid

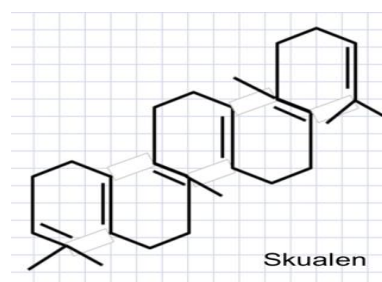
#### 2.4.3 Steroid/triterpenoid

Steroid adalah senyawa organik lemak sterol tidak terhidrolisis yang dapat dihasilkan melalui reaksi penurunan dari terpena atau skualena. Steroid merupakan suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana (Musman, 2017).

Triterpene tersusun dari tiga monoterpene atau enam isoprene dengan rumus kimia  $C_{30}H_{48}$ . Kolesterol dan sterol adalah contoh triterpenoid yang penting. Dengan struktur tetracyclic-nya, kolesterol adalah penyusun utama dari membran sel hewan yang berfungsi dalam membangun, menjaga membran sel, serta mengatur fluiditas membran dalam menjaga temperatur tubuh (Nugroho, 2017).



Struktur steroid

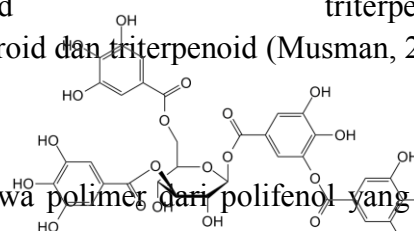


triterpenoid

**Gambar 2.4** Struktur steroid dan triterpenoid (Musman, 2017)&(Nugroho, 2017)

#### 2.4.4 Tanin

Tanin adalah senyawa polimer dari polifenol yang memiliki jumlah gugus hidroksil yang melimpah atau gugus lainnya seperti karboksil untuk dapat membentuk ikatan kompleks yang kuat dengan beberapa molekul makro seperti protein, pati, selulosa, dan juga mineral. Karakteristik tanin adalah hadirnya



paling tidak 12 gugus hidroksil atau 5 gugus phenyl yang dapat berfungsi dalam mengikat protein (Nugroho, 2017).

**Gambar 2.5** Contoh struktur kimia tanin (Nugroho, 2017)

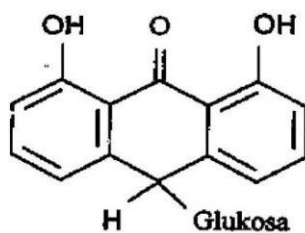
#### **2.4.5 Glikosida**

Glikosida merupakan senyawa yang terdiri dari gabungan dua senyawa yaitu gula (glikon) dan bukan gula (aglikon) yang dihubungkan dengan jembatan nitrogen, sulfur, atau karbon. Eliminasi air antara hidroksil anomerik dari monosakarida siklik dan gugus hidroksil dari senyawa lain mengakibatkan terbentuknya glikosida. Pada awalnya glikosida terbentuk dari senyawa asetal dengan gugus hidroksi dari komponen yang bukan gula, sementara gugus hidroksi kedua mengalami kondensasi di dalam molekul gula tersebut dan membentuk lingkaran oksida. Glikosida dapat larut dalam pelarut yang polar seperti air (Muldianah et al., 2021).

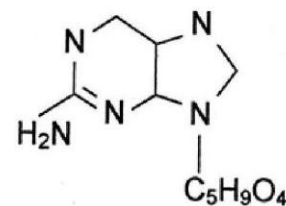
Penggolongan jenis glikosida dapat dibagi berdasarkan gugus aglikon, gugus glikon (gula), dan jenis ikatan glikosidanya. Jenis glikosida berdasarkan gugus aglikon diantaranya yaitu glikosida kumarin, glikosida flavonoid, dan glikosida saponin. Glikosida kumarin adalah glikosida yang mengandung kumarin dan disebut sebagai glikosida lakton. Glikosida yang strukturnya terdiri dari dua cincin benzena yang dipisahkan oleh tiga rantai karbon yang disusun oleh tiga atom karbon disebut dengan glikosida flavonoid (Muldianah *et al.*, 2021)

Berdasarkan atom penghubung bagian gula (glikon) dan bukan gula (aglikon), glikosida dapat dibedakan menjadi (Robinson, 1995):

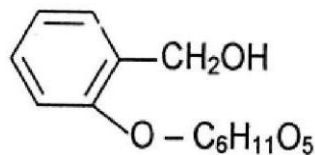
1. C-glikosida, jika atom C menghubungkan bagian glikon dan aglikon, contohnya: Alonin.
2. N-glikosida, jika atom N menghubungkan bagian glikon dan aglikon, contohnya: Guanosin.
3. O-glikosida, jika atom O menghubungkan bagian glikon dan aglikon, contohnya: salisin.
4. S-glikosida, jika atom S menghubungkan bagian glikon dan aglikon, contohnya: sinigrin.



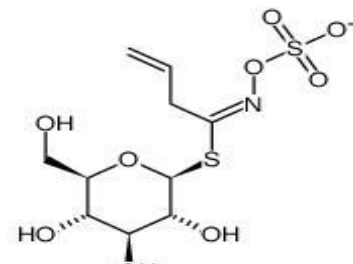
Alonin (C-glikosida)



Guanosin (N-glikosida)



Salisin (O-glikosida)

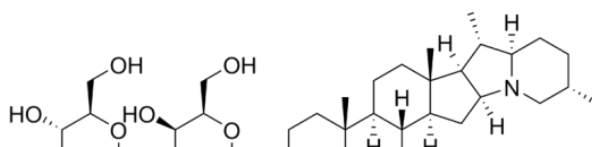


Sinigrin (S-glikosida)

**Gambar 2.7** Contoh struktur glikosida (Robinson, 1995).

#### 2.4.6 Saponin

Saponin adalah suatu senyawa glikosida yang aglikonnya terdiri dari steroid/triterpenoid. Saponin mudah larut dalam air dan bersifat racun terhadap ikan atau hewan berdarah dingin lainnya, sehingga ada beberapa praktik meracuni ikan dengan bahan-bahan tumbuhan yang mengandung saponin. Selain itu, Saponin memiliki manfaat lain seperti sebagai senyawa antiinflamasi, sebagai bahan dalam pembuatan sampo, industri farmasi, agen pembentuk busa pada



pemadam kebakaran, serta dapat dimanfaatkan sebagai agen pembasmi hama udang (Nugroho, 2017).

**Gambar 2.6** Contoh struktur saponin (Nugroho, 2017).

## **2.5 Tuberkulosis**

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, dan merupakan salah satu penyakit yang menyebabkan kematian (Irianti, 2016). Angka kejadian tuberkulosis di Indonesia menduduki urutan kedua tertinggi di dunia setelah urutan pertama yang di duduki oleh India pada tahun 2021, 252 per 100.000 penduduk diperkirakan sekitar 845.000 penduduk menderita tuberkulosis ((Irianti, 2016; Sugiharti *et al.*, 2023).

### **2.5.1 Gejala klinis tuberkulosis**

Gejala umum adalah rasa letih, lesu, kurus, demam, batuk-batuk yang disertai darah dan berdahak, sakit dada, anemi, keringat malam, laju endapan darah (LED) meningkat karena IgG dan IgA meningkat (DepKes RI, 2005); (Wahyuningrum *et al.*, 2017; Irianti, 2016).

### **2.5.2 Diagnosis laboratorium tuberkulosis**

Diagnosis yang paling pasti dari penyakit tuberkulosis ialah dengan pemeriksaan mikrobiologi dengan cara mengisolasi kumannya. Bahan spesimen dapat berupa dahak segar, cairan lambung, urin, cairan pleura, cairan otak, cairan

sendi, bahan biopsi, dan lain-lainnya, dilakukan identifikasi dengan berbagai cara yaitu:

1. Pewarnaan, biasanya pemeriksaan ini memberikan cukup informasi tentang organisme yang cukup untuk menegakkan diagnose presumtif.
2. Basil Tahan Asam (BTA) menentukan adanya *Mycobacterium tuberculosis*, yang setelah dilakukan pewarnaan bakteri ini tidak mengalami perubahan warna oleh alkohol asam.
3. Kultur sputum mengidentifikasi organisme spesifik untuk menegakkan diagnose definitif. Pemeriksaan ini, sputum harus dikumpulkan sebelum dilakukan terapi antibiotik dan setelahnya untuk menentukan kemanjuran terapi (DepKes RI, 2005; Wahyuningrum *et al.*, 2017; Irianti, 2016).

(-) : tidak ada pertumbuhan

(+1):  $\frac{1}{4}$  terlihat ada sedikit koloni warna kuning 1-200 koloni

(+2):  $\frac{1}{2}$  dari media tertutup oleh koloni warna kuning (200-500 koloni)

(+3):  $\frac{3}{4}$  dari media tertutup oleh koloni warna kuning (500-2000 koloni)

(+4): media tertutup seluruhnya oleh koloni warna kuning (lebih dari 2000 koloni)

4. Sensifitas, berfungsi sebagai pedoman terapi antibiotik dengan mengidentifikasi antibiotik yang mencegah pertumbuhan organisme yang terdapat dalam sputum.
5. Sitiologi, ditujukan untuk mengidentifikasi adanya keganasan (karsinoma) pada paru-paru. Sputum mengandung runtunan sel dari percabangan trakheobronkhial, sehingga mungkin saja terdapat sel-sel malignan. Sel-sel

maglinan menunjukkan adanya karsinoma, tidak terdapatnya sel ini bukan berarti tidak adanya tumor atau tumor yang terdapat tidak meruntuhkan sel.

6. Tes kuantitatif, dilakukan pada sputum selama 24 jam sampai 72 jam. Pemeriksaan harus sering dilakukan untuk menentukan apakah sekresi merupakan saliva, lendir, pus atau bukan. Jika bahan yang diekspektorat berwarna kuning-hijau biasanya menandakan infeksi parenkim paru. (pneumonia). Untuk pemeriksaan kualitatif, klien diberikan wadah khusus untuk mengeluarkan sekret. Wadah ini ditimbang pada akhir 24 jam. Jumlah serta karakter isinya dicatat dan diuraikan (Wahyuningrum *et al.*, 2017; Irianti, 2016; DepKes RI, 2005).

### 2.5.3 Kategori penyakit tuberkulosis

Penyakit tuberkulosis mempunyai beberapa kategori yaitu:

**Kategori 1** mempunyai ciri-ciri:

- a. Pasien baru tuberkulosis paru bakteri tahan asam (BTA) positif
- b. Pasien baru tuberkulosis paru bakteri tahan asam (BTA) negatif dan foto toraks positif
- c. Pasien tuberkulosis ekstra paru

**Kategori 2** mempunyai ciri-ciri:

- a. Pasien kambuh telah pernah berobat, dan sembuh tetapi kambuh lagi
- b. Pasien gagal, telah pernah diobati tetapi kurang disiplin
- c. Pasien pengobatan terputus, telah pernah diobati, berhenti sebelum sembuh (Kemenkes RI, 2014).

### 2.5.4 Tindakan terapi tuberkulosis

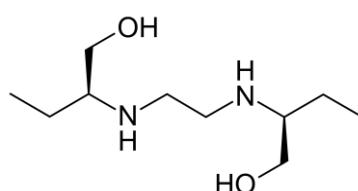
Tindakan terapi tuberkulosis dilakukan dengan memperhatikan kategori penyakit tuberkulosis dari penderita:

1. Kategori 1, diobati melalui dua fase dengan obat dikenal sebagai OAT KDT (Obat Antituberkulosis Kombinasi Dosis Tetap)
  - a. Fase intensif, setiap hari diberikan OAT KDT dengan kode 2HRZE, yaitu kombinasi H=Isoniazid, R=Ripamfisn, Z=Pirazinamid, E=Etambutol selama 2 bulan
  - b. Fase lanjutan, setelah selesai pengobatan dengan fase intensif, dilanjutkan pengobatan dengan fase lanjutan diberikan OAT dengan kode 4RH3, yaitu kombinasi R=Ripamfisn, H=Isoniazid selama 4 bulan dengan pemberian 3 kali seminggu
2. Kategori 2, diobati melalui dua fase dengan obat OAT KDT
  - a. Fase intensif, setiap hari diberikan obat dengan kode 2HRZES, yaitu kombinasi H=Isoniazid, R=Ripamfisn, Z=Pirazinamid, E=Etambutol dan S=Streptomisin selama 2 bulan.
  - b. Fase lanjutan, setelah selesai pengobatan dengan fase intensif, dilanjutkan pengobatan dengan fase lanjutan diberikan OAT dengan kode 5RH3, yaitu kombinasi R=Ripamfisn, H=Isoniazid, selama 5 bulan dengan pemberian 3 kali seminggu (Syafiyatul *et al.*, 2020).

## 2.6 Macam-Macam Obat Antituberkulosis

### 2.6.1 Etambutol

Derivat etilendiamin berkhasiat spesifik terhadap *M. tuberculosis* dan beberapa *M.atipis* tetapi tidak pada bakteri lain. Kerja bakteriostatiknya sama

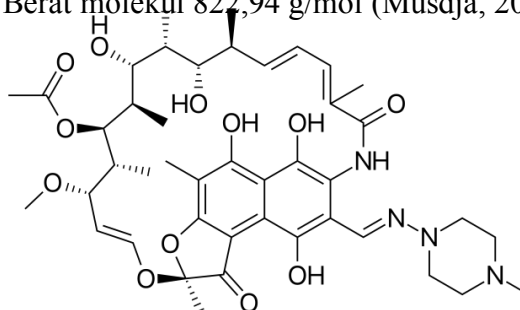


kuatnya dengan INH. Mekanisme kerjanya berdasarkan penghambatan sintesa RNA pada kuman yang sedang membelah, juga menghindarkan terbentuknya *mycolic acid* pada dinding sel. Efek samping adalah *neuritis optica* (radang saraf mata) yang mengakibatkan gangguan penglihatan dan buta warna terhadap warna merah dan hijau. Pemerian serbuk hablur, putih. Kelarutan mudah larut dalam etanol dan metanol, sukar larut dalam eter dan kloroform. Rumus kimia  $C_{20}H_{21}NO_6$ . Berat molekul 355,37 g/mol (Musdja, 2017).

**Gambar 2.8** Struktur etambutol

## 2.6.2 Rifampisin

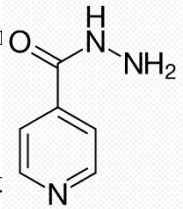
Antibiotik ini dihasilkan oleh *Streptomyces mediterranei*. Rifampisin berkhasiat bakterisid luas terhadap fase pertumbuhan *M. tuberculosis* dan *M. leprae*, baik berada di luar maupun di dalam sel (ekstra/intraseluler). Mekanisme kerja menghambat enzim Ribonukleat Acid (RNA) polimerase Deoksiribonukleat Acid (DNA) dependent dengan cara mengikatkan diri kepada subunit beta, kemudian transkripsi RNA akan terhalangi sehingga sintesis protein bakteri tidak terjadi dan bakteri akan mati. Hal ini yang menjadikan obat rifampisin memiliki sifat bakterisidal. Efek samping agak sering menyebabkan gangguan saluran cerna seperti mual, muntah, sakit ulu hati, diare dan kejang perut. Apabila dikombinasikan dengan INH juga agak toksik bagi hati. Pemerian serbuk hablur, coklat merah. Kelarutan sangat sukar larut dalam air, mudah larut dalam kloroform, larut dalam etil asetan dan metanol. Rumus kimia  $C_{25}H_{35}N_2O_6$ . Berat molekul 461,54 g/mol (Musdja, 2017).





## Gambar 2. Struktur rifampisin

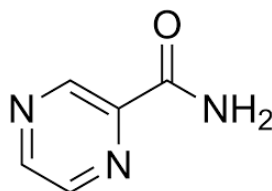
### 2.6.3 Isoniazid

Derivat asam isonikotinat ini berkhasiat tuberkulostatik paling kuat terhadap *Mycobacterium tuberculosis* bersifat bakterisid terhadap basil yang sedang tumbuh pesat. Aktif terhadap kuman yang berada intraseluler dalam makrofag maupun di luar sel (ekstraseluler). Obat ini praktis tidak aktif terhadap bakteri lain. Mekanisme kerjanya berdasarkan terganggunya sintesa *mycolic acid*. *Mycolic acid* merupakan komponen esensial pada dinding sel *Mycobacterium*. Mekanisme inilah yang menimbulkan efek terapi bakterisid terhadap organisme *Mycobacterium tuberculosis*. Efek samping dari isoniazid pada dosis normal (200-300 mg sehari) biasanya jarang dan ringan seperti gatal-gatal, gangguan penglihatan dan sering terjadi bila dosis melebihi 400 mg. Kadang-kadang terjadi kerusakan hati dengan hepatitis dan ikterus yang fatal terutama dikombinasikan dengan rifampisin. Pemerian hablur  hablur, tidak berwarna tidak berbau, perlahan dipengaruhi udara. Mudah larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol, sukar larut dalam kloroform dan eter. Rumus kimia  $C_6H_7N_3O$ . Berat molekul 137,1/mol (Murdja, 2017).

Gambar 2.10 Struktur isoniazid

### 2.6.4 Pirazinamid

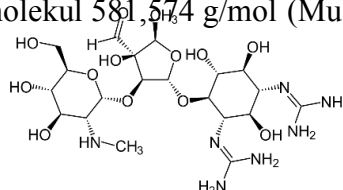
Mekanisme kerja berdasarkan pengubahannya menjadi asam pirazinat oleh enzim pyrazinamidase yang berasal dari basil TBC. Efek samping kerusakan hati terutama pada dosis di atas 2 g sehari. Pemerian serbuk hablur, dan tidak berbau. Kelarutan agak sukar larut dalam air, sukar larut dalam etanol, dalam eter dan dalam kloroform. Rumus kimia  $C_5H_4N_2O$ . Berat molekul 123,113 g/mol (MUSDJA, 2017).



**Gambar 2.11** Struktur pirazinamid

### 2.6.5 Streptomisin

Streptomisin suatu *aminoglikosida* diperoleh dari *Streptomyces griseus*. Senyawa ini berkhasiat bakterisid terhadap kuman gram positif dan gram negatif termasuk *M.tuberculosis* dan beberapa *M. atipis*. Streptomisin khusus aktif dan pesat (misalnya di dalam caverne). Mekanisme kerjanya berdasarkan penghambatan sistesa protein kuman dengan jalan pengikatan pada RNA ribosomal. Efek samping toksik untuk organ pendengaran dan keseimbangan. Oleh karena itu sebaiknya jangan gunakan dalam jangka lama, karena efek neurotoksis dari obat ini terhadap saraf *cranial* ke 8 dapat menimbulkan ketulian permanen. Pemerian serbuk halur, putih. Kelarutan mudah larut dalam air, sukar larut dalam etanol, tidak larut dalam kloroform. Rumus kimia  $C_{27}H_{47}N_7O_{17}$ . Berat molekul 581,574 g/mol (MUSDJA, 2017).



### Gambar 2.12 Struktur streptomisin

## 2.7 *Mycobacterium tuberculosis*

### 2.7.1 Sistematika bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Misnadiarly, 2006)

Kingdom	: <i>Bakteria</i>
Divisi (Divisio)	: <i>Protophyta</i>
Kelas (Classis)	: <i>Schizomycetes</i>
Bangsa (Ordo)	: <i>Actinomycetes</i>
Suku (Familia)	: <i>Mycobacteriaceae</i>
Marga (Genus)	: <i>Mycobacterium</i>
Jenis (Spesies)	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

### 2.7.2 Sifat- sifat umum *Mycobacterium tuberculosis*

Batang langsing tahan asam, aerob, tak bergerak, tak bersimpai dan tidak berspora. Biasanya tumbuh lambat. Tidak dapat tumbuh pada media perbenihan biasa, tetapi memerlukan perbenihan diperkaya dengan albumin telur misalnya perbenihan *Lowenstein-Jensen* atau Ogawa. Pertumbuhan secara aerob obligat. Energi didapat dari oksidasi senyawa karbon yang sederhana. CO<sub>2</sub> dapat merangsang pertumbuhan. Pertumbuhan lambat, waktu pembelahan sekitar 20 jam. Suhu pertumbuhan optimal 37°. Pada pembenihan pertumbuhan tampak setelah 2-3 minggu. Koloni cembung, kering, kuning gading (Irianti, 2016; Putra Ogi Andyka, 2012).

### 2.7.3 Morfologi dan fisiologi *Mycobacterium tuberculosis*

Bakteri tuberkulosis berbentuk batang halus berukuran 3 x 0,5µm, dapat juga terlihat seperti berbiji-biji. Pada perbenihan berbentuk kokoid dan berfilamen, tidak berspora dan tidak bersimpai. Pada pewarnaan *Ziehl-Neelsen*

atau *Tan Thiam Hok*, kuman berwarna merah dengan latar belakang biru, dan pewarnaan *fluorochrom* kuman berfloresensi warna kuning orange (Utji R & Harun H, 1994).

#### **2.7.4 Daya tahan *Mycobacterium tuberculosis***

Daya tahan bakteri tuberkulosis lebih besar apabila dibandingkan dengan bakteri lainnya karena bersifat hidrofobik permukaan sel. *Malachit green* dapat membunuh bakteri lain tetapi tidak membunuh *Mycobacterium tuberculosis*, demikian juga asam dan alkali. Dengan fenol 5% diperlukan waktu 24 jam untuk membunuh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Pada sputum kering yang melekat pada debu dapat tahan hidup 8-10 hari. Pengaruh pemanasan daya tahannya sama dengan kuman lain, jadi dengan pasteurisasi kuman tuberkulosis sudah dapat dibunuh (Utji R & Harun H, 1994).

#### **2.7.5 Perjalanan *Mycobacterium tuberculosis* di dalam tubuh**

Perjalanan kuman tuberkulosis dapat langsung melalui aliran limfe, aliran darah, melalui bronkus dan traktus digestivus. Pada mulanya, kuman menjalar melalui saluran limfe ke kelenjar getah bening. Selanjutnya melalui ductus thoracicus masuk ke dalam aliran darah dan terus ke organ tubuh. Dapat pula langsung masuk ke vena ke aliran darah atau proses perjalanan pecah ke bronkus, disebar keseluruh paru-paru atau tertelan ke traktus digestivus (Irianti, 2016).

#### **2.7.6 Kultur *Mycobacterium tuberculosis***

- a. Pembenihan cair, dilakukan pada media asam oleat-albumin (dobus), medium ini mengandung Tween-80, kuman akan tumbuh merata pada seluruh medium, biasanya pada medium cair pertumbuhan lebih cepat (Irianti, 2016; Misnadiarly, 2006).

- b. Pembenuhan padat, dilakukan pada medium *Lowenstein-Jensen*, medium ini mengandung telur, gliserol, garam-garam mineral, malachit green, dan biasanya dicampur penisilin untuk membunuh kuman penyerta lainnya (Irianti, 2016; Misnadiarly, 2006).

### **2.7.7 Uji potensi antituberkulosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis***

- a. Uji potensi/aktivitas antituberkulosis bahan uji terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dilakukan berdasarkan kepekaan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* terhadap bahan uji, dapat dilakukan dengan beberapa metode (Irianti, 2016).

- i. Metode langsung

Sampel/spesimen diproses langsung dibiakkan pada media dengan obat atau metode tidak langsung uji kepekaan dilakukan setelah tumbuh koloni. Pada metode spesimen diinokulasi pada medium kontrol dan medium dengan bahan uji. Metode ini mempunyai beberapa kelemahan yakni:

1. Tidak berlaku untuk BTA negatif dan Scanti BTA positif
2. Kemungkinan adanya kontaminasi relatif tinggi
3. Pertumbuhan kuman yang tidak adekuat menyebabkan hasil meragukan
4. Tidak terdeteksi adanya NTM (Mikrobiologi nontuberkulosis)
5. Lebih sulit dikalibrasi (bakteri yang mati dan hidup)

Metode ini mempunyai keuntungan yaitu populasi bakteri lebih mewakili yang exist secara *in vivo* dan 3-4 kali lebih cepat dibanding metode tidak langsung (Misnadiarly, 2006).

- ii. Metode tidak langsung

Metode tidak langsung mempunyai beberapa keuntungan diantaranya: organisme yang digunakan diisolasi dari biakan, suspensi homogen diinokulasi atau kultur cair dapat diinokulasi secara merata ke dalam medium kontrol dan medium dengan mengandung bahan uji. Metode tidak langsung terdiri atas beberapa metode absolut, metode rasio resistensi dan metode proporsional (Misnadiarly, 2006).

1. Metode absolut, mempunyai beberapa hal khusus adalah:
  - a. Inokulasi spesimen pada medium kontrol dan medium dengan obat sebanyak 2.000 sampai 10.000 CFU/ml
  - b. Digunakan beberapa konsentrasi
  - c. Resistensi ditunjukkan dengan konsentrasi obat minimum (MIC) yang menghambat pertumbuhan koloni
  - d. Konsentrasi kritis obat yang menghambat pertumbuhan organisme “*wild type*” tetapi tidak menghambat “*mutant*”
2. Metode rasio resistensi, metode ini memerlukan beberapa set media mengandung 2 kali lipat konsentrasi seri obat, menggunakan inokulum standar dari isolat uji dan isolat standar. Disamping itu standar R: rasio resistensi  $\geq 8$
3. Metode proporsional, pada umumnya menggunakan media *Lowenstein-Jensen* (LJ), atau ogawa dilakukan secara radiometrik dengan alat Bactec, dapat pula dengan pengamtan “*end point inhibition*” pada media semi solid, atau cara “*break point*” pada media cair seperti Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT), NRA (*Nitrate Reduction*

*Assay*), Microscopic Observation Drug Susceptibility (MODS) (Misnadiarly, 2006).

#### **2.7.8 Standarisasi uji kepekaan *Mycobacterium tuberculosis***

Standarisasi uji kepekaan *Mycobacterium tuberculosis* perlu dilakukan dalam rangka menjamin reabilitas dan validitas hasil pemeriksaan, meliputi:

- a. Variasi potensi dan validitas obat yang digunakan (proses sterilisasi dan penyimpanan).
  - i. Pengurangan aktivitas obat ketika ditambahkan pada medium
  - ii. Penggunaan obat dengan konsentrasi kurang memadai
  - iii. Kesalahan interpretasi pada pembacaan hasil uji kepekaan
- b. Komponen uji kepekaan sumber daya manusia, fasilitas laboratorium, bahan habis pakai, metode pemeriksaan, pemantapan mutu, pencatatan dan pelaporan.
- c. Tahapan pemeriksaan pre uji kepekaan (DST): sejak pengelolaan spesimen, proses biakan dan identifikasi (diperlukan 3-6 minggu), persiapan media *Lowenstein-Jensen* + dan bahan uji, persiapan kuman (pengenceran koloni), inokulasi, inkubasi (3-4 minggu), pembacaan/interpretas (Restiawati & Burhan, 2011).

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

##### **3.1.1 Variabel penelitian**

Metode penelitian ini bersifat eksperimental konsentrasi ekstrak n-heksan dan ekstrak etanol daun jeruk nipis berbagai konsentrasi sebagai variabel bebas. Uji potensi antibakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan berbagai uji lainnya sebagai variabel terikat. Penelitian ini meliputi pengumpulan bahan uji, identifikasi daun jeruk nipis, pembuatan ekstrak n-heksan dan ekstrak etanol daun jeruk nipis, skrining fitokimia, persiapan pereaksi dan media, identifikasi sputum (sputum penderita TB), kultivasi dan isolasi *Mycobacterium tuberculosis*, dan uji aktifitas antibakteri *Mycobacterium tuberculosis* secara *in vitro* dengan media *Lowenstein-Jensen* dibandingkan dengan rifampisin, etambutol, dan isoniazid (INH).

#### **3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2024 sampai dengan Agustus 2024 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Penelitian Program Studi Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Indah Medan.

#### **3.3 Alat dan Bahan**

##### **3.3.1 Alat-alat yang digunakan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: alat alat gelas laboratorium, alat perkolator, autoklaf, api bunsen, aluminium foil, blender, benang, corong, cawan porselin, gas, inkubator, kompor, kain kasa, kertas



perkamen, mikroskop, mikropipet, *oven*, pemanas air, vakum putar, rak miring, spatula dan timbangan.

### **3.3.2 Bahan-bahan yang digunakan**

Bahan tumbuhan yang digunakan adalah daun jeruk nipis akuades, telur, dan bahan kimia yang digunakan berkualitas proanalisis keluaran E'Merck yaitu etanol 80%, n-heksan, toluen, kloroform, media *Lowenstein-Jensen* (LJ), asam asetat glasial, raksa (II) klorida, bismut nitrat, asam nitrat, asam asetat anhidrat, asam klorida, asam sulfat, isopropanol, iodium, kalium iodida, besi (III) klorida, kloralhidrat, kalium dihidrogen fosfat, *malachit green*, biru metilen, carbol fuchsin, asam alkohol magnesium sitrat, sodium glutamat, gliserin, rifampisin, etambutol, isoniazid.

## **3.4 Persiapan Sampel**

### **3.4.1 Pengambilan sampel jeruk nipis**

Pengambilan sampel daun jeruk nipis segar (*Citrus aurantiifolia*) dilakukan secara purposive yaitu tanpa membandingkan dengan tumbuhan serupa dari daerah lain, diambil dari daerah Nagari Banai Kecamatan IX Koto Kabupaten Dharmasraya, Provinsi Sumatera Barat.

### **3.4.2 Identifikasi/determinasi tumbuhan**

Identifikasi/determinasi tumbuhan dilakukan di *Laboratorium Sistematika Tumbuhan Herbarium Medanense (MEDA)* Universitas Sumatera Utara.

### **3.4.3 Pembuatan simplisia daun jeruk nipis**

Daun jeruk nipis yang telah terkumpul dilakukan sortasi basah, yaitu dibersihkan dengan cara pencucian dan ditiriskan. Kemudian diiris dan ditebarkan di atas kertas dan dibiarkan di ruangan yang terbuka tetapi tidak terkena

matahari langsung selama lebih kurang 7 hari, selanjutnya dimasukkan ke dalam lemari pengeringan simplisia temperatur lebih kurang 60°C - 70°C lebih kurang 3 hari sampai diperoleh simplisia kering ditandai dengan rapuh saat dipatahkan. Selanjutnya simplisia yang diperoleh dihaluskan dan diuji beberapa karakteristik simplisia.

### **3.5 Pemeriksaan Karakteristik Simplisia**

Pemeriksaan karakteristik simplisia pada penelitian ini meliputi pemeriksaan makroskopik, mikroskopik, dan penetapan kadar air.

#### **3.5.1 Pemeriksaan makroskopik simplisia**

Uji makroskopik dilakukan dengan melakukan pengamatan secara langsung berdasarkan ciri-ciri organoleptik yang meliputi bau, rasa, warna dan bentuk dari serbuk simplisia (Handayani *et al.*, 2019).

#### **3.5.2 Pemeriksaan mikroskopik simplisia**

Uji mikroskopik dilakukan dengan cara meletakkan serbuk simplisia daun jeruk nipis di atas *object glass*, ditetaskan *aquadest* dan kloralhidrat, ditutup menggunakan *cover glass*, difiksasi di atas lampu spritus, kemudian diamati di bawah mikroskop untuk melihat fragmen pengenal (Handayani *et al.*, 2019).

#### **3.5.3 penetapan kadar air simplisia**

Penetapan kadar air simplisia dilakukan dengan metode azeotropi (destilasi toluena). Alat meliputi labu alas bulat 500 ml, alat penampung, pendingin bola, tabung penghubung, tabung penerima berskala 0,1 ml.

Cara penetapan:

Ke dalam labu alas bulat dimasukkan 200 ml toluena dan 2 ml akuades, didestilasi selama 2 jam, sampai seluruh air terdestilasi diperoleh toluena jenuh

setelah itu toluena didinginkan dan disisihkan sedikit untuk pembilasan, volume air pada tabung penerima dibaca sebagai volume awal air.

Kemudian ke dalam labu yang berisi toluena jenuh dimasukkan 5 g serbuk simplisia daun jeruk nipis yang telah ditimbang seksama, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit, setelah toluena mendidih, kecepatan tetesan diatur kurang lebih 2 tetes tiap detik sampai sebagian besar air tersuling. Kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluena jenuh. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan dingin sampai suhu kamar. Setelah air dan toluena memisah sempurna volume air dibaca dengan ketelitian 0,1 ml sebagai volume air akhir. Selisih kedua ini dibaca dan diperhitungkan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa dalam persen (Depkes RI, 1989).

% kadar air hitung dengan rumus:

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{Volume akhir} - \text{Volume awal air}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

### 3.6 Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Nipis

Pembuatan ekstrak dilakukan secara perkolasi menurut Depkes RI (2000), dengan menggunakan pelarut n-heksan dilanjutkan fraksinasi dengan pelarut etanol 80%.

Caranya:

Sebanyak 1 kg serbuk simplisia daun jeruk nipis dimasukkan ke dalam bejana tertutup berwarna gelap, ditambahkan pelarut n-heksan sampai semua simplisia terendam sempurna. Ditutup dan dibiarkan selama 3 jam terlindung dari cahaya. Kemudian dipindahkan masa sedikit demi sedikit ke dalam perkulator

sambil tiap kali ditekan hati-hati, dituangi pelarut n-heksan secukupnya sampai cairan mulai menetes dan di atas simplisia masih ada selapis n-heksan ditutup perkolator, dibiarkan selama 24 jam.

Selanjutnya diatur cairan menetes dengan kecepatan 1 ml permenit, ditambahkan n-heksan melalui tabung reservoir secukupnya dan diatur tetesan larutan yang ditambahkan sama dengan tetesan perkolat, hingga selalu terdapat selapis cairan n-heksan di atas simplisia. Perkolasi dihentikan apabila perkolat yang keluar sudah tidak berwarna lagi. Sehingga diperoleh ekstrak n-heksan.

Kemudian simplisianya diperas menggunakan kain kasa. Ampasnya dilakukan perkolasi kembali menggunakan etanol 80%. Ampas tersebut dimasukkan ke dalam perkolator dan ditambahkan pelarut etanol secukupnya sampai cairan mulai menetes dan diatas simplisia masih ada selapis etanol ditutup perkolator. Dibiarkan selama 24 jam. Melalui tabung reservoir ditambahkan pelarut secukupnya dan diatur tetesan larutan sama dengan tetesan perkolat. Perkolasi dihentikan apabila perkolat yang keluar sudah tidak berwarna lagi. Sehingga diperoleh ekstrak etanol.

Hasil dari masing-masing ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan alat vakum putar (*rotary evaporator*) sehingga diperoleh ekstrak kental n-heksan dan ekstrak kental etanol.

### **3.7 Pembuatan Larutan Pereaksi**

#### **3.7.1 Larutan pereaksi Mayer**

Sebanyak 1,569 g raksa (II) klorida dilarutkan dalam 60 ml air suling kemudian pada wadah lain ditambahkan sebanyak 5 g kalium iodida dalam 10 ml

air suling. Dicampurkan kedua larutan kemudian encerkan dengan air suling hingga volume 100 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.7.2 Larutan pereaksi Dragendroff**

Sebanyak 8 g bismut nitrat dilarutkan dalam asam nitrat 20 ml kemudian di campurkan dengan 50 ml kalium iodida sebanyak 27,2 g dalam 50 ml air suling. Diamkan sampai memisah sempurna, kemudian diambil lapisan jernihnya dilarutkan dalam air hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.7.3 Larutan pereaksi Bouchardat**

Sebanyak 4 g kalium iodida dilarutkan dalam 20 ml air suling kemudian ditambah 2 g iodium sambil diaduk sampai larut, lalu ditambah air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.7.4 Larutan pereaksi Liebarmann-Bourchard**

Sebanyak 5 ml asam asetat anhidrat ditambahkan dengan 5 ml asam sulfat pekat dengan hati-hati tambahkan etanol hingga 50 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.7.5 Larutan Pereaksi Molish**

Sebanyak 3 g  $\alpha$ -naftol dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga diperoleh larutan 100 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.7.6 Larutan timbal asetat**

Sebanyak 15,17 g timbal asetat ditimbang kemudian dilarutkan dalam air bebas karbon dioksida hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.7.7 Larutan natrium hidroksida 2 N**

Sebanyak 4 g natrium hidroksida ditimbang kemudian dilarutkan dalam air bebas karbon dioksida hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.7.8 Larutan asam klorida 2 N**

Asam klorida pekat sebanyak 16,6 ml ditambahkan air suling sampai 100 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.7.9 Larutan asam sulfat**

Asam sulfat pekat sebanyak 5,4 ml ditambahkan air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.7.10 Larutan besi (III) klorida 1%**

Sebanyak 1 g besi (III) klorida ditimbang kemudian dilarutkan dalam air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.7.11 Larutan pereaksi kloralhidrat**

Sebanyak 200 mg kloralhidrat ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml air suling (Depkes RI, 1995).

## **3.8 Skrining Fitokimia**

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam daun jeruk nipis segar, simplisia, ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis, meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid/triterpenoid, dan glikosida.

### **3.8.1 Pemeriksaan alkaloid**

Daun jeruk nipis segar, simplisia, ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan ditimbang masing-masing sebanyak 0,5 g ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 mL air suling, dipanaskan di atas tangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat yang diperoleh dibagi kedalam 3 tabung reaksi yang masing-masing ditambah 2-3 tetes pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Bouchardat. jika di tambahkan pereaksi Mayer akan menghasilkan endapan putih (putih kekuningan)

(+), dan jika di tambahkan pereaksi Bouchardat akan menghasilkan endapan coklat (+), dan jika di tambahkan pereaksi Dragendroff menghasilkan endapan merah jingga (+) (Depkes RI, 1995).

### **3.8.2 Pemeriksaan flavonoid**

Daun jeruk nipis segar, simplisia, ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan ditimbang masing-masing sebanyak 1 g ditambahkan 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh diambil 5 ml, ditambahkan sedikit serbuk magnesium, 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Jika terjadi warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Depkes RI, 1995).

### **3.8.3 Pemeriksaan tanin**

Daun jeruk nipis segar, simplisia, ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan ditimbang masing-masing sebanyak 1 g dididihkan 3 menit dalam 100 ml air suling, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh diambil 2 ml, ditambahkan 1-2 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Bila terbentuk warna hijau atau biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Depkes RI, 1995).

### **3.8.4 Pemeriksaan steroid/triterpenoid**

Daun jeruk nipis segar, simplisia, ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan ditimbang masing-masing sebanyak 1 g, dimaserasi dengan 20 ml kloroform selama 2 jam lalu saring, Filtrat diuapkan dalam cawan penguap sampai kering, kedalam residu ditambahkan pereaksi Liebermann-Bouchard. Jika terbentuk warna ungu atau merah yang berubah menjadi biru ungu atau biru hijau menunjukkan adanya steroid/triterpenoid (Depkes RI, 1995).

### 3.8.5 Pemeriksaan saponin

Daun jeruk nipis segar, simplisia, ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan ditimbang masing-masing sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan lalu dikocok kuat selama 10 detik, apabila terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil dan tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang saat ditetesi 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

### 3.8.6 Pemeriksaan glikosida

Daun jeruk nipis segar, simplisia, ekstrak etanol, dan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis masing-masing sebanyak 3 gram, disari dengan 30 ml campuran 7 bagian etanol 96% dan 3 bagian aquades. Selanjutnya ditambahkan asam sulfat pekat dan direfluks selama 10 menit, didinginkan dan disaring. Kemudian diambil 20 ml filtrat ditambahkan 10 ml aquades dan 10 ml timbal (II) asetat 0,4 M dikocok, didiamkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat disari dengan 20 ml campuran kloroform dan isopropanol (3:2), selanjutnya diuji sebagai berikut:

1. Uji terhadap senyawa gula
  - a. Diambil sebanyak 1 ml lapisan atas (sari air) diuapkan di atas penangas air. Sisa penguapan ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes larutan pereaksi molish, dan ditambahkan hati-hati asam sulfat pekat, terbentuk cincin berwarna ungu pada batasan cairan, reaksi ini menunjukkan adanya ikatan gula.
  - b. Diambil sebanyak 1 ml lapisan atas (sari air) diuapkan di atas penangas air. Sisa penguapan ditambahkan Fehling A dan Fehling B (1:1), kemudian dipanaskan. Terbentuk endapan berwarna merah bata menunjukkan adanya gula pereduksi (Ditjen POM, 1995).



## 2. Uji terhadap senyawa non gula

Diambil 1 ml lapisan bawah (sari pelarut organik), diambil dan diuapkan di atas penangas air suhu tidak lebih dari 60°C. Sisa penguapan dilarutkan dalam 2 ml metanol. Selanjutnya ditambahkan 20 tetes asam asetat glasial dan 1 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Liebermann-Bouchard), jika terjadi warna biru, hijau, merah, ungu menandakan positif non gula (Depkes RI, 1995).

### 3.9. Persiapan Bahan Pereaksi dan Media Bakteri

#### 3.9.1 Pembuatan malachit green 2%

Ditimbang sebanyak 10 g *malachit green*, dimasukkan kedalam mortar yang bersih, diberikan sedikit alkohol absolut lalu digerus. Dilarutkan dalam 500 ml akuades, kemudian dipanaskan pada penangas air 56°C, kondisi botol terbuka selama 1 jam (sampai bau alkohol hilang) lalu ditutup botol dan disimpan.

#### 3.9.2 Pembuatan pereaksi untuk pewarnaan *Zeihl-Nelsen*

Tahapan pembuatan pereaksi ini meliputi sebagai berikut:

##### 1. Larutan fenol 5%

Ditimbang 5 g fenol dilarutkan dalam sampai 100 ml akuades.

##### 2. Karbol fuchsin 0,3%

Sebanyak 3 g fuchsin dilarutkan dalam alkohol absolut 100 ml, kemudian dipipet larutan tersebut 10 ml, tambahkan 90 ml larutan fenol 5% dan disimpan dalam botol warna gelap.

##### 3. Larutan asam-alkohol 3%

Sebanyak 30 ml asam klorida pekat dicampurkan dengan 970 ml alkohol absolut.

##### 4. Metilen blue 0,3%

Sebanyak 3 g metilen blue dimasukkan ke dalam cawan porselin, ditambahkan beberapa tetes alkohol dan gerus, lalu dimasukkan ke dalam beker glass dan ditambahkan akuades sampai 100 ml.

### 3.9.3 Pembuatan media *Lowenstein-Jensen* (LJ)

Media *Lowenstein-Jensen* (LJ) terdiri dari campuran larutan garam, gliserol-*malachit green* 2% dan telur komposisinya sebagai berikut:

#### a. Komposisi media *Lowenstein-Jensen* (LJ)

Larutan garam

Kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	3 g(1 g)
Sodium glutamat	1g
Akuades	100 ml
Campuran gliserol- Malachit green 2%	
Gliserol	6 ml
Malachit green 2%	6 ml
Telur yang dikocok	200 ml

Jumlah  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  untuk media ogawa, digunakan untuk media obat.

#### b. Pembuatan larutan garam

Sebanyak 3 g kalium dihidrogen fosfat dan 1 g sodium glutamat dilarutkan dalam akuades, dimasukkan dalam penangas air untuk dipanaskan pada suhu  $100^\circ\text{C}$  selama 30 menit atau dapat juga dipanaskan dengan tangki sterilisasi (autoklaf) pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 115 menit.

#### c. Persiapan larutan telur

Kulit telur dibersihkan dengan cara menyikatnya dan diberi sabun, kemudian dibilas dengan air yang mengalir, dikeringkan dalam sebuah keranjang. Permukaan kulit telur diusap dengan kapas alkohol, kemudian telur dipecahkan satu persatu dan ditampung di dalam beker glass steril untuk memeriksa kualitas

telur. Selanjutnya dikocok menggunakan sendok. Kemudian disaring dengan memakai 2 lembar kain kasa steril, dimasukkan ke dalam gelas ukur steril 200 ml.

**d. Pembenuhan telur yang belum dimasak**

Gliserol dan *malachit green* 2% dicampurkan ke dalam larutan garam, kemudian didinginkan pada suhu ruangan. Diaduk dengan perlahan-lahan sampai homogen, kemudian dituangkan seluruh larutan telur yang sudah dikocok secara perlahan-lahan melalui dinding leher labu Erlenmeyer untuk menghindari terbentuk busa. Dikocok perlahan-lahan dan dibiarkan selama 30 menit.

**e. Dispersasi media mentah utuh.**

Sebanyak 6-7 ml media telur yang sudah dikocok (mentah) dituangkan ke dalam tabung melalui dinding tabung untuk menghindari terjadinya busa, selanjutnya dilakukan pengentalan dengan cara tabung-tabung yang berisi media telur diletakkan dengan cara dimiringkan pada rak tabung dan dikentalkan media di dalam inspikator pada suhu 90°C selama 1 jam.

Setelah pengentalan dalam inspikator, dibiarkan tabung-tabung itu pada suhu kamar sampai dingin, kemudian tabung-tabung disimpan di dalam tabung kantong plastik. Diikat dan disimpan tabung yang berisi pembenuhan (media) di dalam lemari pendingin 2-8°C dengan posisi berdiri sampai digunakan. Media ini dapat disimpan sampai satu bulan.

**f. Pengentalan**

Tabung-tabung yang berisi media telur diletakkan dengan cara dimiringkan pada rak tabung dan dikentalkan media di dalam inspikator pada suhu 90°C selama 1 jam.

**g. Penyimpanan**

Setelah pengentalan dalam inspissator, dibiarkan tabung-tabung itu pada suhu kamar sampai dingin. Kemudian tabung-tabung disimpan ke dalam kantong plastik. Diikat dan disimpan tabung yang berisi pembenihan (media) di lemari pendingin 2-8°C dengan posisi berdiri sampai digunakan. Media ini dapat disimpan sampai satu bulan (*Japan Internasional Cooperation Agency, 1987*).

#### **3.9.4 Pembuatan media *Loweinstein-Jensen* yang mengandung bahan uji**

Digunakan media *Loweinstein-Jensen* perlakuannya sama seperti pembuatan media *Loweinstein-Jensen* untuk pemeriksaan di atas, tetapi digunakan kalium dihidrogen fosfat 3 g dan sebelum pengentalan, masing-masing pada tabung ditambahkan rifampisin, etambutol, isoniazid (INH) sebagai media pembanding, ekstrak daun jeruk nipis dengan variasi konsentrasi sebagai media bahan uji, dan tabung tanpa penambahan bahan uji sebagai media blanko (*Japan International Cooperation Agency, 1987*).

#### **3.10 Persiapan Bahan Obat (Pembanding) dan Bahan Uji**

Bahan uji dan bahan obat sebagai pembanding dicampurkan ke dalam media *Loweinstein-Jensen* dengan berbagai konsentrasi sebagai berikut (*Japan Internasional Cooperation Agency, 1987*).

##### **a. Rifampisin**

Ditimbang 200 mg rifampisin, dilarutkan dalam 5 ml propilen glikol, dan diencerkan di dalam labu tentukur 50 ml dengan akuades sampai garis tanda diperoleh larutan rifampisin 4000 µg/ml.

##### **b. Etambutol**

Ditimbang 100 mg etambutol, dilarutkan dalam 5 ml propilen glikol dan diencerkan di dalam labu tentukur 100 ml dengan akuades sampai garis tanda diperoleh larutan etambutol 1000 µg/ml.

c. Isoniazid

Ditimbang 25 mg isoniazid, dilarutkan dalam 5 ml propilen glikol dan diencerkan di dalam labu tentukur 50 ml dengan akuades sampai garis tanda diperoleh larutan etambutol 500 µg/ml. Dipipet 2 ml larutan tersebut diencerkan di dalam labu tentukur 50 ml dengan akuades sampai garis tanda diperoleh larutan konsentrasi 20 µg/ml.

- d. Ditimbang 2,5 g ekstrak etanol daun jeruk nipis dilarutkan dalam etanol sampai 10 ml, diperoleh larutan ekstrak etanol daun jeruk nipis konsentrasi 250 mg/ml.
- e. Ditimbang 2,0 g ekstrak etanol daun jeruk nipis dilarutkan dalam etanol sampai 10 ml, diperoleh larutan ekstrak etanol daun jeruk nipis konsentrasi 200 mg/ml.
- f. Ditimbang 1,0 g ekstrak etanol daun jeruk nipis dilarutkan dalam etanol sampai 10 ml, diperoleh larutan ekstrak etanol daun jeruk nipis konsentrasi 100 mg/ml.
- g. Ditimbang 500 mg ekstrak etanol daun jeruk nipis dilarutkan dalam etanol sampai 10 ml, diperoleh larutan ekstrak etanol daun jeruk nipis konsentrasi 50 mg/ml.
- h. Ditimbang 2,5 g ekstrak n-heksan daun jeruk nipis dilarutkan dalam n-heksan sampai 10 ml, diperoleh larutan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis konsentrasi 250 mg/ml.

- i. Ditimbang 2,0 g ekstrak n-heksan daun jeruk nipis dilarutkan dalam n-heksan sampai 10 ml, diperoleh larutan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis konsentrasi 200 mg/ml.
- j. Ditimbang 1,0 g ekstrak n-heksan daun jeruk nipis dilarutkan dalam n-heksan sampai 10 ml, diperoleh larutan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis konsentrasi 100 mg/ml.
- k. Ditimbang 500 mg ekstrak n-heksan daun jeruk nipis dilarutkan dalam n-heksan sampai 10 ml, diperoleh larutan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis konsentrasi 50 mg/ml.

**Tabel 3.1** Hasil perhitungan bahan pembanding dan bahan uji dalam media ogawa

No	Bahan obat (kontrol)/bahan uji	Konsentrasi bahan obat/bahan uji	Jlh bahan diambil (ml)	Jlh media LJ	Konsentrasi bahan dalam media LJ
1.	Rifampisin	4000 µg/ml	1	100	40 µg/ml
2.	Etambutol	1000 µg/ml	1	100	10 µg/ml
3.	Isoniazid	20 µg/ml	1	100	0,2 µg/ml
4.	Ekstrak etanol daun jeruk jipis	250 mg/ml	5	50	25 mg/ml
5.	Ekstrak etanol daun jeruk nipis	200 mg/ml	5	50	20 mg/ml
6.	Ekstrak etanol daun jeruk nipis	100 mg/ml	5	50	10 mg/ml
7.	Ekstrak etanol daun jeruk nipis	50 mg/ml	5	50	5 mg/ml
8.	Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis	250 mg/ml	5	50	25 mg/ml
9.	Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis	200 mg/ml	5	50	20 mg/ml
10.	Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis	100 mg/ml	5	50	20 mg/ml
11.	Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis	50 mg/ml	5	50	5 mg/ml

### 3.11 Uji Potensi Antituberkulosis Secara *In Vitro*

#### 3.11.1 Pengambilan spesimen sputum

Spesimen sputum yang diambil berupa sputum yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* dari 3 orang pasien yang positif terinfeksi tuberkulosis di Rumah Sakit Haji Medan, kemudian sputum yang diperoleh dimasukkan ke dalam wadah steril yang akan digunakan sebagai sampel pada uji efektifitas antituberkulosis.

#### 3.11.2 Identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* (pewarnaan *Ziehl-Nelsen*)

Sebelum digunakan sputum yang diambil dari penderita tuberkulosis diidentifikasi terlebih dahulu untuk memastikan adanya bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dengan cara sebagai berikut:

Pulasan sputum pada *object glass* difiksasi dan dituangi dengan karbol fuchsin 0,3%. Dipanaskan dengan jarak slide 15 cm di atas api bunsen sampai keluar uap, tunggu selama 5 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu ditetesi dengan asam-alkohol 3%. Dicuci lagi dengan air mengalir perlahan hingga bersih. Selanjutnya diwarnai dengan metilen blue 0,3%, dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan dengan tisu. Kemudian diamati di bawah mikroskop, adanya basil berwarna merah menunjukkan adanya *Mycobacterium tuberculosis*. Selain dengan cara pewarnaan *Ziehl-Nelsen* untuk identifikasi bisa juga dilakukan dengan cara *Lowenstein-Jensen* untuk melihat positif bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Misnadiarly, 2006).

- (-) : tidak ada pertumbuhan berwarna hijau
- (+1) :  $\frac{1}{4}$  terlihat ada sedikit koloni warna kuning 1-200 koloni
- (+2) :  $\frac{1}{2}$  dari media tertutup oleh koloni warna kuning (200-500 koloni)
- (+3) :  $\frac{3}{4}$  dari media tertutup oleh koloni warna kuning (500-2000 koloni)
- (+4) : media tertutup seluruhnya oleh koloni warna kuning (lebih dari 2000 koloni)

### 3.11.3 Kultivasi dan isolasi *Mycobacterium tuberculosis* pada media LJ

Sputum yang telah diidentifikasi dan memberi hasil positif *Mycobacterium tuberculosis* yang berasal dari beberapa penderita tuberkulosis diambil untuk dilanjutkan dan digunakan sebagai bakteri uji, yaitu dilakukan kultivasi dan isolasi untuk selanjutnya hasil isolasi ini digunakan untuk pengujian efektifitas bahan obat sebagai antituberkulosis dengan cara:

Spesimen sputum dari tempat penampungan, dipindahkan sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi dan dituangkan lebih kurang 4 ml larutan natrium hidroksida 4%, disimpan tabung tersebut di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 15 menit untuk melarutkan spesimen.

Kemudian diangkat tabung dari inkubator dan isinya diaduk perlahan-lahan agar homogen. Dipipet 0,1 ml bahan pemeriksaan yang sudah diolah masukkan pada tabung kultur/pembiakan yang berisi media *Loweinstein-Jensen*. Bahan inokulasi harus menyebar rata di atas permukaan setiap media.

Tabung-tabung ini diletakkan pada rak miring dengan tutup yang dikendorkan, dan disimpan pembenihan yang sudah ditanami di dalam inkubator 37°C dalam keadaan tabung tertutup dengan baik ketika permukaan media kering, kemudian dilanjutkan inkubasi sampai sekurang-kurangnya 4 minggu.

Diamati koloni yang tumbuh, *Mycobacterium tuberculosis* positif jika pada permukaan media terdapat koloni berwarna kuning atau orange. Selanjutnya koloni ini digunakan sebagai bakteri uji (*Japan International Cooperation Agency*, 1987).



#### 3.11.4 Uji potensi/efektifitas antituberkulosis

Uji potensi/efektifitas ekstrak etanol, dan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis dilakukan dengan cara uji kesanggupan/potensi penghambatan pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* hasil isolasi dari spesimen sputum penderita positif tuberkulosis di dalam media *Loweinstein-Jensen* digunakan pembanding yaitu rifampisin, etambutol, dan isoniazid, juga dilakukan terhadap media kontrol/blanko tanpa menggunakan bahan pembanding dan bahan uji dengan tahapan kerja sebagai berikut.

#### 3.12. Pembuatan Suspensi Bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

Sebanyak 3 tetes akuades steril diteteskan ke dalam gelas pencampur, dipindahkan satu kawat ose koloni dari media kultur ke dalam gelas pencampur. Kemudian dihancurkan/digiling dengan memutar alat hingga homogen dan dituangkan 7 ml akuades steril. Kemudian dari larutan ini diambil 0,1 ml diencerkan dengan 9,9 ml akuades steril sehingga diperoleh suspensi bakteri konsentrasi lebih kurang 0,01 mg/ml (*Japan International Cooperation Agency*, 1987).

#### 3.13 Inokulasi Suspensi Bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

Sebanyak 0,1 ml suspensi bakteri konsentrasi 0,01 mg/ml diinokulasikan ke dalam tiga tabung berisi media *Loweinstein-Jensen* yang lebih mengandung masing-masing bahan pembanding dan bahan uji berbagai konsentrasi. Diratakan suspensi bakteri ke seluruh permukaan media dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 6 minggu dan diamati pertumbuhan bakteri di setiap minggu dengan kriteria pembacaan (*Japan Internasional Cooperation Agency*, 1987).

Pembacaan:

- (-) : tidak ada pertumbuhan berwarna hijau
- (+1) :  $\frac{1}{4}$  terlihat ada sedikit koloni warna kuning 1-200 koloni
- (+2) :  $\frac{1}{2}$  dari media tertutup oleh koloni warna kuning (200-500 koloni)
- (+3) :  $\frac{3}{4}$  dari media tertutup oleh koloni warna kuning (500-2000 koloni)
- (+4) : media tertutup seluruhnya oleh koloni warna kuning (lebih dari 2000 koloni)



## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Hasil Determinasi Sampel**

Daun jeruk nipis yang digunakan dalam penelitian dilakukan determinasi untuk mengetahui kebenaran tanaman dan untuk menghindari terjadinya kesalahan saat pengambilan bahan atau sampel. Determinasi tumbuhan dilakukan di *Laboratorium Sistematika Tumbuhan Herbarium Medanense (MEDA)* Universitas Sumatera Utara, Medan. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*). Hasil determinasi tumbuhan dapat dilihat pada Lampiran 1 halaman 63 dan gambar tumbuhan dapat dilihat pada Lampiran 2 halaman 64.

#### **4.2 Hasil Pemeriksaan Makroskopik Daun Jeruk Nipis**

Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan cara mengamati kondisi fisik daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) yang digunakan penelitian secara langsung. Hasil dari makroskopik, pada helai daun berbentuk oval, bagian pangkal daun membulat dan ujung daunnya berbentuk tumpul. Bagian tepi daunnya beringgit, ukuran daun jeruk nipis berkisar pada panjang mencapai 2,5-9 cm dan lebarnya 2,5 cm. Bagian atas daun memiliki warna hijau mengkilat dan bagian bawahnya hijau muda. Untuk daging daunnya menyerupai kertas, tulang daunnya menyirip, tangkai yang bersayap dan memiliki bau yang khas.

#### **4.3 Hasil Pemeriksaan Mikroskopik Serbuk Simplisia**

Hasil pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*). Terdapat stomata, rambut penutup, berkas

pembuluh, dan mesofil dengan serabut sklerenkim. Hasil pemeriksaan mikroskopik daun jeruk nipis dapat dilihat pada Lampiran 3 halaman 65.

#### **4.4 Hasil Penetapan Kadar Air**

Pemeriksaan kadar air simplisia merupakan bagian dari karakterisasi simplisia. Hasil pemeriksaan kadar air serbuk simplisia daun jeruk nipis menggunakan metode azeotrop diperoleh 7,6%, memenuhi persyaratan kadar air simplisia secara umum dari Materia Medika Indonesia yang tidak lebih dari 10% (Depkes RI, 1995).

Kadar air ditetapkan untuk menjaga kualitas senyawa yang terkandung di dalam simplisia. Simplisia dengan kadar air tinggi dapat menyebabkan ketidakstabilan simplisia dalam penyimpanan, dan akan lebih mudah terkontaminasi oleh mikroorganisme dan menghindari tumbuhnya jamur atau kapang pada simplisia. Cara kerja dapat dilihat pada Lampiran 4 halaman 66 dan perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 5 halaman 67.

#### **4.5 Hasil Ekstraksi**

Metode ekstraksi yang digunakan adalah perkolasi dengan menggunakan pelarut n-heksan selanjutnya difraksinasi dengan pelarut etanol 80%. Kemudian diuapkan di rotary evaporator dan dipekatkan sehingga diperoleh ekstrak kental n-heksan 15 g dan ekstrak etanol 110 g. Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah (Mukhriani, 2016). Cara kerja dapat dilihat pada Lampiran 6 halaman 68 dan hasil dapat dilihat pada Lampiran 7 halaman 69.

#### 4.6 Hasil Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada tumbuhan daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*). Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) mengandung senyawa metabolit sekunder. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada tabel 4.1 sebagai berikut.

**Tabel 4.1** Hasil skrining fitokimia daun segar, serbuk simplisia, ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis.

No	Pemeriksaan	Hasil			
		Daun jeruk nipis segar	Serbuk simplisia daun jeruk nipis	Ekstrak etanol daun jeruk nipis	Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis
1.	Alkaloid	+	+	+	-
2.	Flavonoid	+	+	+	-
3.	Saponin	+	+	+	-
4.	Tanin	+	+	+	-
5.	Steroid/triterpenoid	+	+	+	+
6.	Glikosida	+	+	+	+

Keterangan :

+ : Mengandung golongan senyawa

- : Tidak mengandung golongan senyawa

Berdasarkan tabel di atas menunjukkan bahwa daun jeruk nipis segar, serbuk simplisia, dan ekstrak etanol daun jeruk nipis mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid/triterpenoid, dan glikosida. Sedangkan ekstrak n-heksan hanya mengandung steroid/triterpenoid dan glikosida.

Alkaloid dikatakan positif jika terdapat kekeruhan atau endapan paling sedikit dua dari tiga percobaan pada penambahan Mayer, Dragendorff, dan Buchardat. Flavonoid positif ditandai dengan terbentuknya warna kuning kemerahan pada lapisan amil alkohol. Saponin positif ditandai dengan

terbentuknya busa pada pengocokan dengan air panas dan tidak hilang dengan penambahan asam klorida, dan busanya bertahan selama 10 menit. Tanin positif ditandai dengan warna hijau kehitaman pada penambahan pereaksi Feri klorida (III). Steroid/triterpenoid positif ditandai dengan warna biru kehijauan pada penambahan pereaksi Liebermann-Bouchard. Glikosida positif ditandai dengan warna biru atau hijau pada penambahan pereaksi Liebermann-Bouchard. Hasil dapat dilihat Lampiran 8 halaman 70.

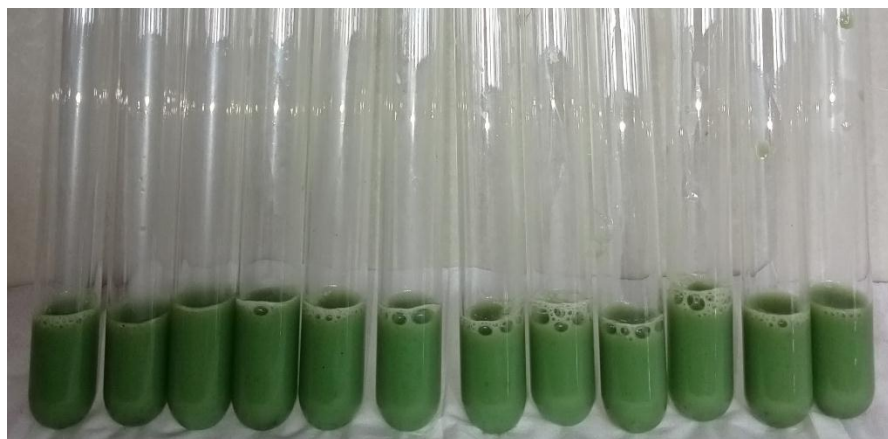
#### **4.7 Identifikasi Bakteri**

Identifikasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dilakukan dengan cara pewarnaan *Zeihl-Nelsen* untuk mengetahui ada tidaknya *Mycobacterium tuberculosis* didalam sampel sehingga dapat diketahui bahwa sampel digunakan benar mengandung bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Hasil identifikasi pewarnaan bakteri dapat menunjukkan bahwa sampel yang diperiksa memberikan basil berwarna merah sehingga dapat membuktikan bahwa sampel yang di uji positif mengandung bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Skematis cara kerja dilihat pada Lampiran 9 halaman 71 dan hasil dapat dilihat pada Lampiran 10 halaman 72.

#### **4.8 Hasil Uji Potensi Antituberkulosis *In Vitro***

Media LJ sebelum diberikan bahan uji terlihat berwarna hijau, merupakan warna *malachit-green* 2% yang berfungsi sebagai indikator. Media LJ setelah diberikan berbagai bahan uji, seluruhnya terlihat belum ada perubahan warna masih sama dengan media sebelum diberikan bahan uji yaitu warna hijau dari *malachit- green*, dapat dilihat pada gambar 4.1 berikut.

**Gambar 4.1** Media LJ sebelum diberikan bahan uji dan spesimen sputum tuberculosis



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 S

elanjutn

ya media yang telah diberikan bahan uji dan bakteri tuberculosis diinokulasikan 0,1 ml sputum bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan diinkubasikan pada suhu 37°C, diamati perubahan warna yang terjadi pada media setiap minggu selama 4 minggu.

Jika terjadinya pertumbuhan bakteri tuberculosis yang diinokulasikan, dapat diamati dengan terbentuknya warna kuning karena terjadinya perubahan pH yang disebabkan oleh bakteri tersebut, sesuai standar dari *Japan International Cooperation Agency*. Setelah diinkubasikan selama satu minggu, terlihat adanya pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan dari bakteri tuberculosis membutuhkan waktu yang lama, sehingga membutuhkan waktu inkubasi yang lama, karena bakteri tuberculosis ini mempunyai sifat yang hampir menyerupai jamur (*Mycophyta*), bersifat tahan asam dan dapat bertahan hidup lebih lama.

Uji potensi antituberkulosis dari ekstrak n-heksan dan ekstrak etanol 80% dilakukan dengan berbagai konsentrasi 25 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, dan 5



mg/ml. Dan menggunakan pembanding antituberkulosis sintetis rifampisin 40 µg/ml, etambutol 10 µg/ml, isoniazid 0,2 µg/ml terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dari sputum penderita positif terinfeksi tuberkulosis dan dikultur pada media *Lowenstein-Jensen*. Sebagai uji blanko/kontrol digunakan media yang tidak ditambahkan bahan uji. Pengujian dilakukan pengamatan setiap minggu sampai minggu keempat. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 4.2 sebagai berikut.

**Tabel 4.2** Hasil Uji Efektifitas Antituberkulosis Bahan Uji dan Pembanding

Bahan uji	Konsentrasi	Pertumbuhan koloni pada spesimen A minggu ke				Pertumbuhan koloni pada spesimen B minggu ke				Pertumbuhan koloni pada spesimen C minggu ke			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Kontrol/blanko	0	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
Rifampisin	40 µg/ml	+1	+3	+4	+4	+1	+3	+4	+4	+1	+3	+4	+4
Etambutol	10 µg/ml	+1	+3	+4	+4	+1	+3	+4	+4	+1	+3	+4	+4
Isoniazid	0,2 µg/ml	+1	+3	+4	+4	+1	+3	+4	+4	+1	+3	+4	+4
Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis	25 mg/ml	+3	+4	+4	+4	+3	+4	+4	+4	+3	+4	+4	+4
	20 mg/ml	+3	+4	+4	+4	+3	+4	+4	+4	+3	+4	+4	+4
	10 mg/ml	+3	+4	+4	+4	+3	+4	+4	+4	+3	+4	+4	+4
	5 mg/ml	+3	+4	+4	+4	+3	+4	+4	+4	+3	+4	+4	+4
Ekstrak etanol daun jeruk nipis	25 mg/ml	-	+2	+3	+3	-	+2	+3	+3	-	+2	+3	+3
	20 mg/ml	-	+2	+3	+3	-	+2	+3	+3	-	+2	+3	+3
	10 mg/ml	-	+2	+3	+3	-	+2	+3	+3	-	+2	+3	+3
	5 mg/ml	-	+2	+3	+3	-	+2	+3	+3	-	+2	+3	+3

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa uji potensi antituberkulosis secara *in vitro* ekstrak etanol mempunyai potensi lebih kuat terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dibandingkan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis tentunya sangat erat kaitannya dengan kandungan senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Pada proses pembuatan ekstrak kemungkinan adanya senyawa kimia yang tidak turut tersari atau hilang pada proses penguapan atau pengeringan sehingga n-heksan dikategorikan sangat rendah dalam menghambat pertumbuhan bakteri

*Mycobacterium tuberculosis*. Hal ini kemungkinan senyawa aktif yang mempunyai potensi sebagai antituberkulosis seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin lebih banyak tersari kedalam penyari etanol dibandingkan n-heksan. Dapat dilihat pada spesimen A, B dan C minggu 1 belum terlihat adanya pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* pada konsentrasi 25 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, dan 5 mg/ml, namun berbeda halnya dengan media yang mengandung ekstrak n-heksan dengan berbagai konsentrasi sudah terdapat pertumbuhan bakteri pada minggu 1 terdapat bakteri +3 , pada minggu ke 2 sampai minggu ke 4 terjadi pertumbuhan bakteri +4 hal ini dilihat dari bentuk yang berwarna kuning.

Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan cara menghambat komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga dinding sel tidak terbentuk utuh. Hal tersebut menyebabkan kematian sel. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut yang mengakibatkan fosfolipid tidak mampu mempertahankan bentuk membran sel bakteri, akibatnya membran sel bakteri akan menjadi bocor dan bakteri mengalami hambatan pertumbuhan bahkan kematian. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri, sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Mekanisme tanin sebagai antibakteri adalah mengganggu sintesa peptidoglikan sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Keadaan tersebut menyebabkan keadaan sel bakteri menjadi

lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri menjadi mati (Pertiwi *et al.*, 2022).

Secara keseluruhan hasil uji potensi antituberkulosis pada tabel di atas terlihat pada spesimen A, B dan C terjadinya resisten terhadap rifampisin 40 µg/ml, etambutol 10 µg/ml, isoniazid 0,2 µg/ml karena terdapat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* pada minggu ke 1 terdapat pertumbuhan bakteri +1. Pada minggu ke 2 terdapat pertumbuhan bakteri +3 dan pada minggu ke 3 sampai minggu ke 4 terdapat pertumbuhan bakteri +4.

Selanjutnya pada ekstrak n-heksan pada spesimen A, B, dan C terjadi resisten pada konsentrasi 25 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, dan 5 mg/ml pada minggu 1 terdapat pertumbuhan bakteri +3, pada minggu ke 2 sampai minggu ke 4, terdapat pertumbuhan bakteri +4. Sedangkan pada ekstrak etanol spesimen A, B, dan C pada konsentrasi 25 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, dan 5 mg/ml pada minggu 1 masih berwarna hijau belum terdapat pertumbuhan bakteri, pada minggu ke 2 terdapat pertumbuhan bakteri +2 dan terlihat pada minggu ke 3 sampai minggu ke 4 terdapat pertumbuhan bakteri +3.

Sehingga terlihat bahwa potensi antituberkulosis bakteri *Mycobacterium tuberculosis* sudah terjadi resisten terhadap obat sintetis rifampisin, etambutol dan isoniazid. Hal ini dilihat dari hasil inkubasi pada minggu ke 1 telah berwarna kuning kemungkinan dapat disebabkan oleh penggunaan obat antituberkulosis sintetis yang digunakan masyarakat selama ini kurang disiplin sehingga terjadi kasus MDR (*Multi Drug Resistance*). Oleh karena itu saat ini penggunaan obat antituberkulosis sudah tidak digunakan lagi secara tunggal tetapi digunakan secara kombinasi yaitu OAT KDT (obat antituberkulosis kombinasi dosis tetap). Adapun

penggunaan obat secara kombinasi mempunyai manfaat efek potensiasi sinergisme yaitu menutupi efek samping dari satu obat dan memberikan kekuatan yang lebih besar. Hasil inkubasi dapat dilihat pada Lampiran 15 halaman 77.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

1. Daun jeruk nipis segar, serbuk simplisia, ekstrak etanol mengandung golongan senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan glikosida. Sedangkan ekstrak n-heksan hanya mengandung golongan senyawa metabolit sekunder steroid dan glikosida.
2. Ekstrak etanol daun jeruk nipis dan ekstrak n-heksan mempunyai potensi menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*.
3. Terdapat perbedaan kekuatan potensi antibakteri *Mycobacterium tuberculosis* antara ekstrak etanol daun jeruk nipis lebih kuat dibandingkan ekstrak n-heksan yaitu terlihat pada minggu ke 1 ekstrak etanol belum terdapat adanya pertumbuhan bakteri. Sedangkan pada ekstrak n-heksan dari minggu 1 sampai minggu ke 4 terdapat pertumbuhan bakteri.

#### 5.2 Saran

Disarankan kepada masyarakat pada pengobatan tuberkulosis disamping menggunakan obat kombinasi OAT KDT juga menggunakan daun jeruk nipis sebagai obat pendamping agar efek pengobatan lebih kuat.

Disarankan juga kepada peneliti berikutnya untuk melanjutkan penelitian ini seperti uji potensi antituberkulosis dengan berbagai bahan penyari daun jeruk nipis secara *in vivo* dan secara nanoherbal dan juga dibuat dalam bentuk formula sehingga daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) dapat dikembangkan menjadi obat alternatif antituberkulosis yang baik, aman, murah, disenangi, dan mudah didapat sehingga membantu pemusnahan penyakit tuberkulosis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustina. (2016). Skrining Fitokimia Tanaman Obat Di Kabupaten Bima. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 4(1), 71–76.
- Arvian Larasati Dwi, RamadhaniAprilliana, Laila, M. V., Pujiastuti, R., Anasthasia, Krisnawati, M., Khoiriyah, & Indrayati. (2023). *Farmakognosi : Menelusuri Rahasia Obat dari Alam*.
- Cahyani, I. M. (2004). *Media Farmasi Indonesia Vol 12 No 2*. 12(2).
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Materia Medika Indonesia*, Jilid V, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
- Depkes, R. I. (2005). *Pharmaceutical care untuk penyakit Tuberkulosis*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes, R. I. (2000). *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 3-30.
- Depkes, RI. (1995). *Materia Medika Indonesia. Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Ditjen, P. O. M., & Depkes, R. I. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia*, 298.
- Ghozaly, M. R., Gunarti, N. S., Fikayuniar, L., & Aziz, S. (2023). *Metode Fitokimia untuk Farmasi-Jejak Pustaka*. Jejak Pustaka. Hal 1-4
- Handayani, F., Apriliana, A., & Natalia, H. (2019). Karakterisasi Dan Skrining Fitokimia Simplisia Daun Selutui Puka (*Tabernaemontana macracarpa* Jack). *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina (JIIS): Ilmu Farmasi Dan Kesehatan*, 4(1), 49–58. <https://doi.org/10.36387/jiis.v4i1.285>
- Harborne, J. B. (1984). The terpenoids. *Phytochemical Methods: a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 100-141.
- Haribi, R., & Harahap, Z. A. (2009). Pengaruh Lysol Terhadap Pertumbuhan Mycobacterium Tuberculosis Pada Sputum Bta Positif Sisa Bahan Pemeriksaan Laboratorium Bp 4 Semarang. *Jurnal Kesehatan*, 2(1), 34–40.
- Irianti, R., Kuswandi, Y. N., & Kusumaningtiyas, R. (2016). Mengenal Anti Tuberculosis. *Mengenal Anti-Tuberculosis*, 1-212.
- Japan International Cooperation Agency. (1987). *Minimum Essentials Of Laboratory Procedure For Tuberculosis Control*. Semarang : Balai Laboratorium Kesehatan Semarang. Halaman :51-65.
- Kementrian Kesehatan Indonesia. (2014). Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. *Pedoman Nasional Pengendalian Tuberculosis : Indonesia Bebas Tuberculosis*. Jakarta. Kementrian Kesehatan RI

- Kemenkes, R. I. (2014). Pedoman nasional pengendalian *Tuberkulosis*. Jakarta: kementerian kesehatan RI.
- Leba, M. A. U. (2017). *Buku Ajar: Ekstraksi dan real kromatografi*. Deepublish.
- Mayasari, U., & Laoli, M. T. (2018). Karakterisasi Simplisia Dan Skrining Fitokimia Daun Jeruk Lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.f.). *Klorofil: Jurnal Ilmu Biologi Dan Terapan*, 2(1), 7. <https://doi.org/10.30821/kfl:jibt.v2i1.1802>
- Meiyanti, D. A., Karsiwi, R. R. M., & Nurlena. (2021). Pemanfaatan daun jeruk nipis dan cuka sebagai bahan pembersih kamar mandi ramah lingkungan. *E-Proceeding of Applied Science*, 7(5), 1615–1622.
- Mukhriani. (2016). Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *J. Kesehat.*, VII(2), 361. <https://doi.org/10.1007/s11293-018-9601-y>
- Muldianah, D., Nurdimayanthi, D. A., Rahmawati, D. S., & Fadhilah, H. (2021). Teknik Isolasi dan Identifikasi Senyawa Glikosida dari Berbagai Tanaman. *PharmaCine : Journal of Pharmacy, Medical and Health Science*, 2(1), 11–21. <https://doi.org/10.35706/pc.v2i1.5577>
- Musdja, muhammad yanis. (2017). *Farmakologi dan Terapi HIV/AIDS, TBC*. 160.
- Minarno, E. B. (2015). Skrining fitokimia dan kandungan total flavanoid pada buah carica pubescens lenne & k. koch di kawasan Bromo, Cangar, dan dataran tinggi Dieng. *El-Hayah: Jurnal Biologi*, 5(2), 73-82.
- Misnadiarly, A. A. (2006). *Tuberkulosis dan Mycobacterium Atipik*. Jakarta. Dian rakyat.
- Mustiqawati, E., & Yolandari, S. (2022). Identifikasi Senyawa Saponin Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* S.) Dengan Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Promotif Prefentif*, 5(2), 66–73.
- Musman, M. (2017). Kimia Organik Bahan Alam. *Kimia Organik Bahan Alam*. <https://doi.org/10.52574/syiahkualauniversitypress.298>
- Nugroho, A. (2017). Buku Ajar: Teknologi Bahan Alam. In *Lambung Mangkurat University Press* (Issue January 2017).
- Pertiwi, F. D., Rezaldi, F., & Puspitasari, R. (2022). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Biosaintropis (Bioscience-Tropic)*, 7(2), 57–68. <https://doi.org/10.33474/e-jbst.v7i2.471>
- Putra Ogi Andyka. (2012). *Studi Kasus Mycobacterium Tuberkulosis Yang Resisten Terhadap Antibiotik Lini Pertama Pada Pasien Tuberkulosis Di RSUP Fatmawati*. May 2014, 32.
- Restiawati, N. M., & Burhan, E. (2011). Diagnosis dan Penatalaksanaan

- Tuberculosis ( MOTT ). *J Respir Indo*, 31(3), 156–164.
- Robinson T., (1995). *Kandungan Organic Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Institut Teknologi Bandung. Jakarta.
- Sabirin, M., Hardjono, S., & Respati, S. (1994). Pengantar Praktikum Kimia Organik II.
- Sugiharti, T., Hasyim, H., & Sunarsih, E. (2023). Hubungan Faktor Pejamu terhadap Kejadian Tuberkulosis Paru : Literatur Review. *Jurnal Ners*, 7(2), 811–815. <https://doi.org/10.31004/jn.v7i2.14499>
- Syahrial, E., & Andayani, L. S. (2013). Gambaran Peran Keluarga terhadap Penderita TBC di Wilayah Kerja Puskesmas Kota Datar Kecamatan Hamparan Perak Kabupaten Deli Serdang Provinsi Sumatera Utara 2013. *Kebijakan, Promosi Kesehatan dan Biostatistika*, 1(2), 14350.
- Syaifiyatul, Humaidi, F., Anggarini, D. R., Madura, U. I., & Madura, U. I. (2020). Kepatuhan Minum Obat Anti Tuberkulosis Pada Pasien TBC Regimen. *Jurnal Ilmiah Farmasi Attaamru*, 01(01).
- Utji R & Harun H., (1994). Kuman Tahan Asam dalam Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran, Edisi Revisi, Jakarta
- Wahyuningrum, R., Ritmaleni, R., Irianti, T., Wahyuono, S., Kaneko, T., & Nuryastuti, T. (2017). Antituberculosis Activity of Brotowali (*Tinospora crispa*) Extract and Fractions against Mycobacterium tuberculosis using Microplate Alamar Blue Assay Method. *Majalah Obat Tradisional*, 22(2), 124. <https://doi.org/10.22146/tradmedj.27925>
- Widaryanto, E., & Azizah, N. (2018). *Perspektif tanaman obat berkhasiat: Peluang, budidaya, pengolahan hasil, dan pemanfaatan*. Universitas Brawijaya Press.
- yudiyanto, Nasrul Hakim, A. Z. W. (2021). *Tumbuhan Obat Suku Lampung*.



**Lampiran 1.** Hasil determinasi tumbuhan daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*)



**LABORATORIUM SISTEMATIKA TUMBUHAN  
HERBARIUM MEDANENSE  
(MEDA)**

**UNIVERSITAS SUMATERA UTARA**

JL. Bioteknologi No.1 Kampus USU, Medan – 20155

Telp. 061 – 8223564 Fax. 061 – 8214290 E-mail. [nursaharapasaribu@yahoo.com](mailto:nursaharapasaribu@yahoo.com)

Medan, 05 Juni 2024

No. : 2440/MEDA/2024  
Lamp. : -  
Hal : Hasil Identifikasi

Kepada YTH,  
Sdr/i : Alya Rosandiyus Putri  
NIM : 2005002  
Instansi : Program Studi S1 Farmasi STIKes Indah Medan

Dengan hormat,  
Bersama ini disampaikan hasil identifikasi tumbuhan yang saudara kirimkan ke Herbarium Medanense, Universitas Sumatera Utara, sebagai berikut:  
Kingdom : Plantae  
Divisi : Spermatophyta  
Kelas : Dicotyledoneae  
Ordo : Sapindales  
Famili : Rutaceae  
Genus : Citrus  
Spesies : *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle  
Nama Lokal: Daun Jeruk Nipis

Demikian, semoga berguna bagi saudara.

Kepala Herbarium Medanense.

Prof. Dr. Etti Sartina Siregar S.Si., M.Si.  
NIP. 197211211998022001

**Lampiran 2.** Gambar tumbuhan daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*).



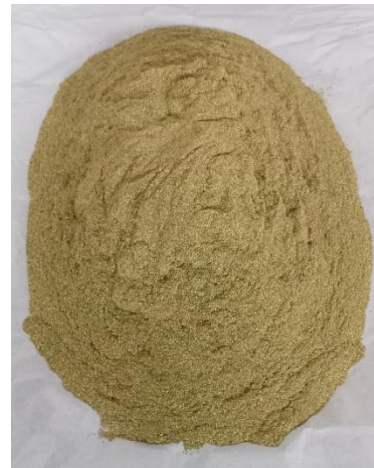
Pohon jeruk nipis



daun segar

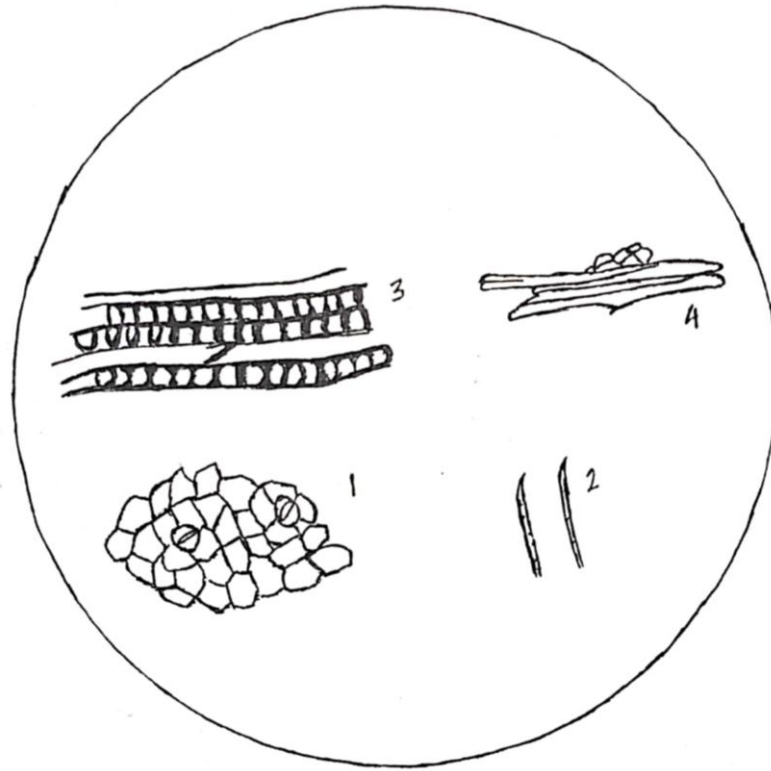


Simplisia daun jeruk nipis



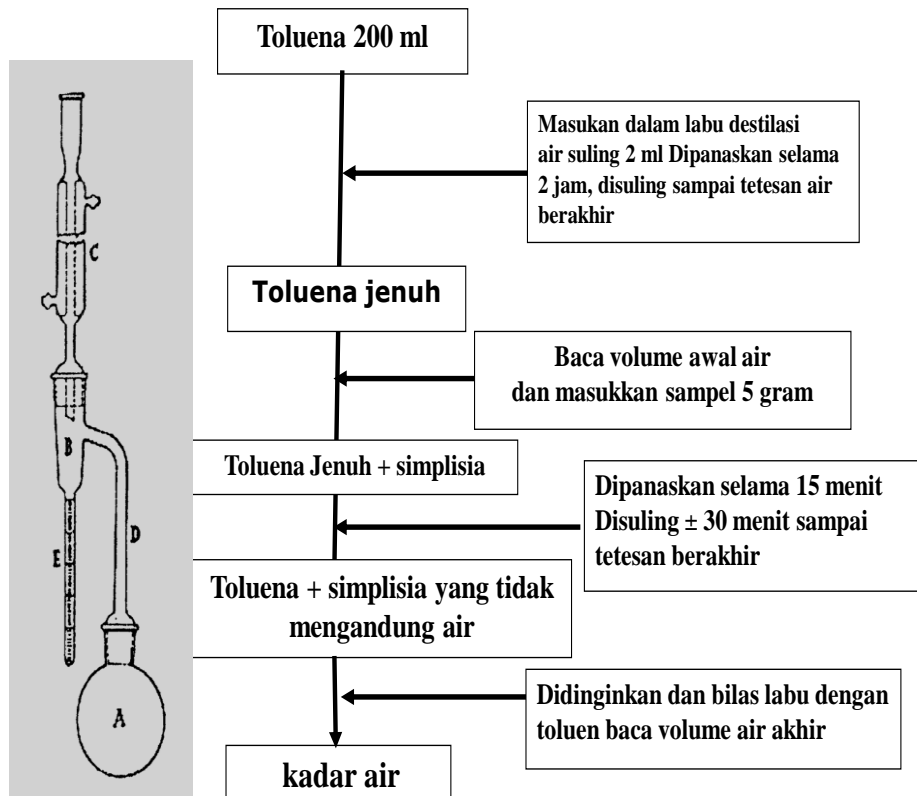
Serbuk simplisia daun jeruk nipis

**Lampiran 3.** Hasil pemeriksaan mikroskopik serbuk simplisia daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*).



Keterangan:

1. Stomata tipe parasitik
2. Rambut penutup
3. Berkas pembuluh bentuk bikolateral
4. Mesofil dengan serabut sklerenkim

**Lampiran 4. Cara kerja penetapan kadar air**

**Lampiran 5.** Hasil penetapan kadar air

## a. Sampel 1

Berat sampel = 5 gram

Volume 1 = 1,7 ml

Volume 2 = 2,1 ml

Volume air = 2,1 ml - 1,7 ml = 0,4 ml

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{\text{volume akhir} - \text{volume awal air (ml)}}{\text{Bobot simplisia}} \\ &= \frac{0,4}{5,00} \times 100\% = 8,00\% \end{aligned}$$

## b. Sampel 2

Berat sampel = 5 gram

Volume 1 = 1,7 ml

Volume 2 = 2,15 ml

Volume air = 2,15 ml - 1,7 ml = 0,45 ml

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{\text{volume akhir} - \text{volume awal air (ml)}}{\text{Bobot simplisia}} \\ &= \frac{0,45}{5,00} \times 100\% = 9,00\% \end{aligned}$$

## c. Sampel 3

Berat sampel = 5 gram

Volume 1 = 1,7 ml

Volume 2 = 2,00 ml

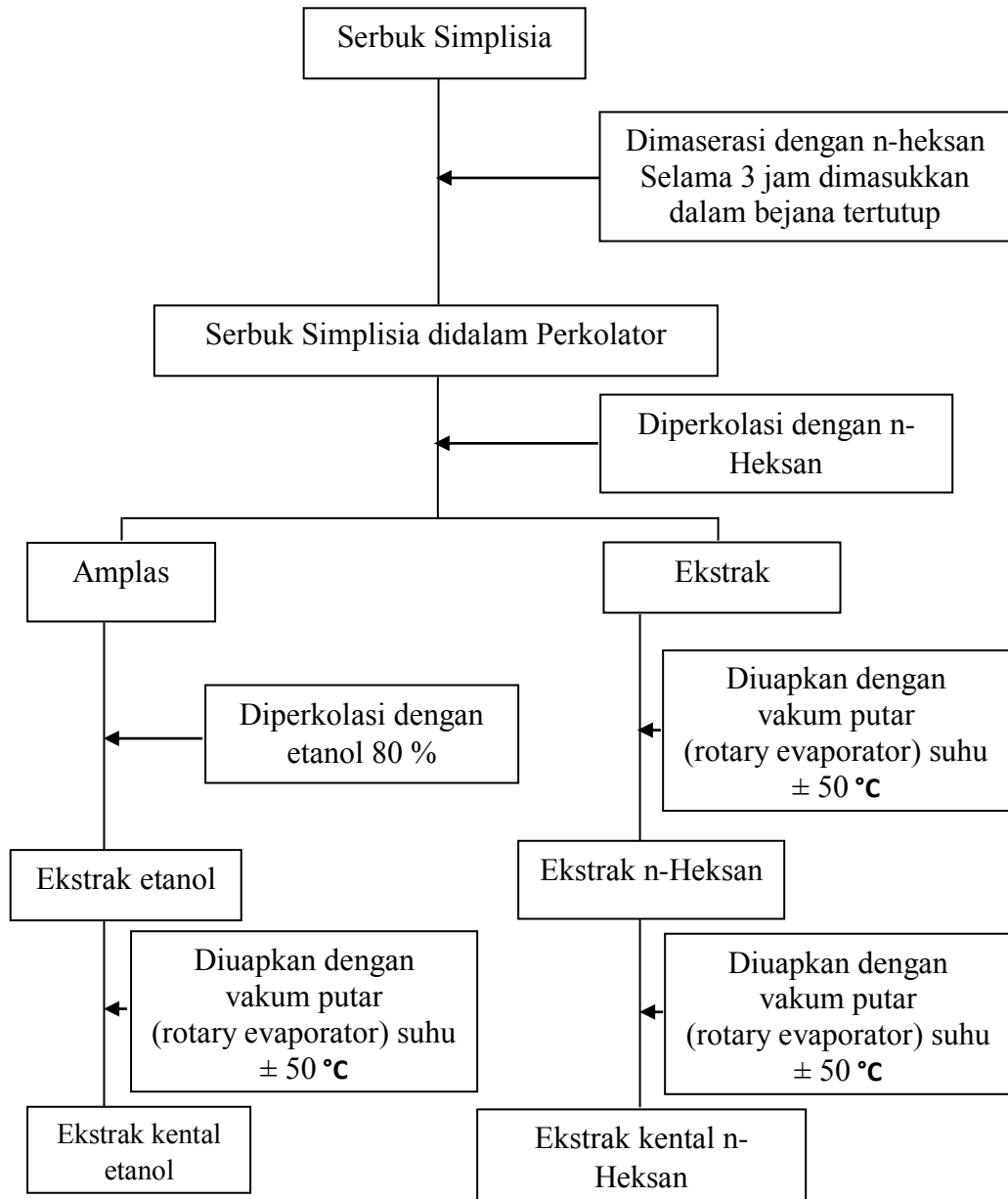
Volume air = 2,00 ml - 1,7 ml = 0,3 ml

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{\text{volume akhir} - \text{volume awal air (ml)}}{\text{Bobot simplisia}} \\ &= \frac{0,3}{5,00} \times 100\% = 6,00\% \end{aligned}$$

$$\text{Kadar air rata-rata} = \frac{\text{Sampel 1} + \text{sampel 2} + \text{sampel 3}}{3}$$

$$= \frac{8,00 \% + 9,00 \% + 6,00 \%}{3} = 7,6\%$$

**Lampiran 6.** Bagan pembuatan ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan daun jeruk nipis



**Lampiran 7.** Hasil ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan

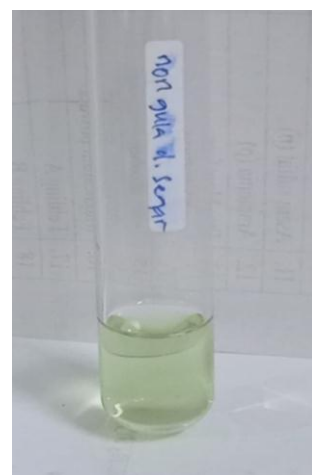
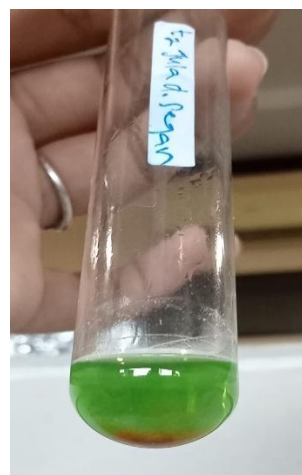
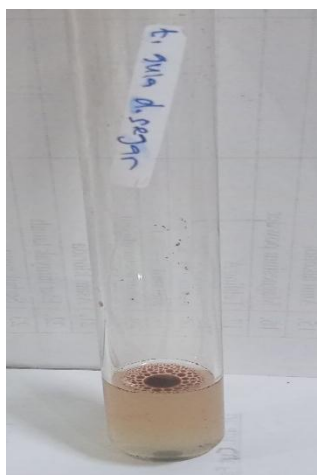
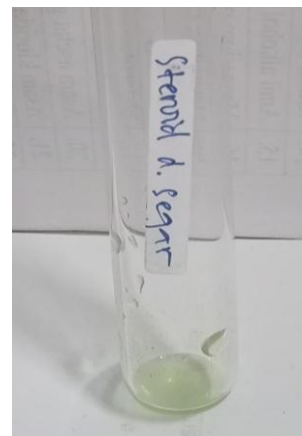
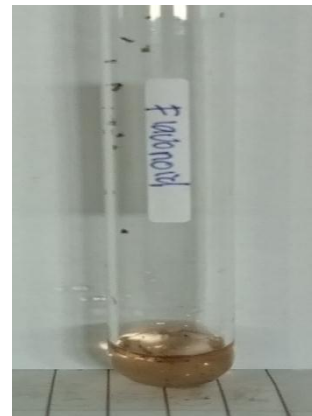
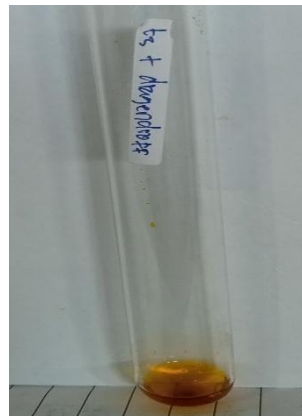
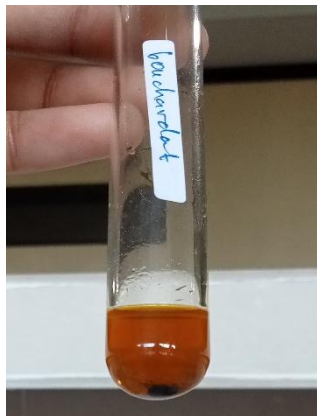


a. Rendemen ekstrak etanol

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Bobot akhir (gram)}}{\text{Bobot awal sampel (gram)}} \times 100\% \\ &= \frac{110 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 11\%\end{aligned}$$

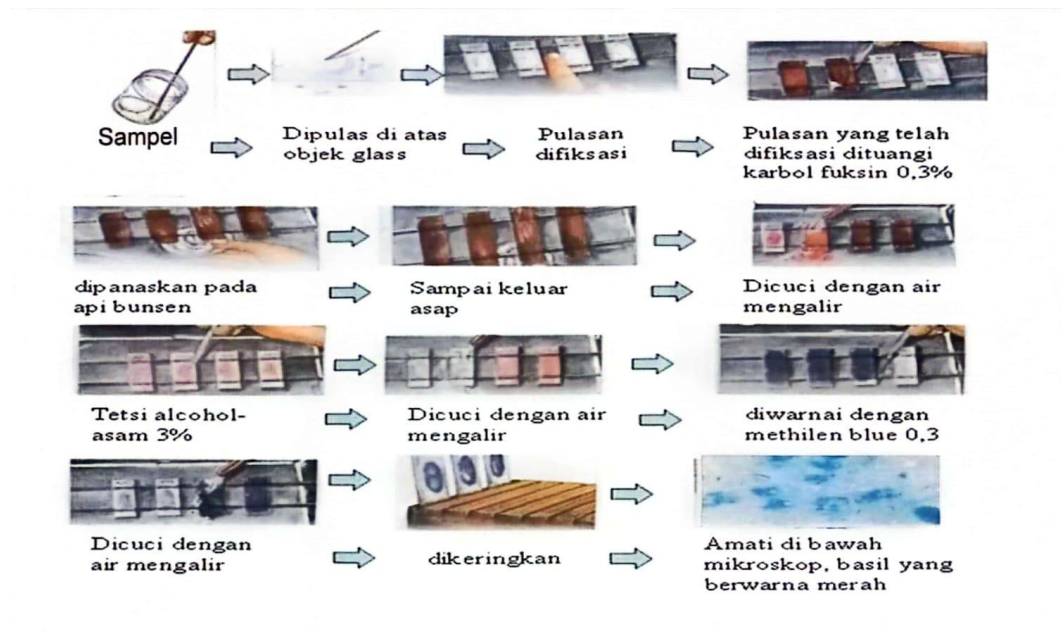
b. Rendemen ekstrak n-Heksan

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Bobot akhir (gram)}}{\text{Bobot awal sampel (gram)}} \times 100\% \\ &= \frac{15 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 1,5\%\end{aligned}$$

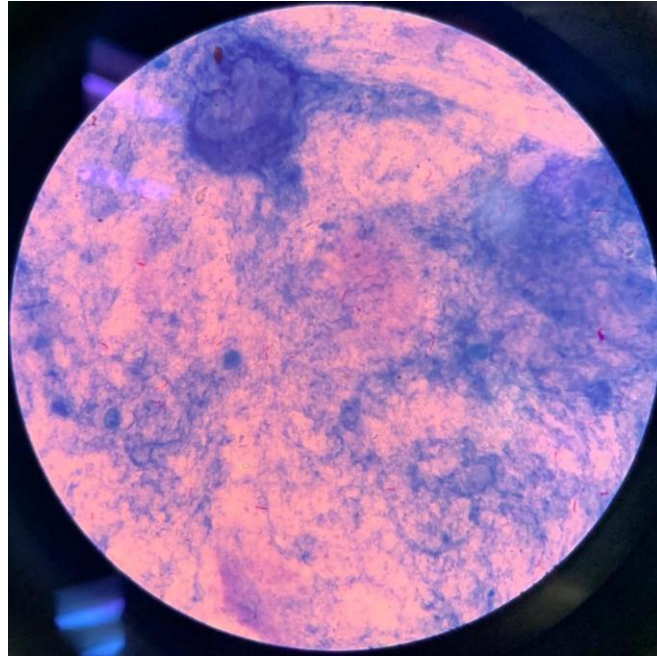
**Lampiran 8.** Hasil skrining fitokimia



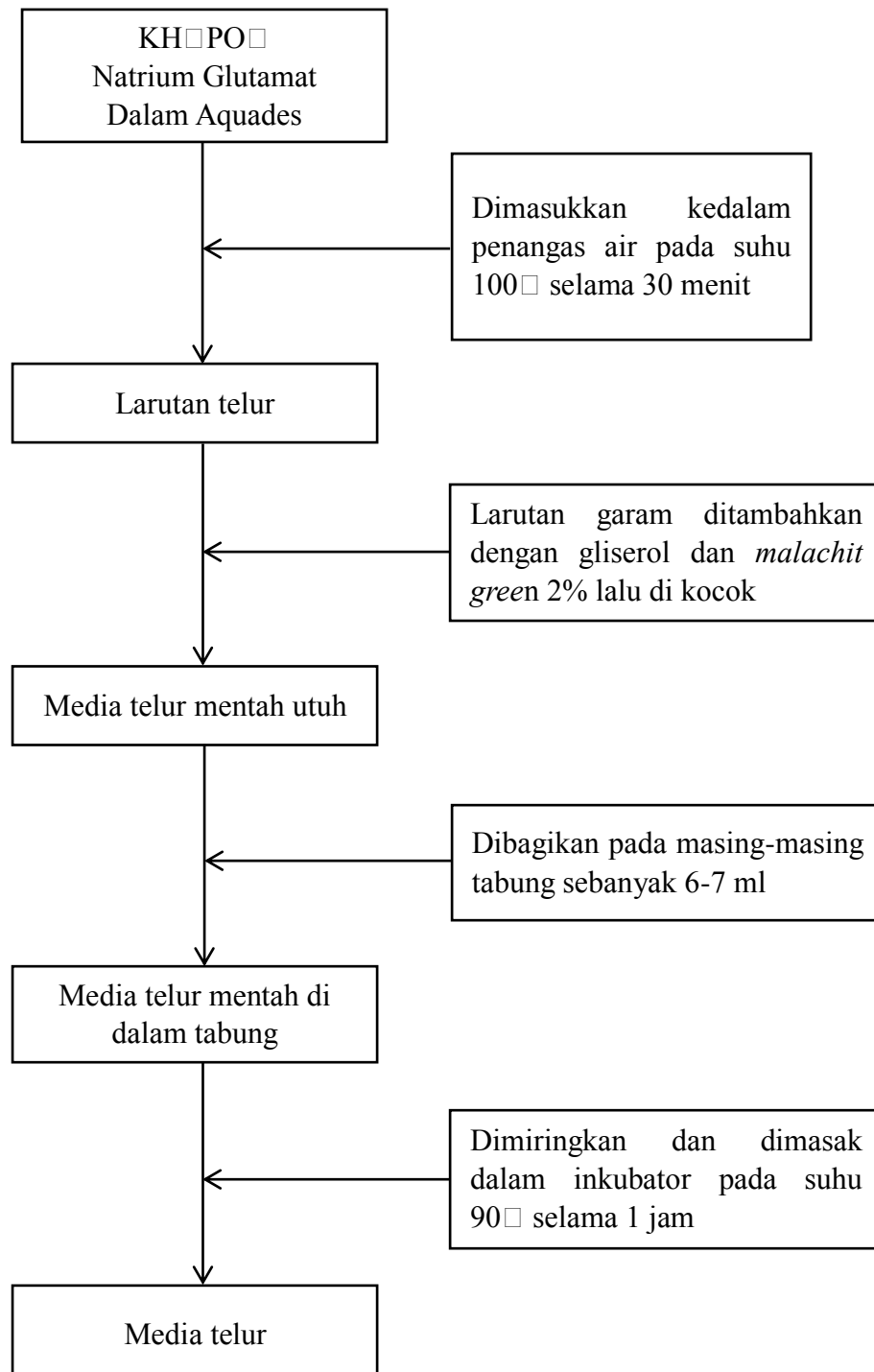
**Lampiran 9.** Prosedur kerja identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* pewarnaan Zeihl-Nelsen

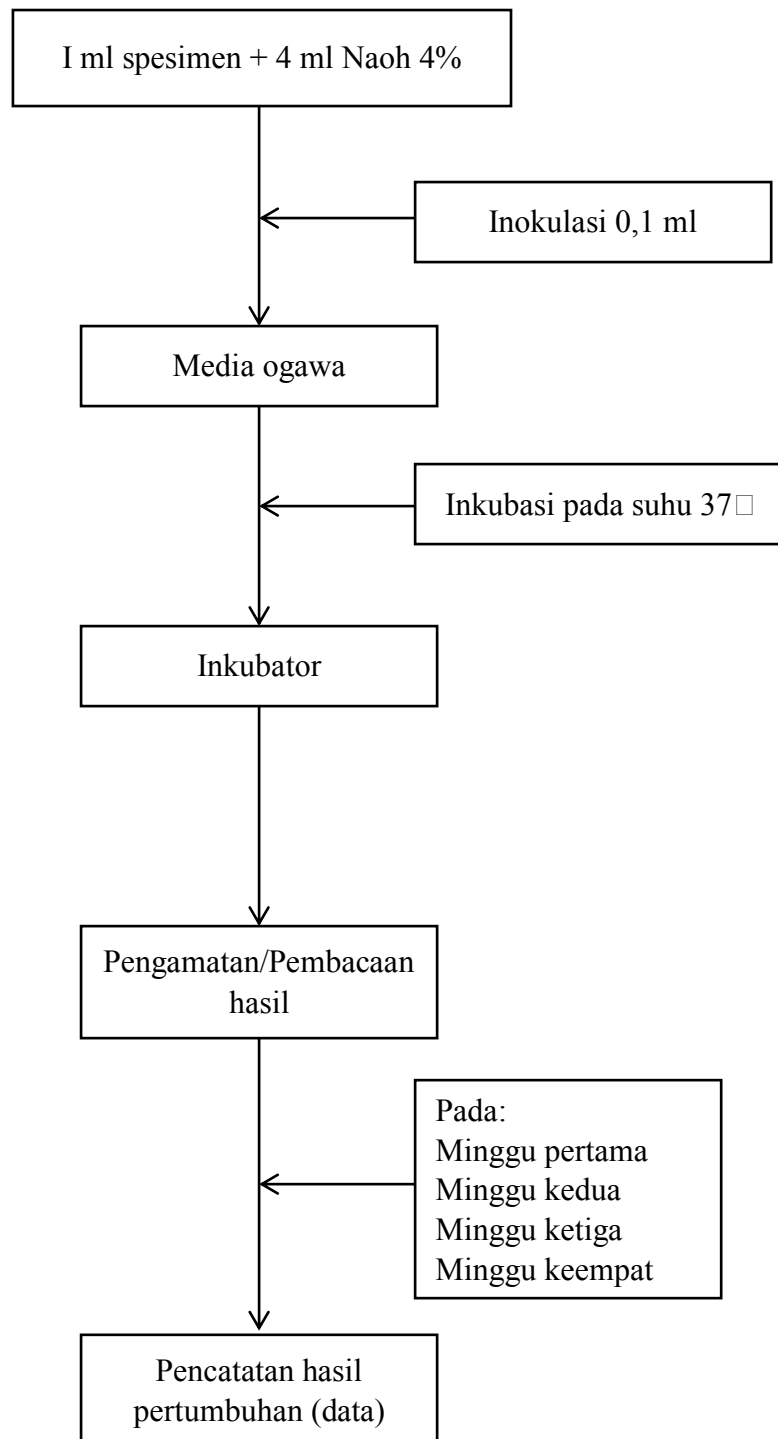


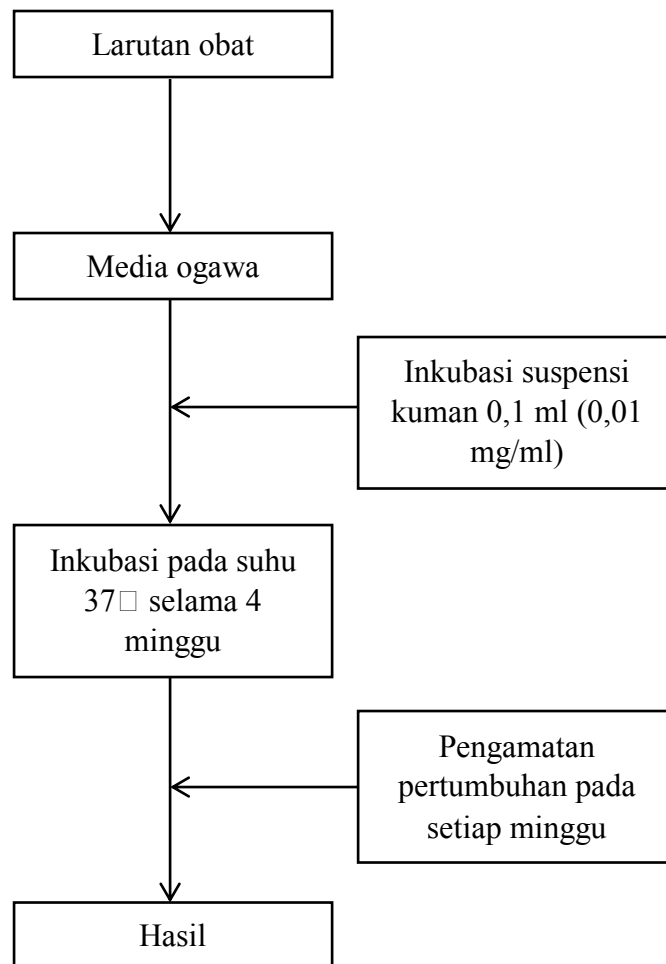
**Lampiran 10.** Hasil identifikasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*



**Lampiran 11.** Bagan kerja pembuatan pembenihan media telur

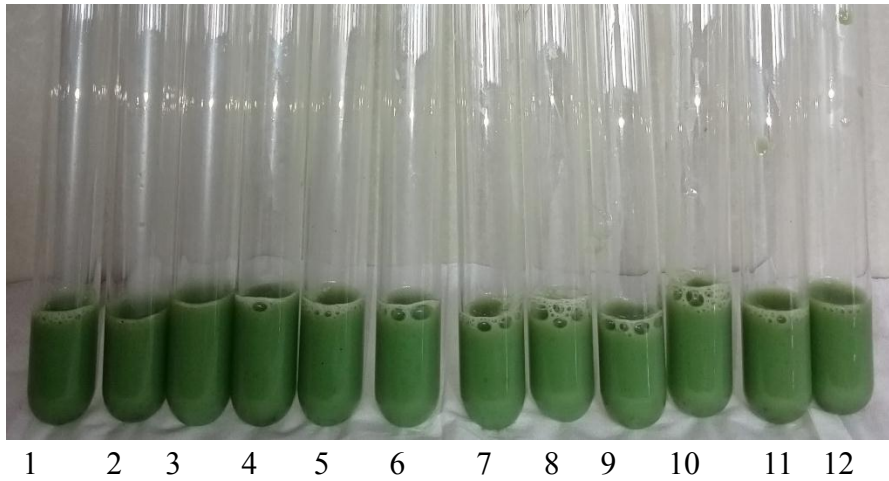


**Lampiran 12.** Bagan kerja pemeriksaan kultur isolasi/biakan

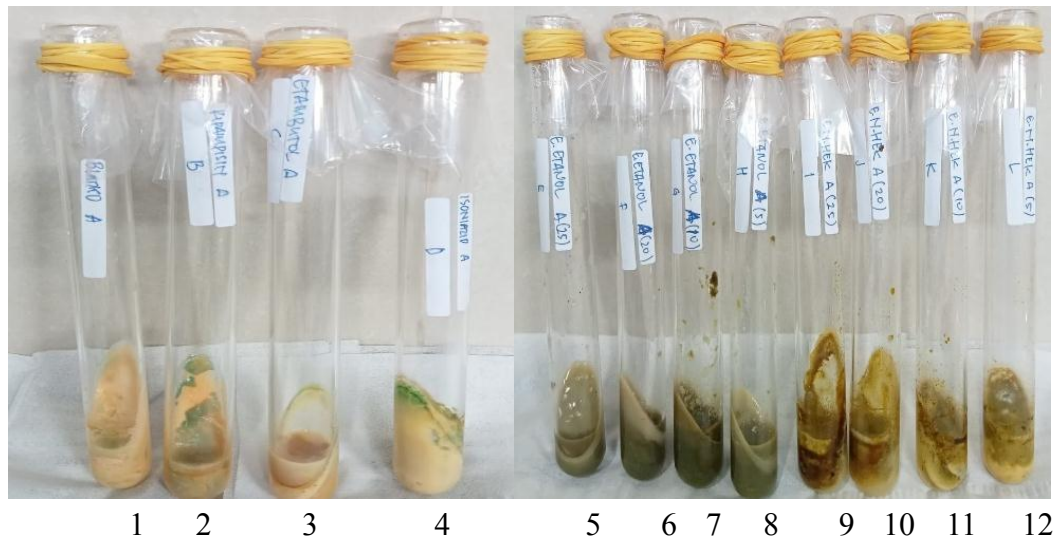
**Lampiran 13.** Bagan kerja tes kepekaan terhadap obat

**Lampiran 14.** Media LJ sebelum diberikan bahan uji dan spesimen sputum

*Tuberkulosis*



Hasil pengamatan spesimen A pada minggu ke-1 *in vitro* dalam media LJ terhadap *Mycobacterium tuberculosis*



Kete

rangan: RFP : Rifampisin

ETB : Etambutol

INH : Isoniazid

EEJN : Ekstrak etanol daun jeruk nipis

ENJN : Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis

1: Media kontrol/blanko pertumbuhan +4

2: Media kontrol RFP konsentrasi 40 µg/ml pertumbuhan +1

3: Media kontrol ETB konsentrasi 10 µg/ml pertumbuhan +1

4: Media kontrol INH konsentrasi 0,2 µg/ml pertumbuhan +1

5: Media kontrol EEJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan (-)

6: Media kontrol EEJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan (-)

7: Media kontrol EEJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan (-)

8: Media kontrol EEJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan (-)

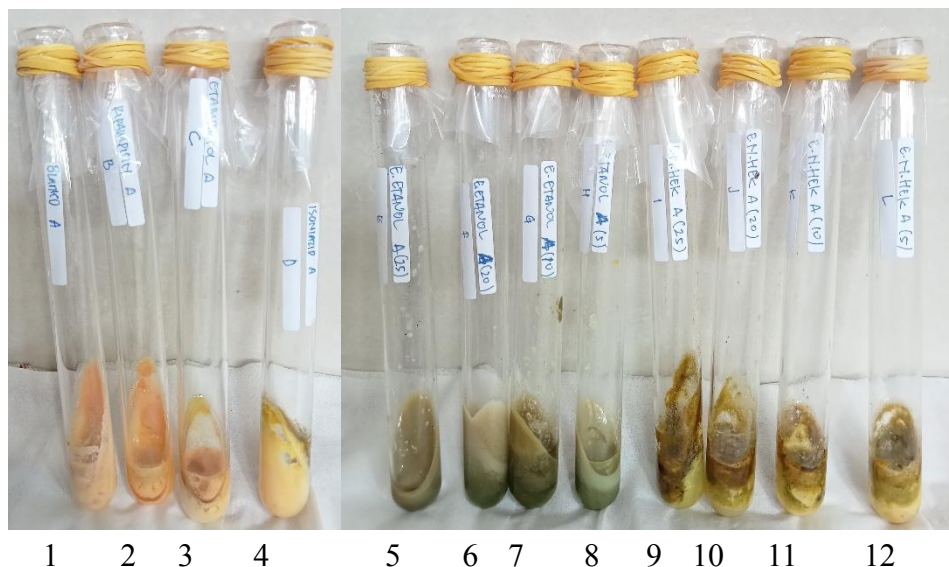
9: Media kontrol ENJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +3

10: Media kontrol ENJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +3

11: Media kontrol ENJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +3

12: Media kontrol ENJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +3

Hasil pengamatan spesimen A pada minggu ke-2 *in vitro* dalam media LJ terhadap *Mycobacterium tuberculosis*



Keterangan: RFP : Rifampisin

ETB : Etambutol

INH : Isoniazid

EEJN : Ekstrak etanol daun jeruk nipis

ENJN : Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis

1: Media kontrol/blanko pertumbuhan +4

2: Media kontrol RFP konsentrasi 40 µg/ml pertumbuhan +3

3: Media kontrol ETB konsentrasi 10 µg/ml pertumbuhan +3

4: Media kontrol INH konsentrasi 0,2 µg/ml pertumbuhan +3

5: Media kontrol EEJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +2

6: Media kontrol EEJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +2

7: Media kontrol EEJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +2

8: Media kontrol EEJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +2

9: Media kontrol ENJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +4

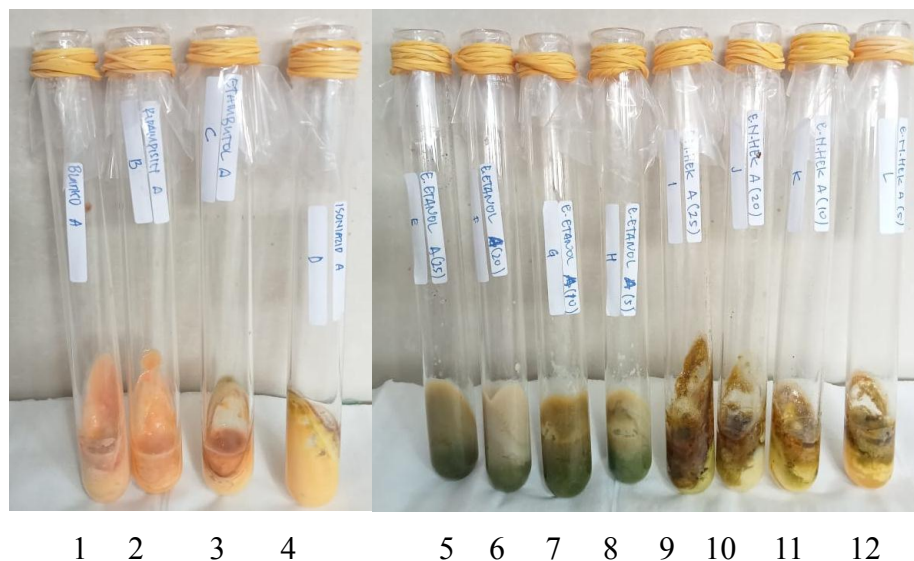
10: Media kontrol ENJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +4

11: Media kontrol ENJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +4

12: Media kontrol ENJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +4



Hasil pengamatan spesimen A pada minggu ke-3 *in vitro* dalam media LJ terhadap *Mycobacterium tuberculosis*



Keterangan: RFP : Rifampisin

ETB : Etambutol

INH : Isoniazid

EEJN : Ekstrak etanol daun jeruk nipis

ENJN : Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis

1: Media kontrol/blanko pertumbuhan +4

2: Media kontrol RFP konsentrasi 40 µg/ml pertumbuhan +4

3: Media kontrol ETB konsentrasi 10 µg/ml pertumbuhan +4

4: Media kontrol INH konsentrasi 0,2 µg/ml pertumbuhan +4

5: Media kontrol EEJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +3

6: Media kontrol EEJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +3

7: Media kontrol EEJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +3

8: Media kontrol EEJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +3

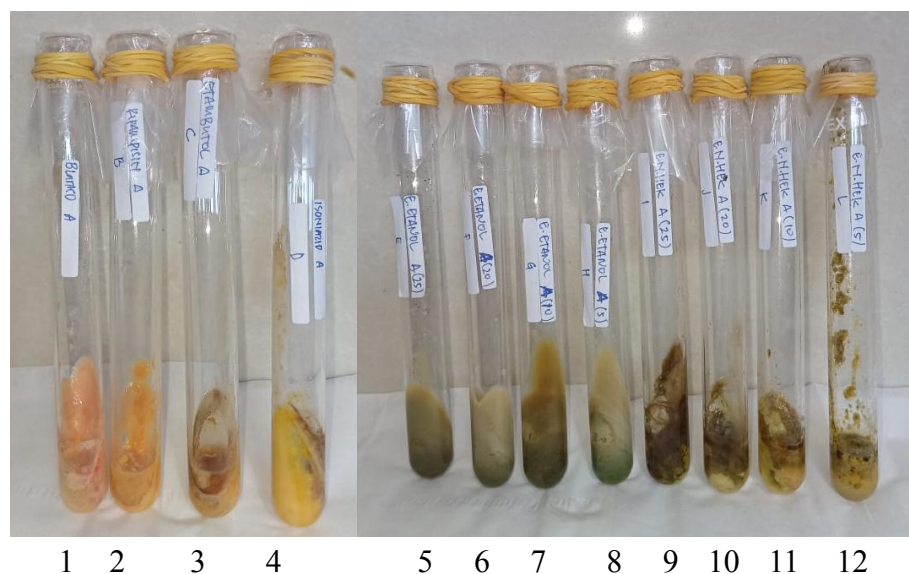
9: Media kontrol ENJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +4

10: Media kontrol ENJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +4

11: Media kontrol ENJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +4

12: Media kontrol ENJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +4

Hasil pengamatan spesimen A pada minggu ke-4 *in vitro* dalam media LJ terhadap *Mycobacterium tuberculosis*



Keterangan: RFP : Rifampisin

ETB : Etambutol

INH : Isoniazid

EEJN : Ekstrak etanol daun jeruk nipis

ENJN : Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis

1: Media kontrol/blanko pertumbuhan +4

2: Media kontrol RFP konsentrasi 40 µg/ml pertumbuhan +4

3: Media kontrol ETB konsentrasi 10 µg/ml pertumbuhan +4

4: Media kontrol INH konsentrasi 0,2 µg/ml pertumbuhan +4

5: Media kontrol EEJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +3

6: Media kontrol EEJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +3

7: Media kontrol EEJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +3

8: Media kontrol EEJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +3

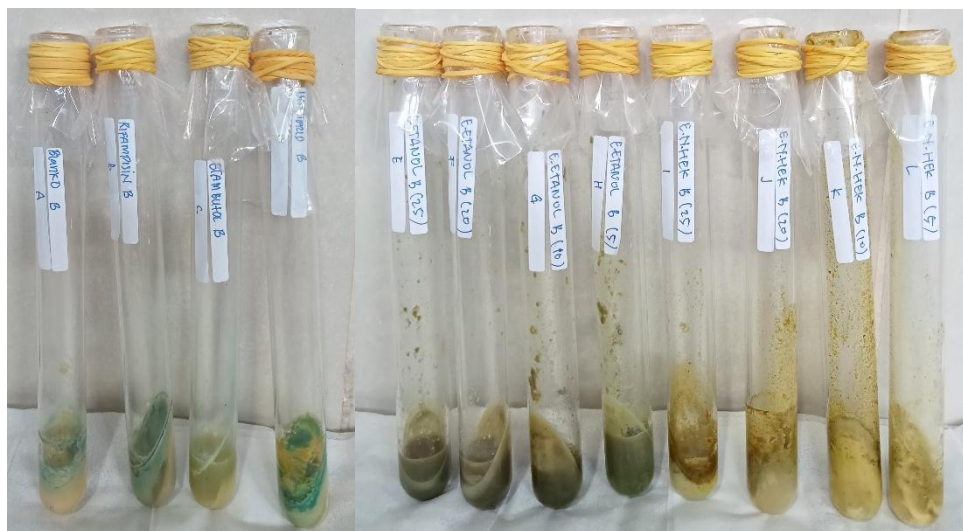
9: Media kontrol ENJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +4

10: Media kontrol ENJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +4

11: Media kontrol ENJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +4

12: Media kontrol ENJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +4

Hasil pengamatan spesimen B pada minggu ke-1 *in vitro* dalam media LJ terhadap *Mycobacterium tuberculosis*



Keterangan: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

angan:RFP : Rifampisin

ETB : Etambutol

INH : Isoniazid

EEJN : Ekstrak etanol daun jeruk nipis

ENJN : Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis

1: Media kontrol/blanko pertumbuhan +4

2: Media kontrol RFP konsentrasi 40 µg/ml pertumbuhan +1

3: Media kontrol ETB konsentrasi 10 µg/ml pertumbuhan +1

4: Media kontrol INH konsentrasi 0,2 µg/ml pertumbuhan +1

5: Media kontrol EEJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan (-)

6: Media kontrol EEJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan (-)

7: Media kontrol EEJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan (-)

8: Media kontrol EEJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan (-)

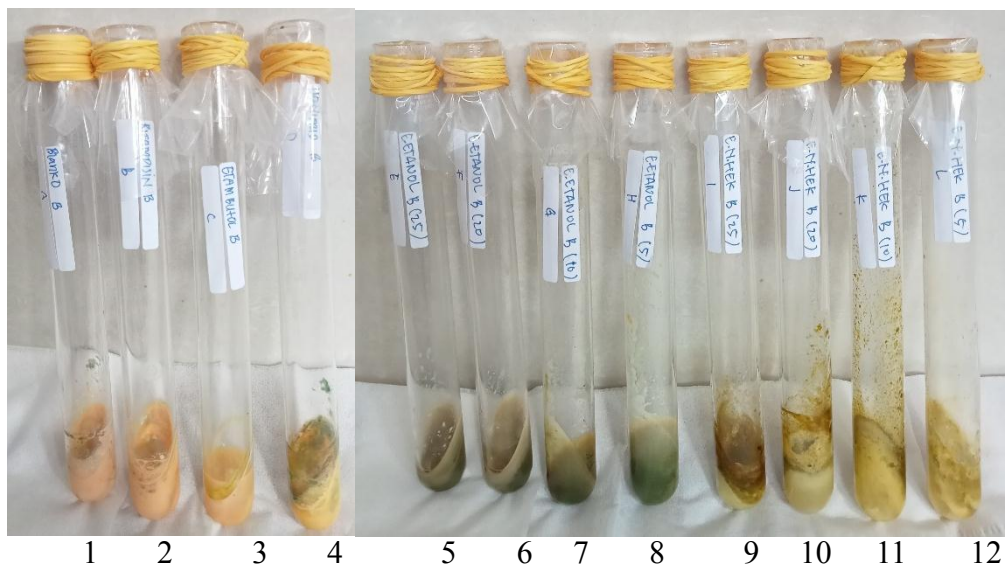
9: Media kontrol ENJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +3

10: Media kontrol ENJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +3

11: Media kontrol ENJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +3

12: Media kontrol ENJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +3

Hasil pengamatan spesimen B pada minggu ke-2 *in vitro* dalam media LJ terhadap *Mycobacterium tuberculosis*



Keter

angan:RFP : Rifampisin

ETB : Etambutol

INH : Isoniazid

EEJN : Ekstrak etanol daun jeruk nipis

ENJN : Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis

1: Media kontrol/blanko pertumbuhan +4

2: Media kontrol RFP konsentrasi 40 µg/ml pertumbuhan +3

3: Media kontrol ETB konsentrasi 10 µg/ml pertumbuhan +3

4: Media kontrol INH konsentrasi 0,2 µg/ml pertumbuhan +3

5: Media kontrol EEJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +2

6: Media kontrol EEJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +2

7: Media kontrol EEJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +2

8: Media kontrol EEJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +2

9: Media kontrol ENJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +4

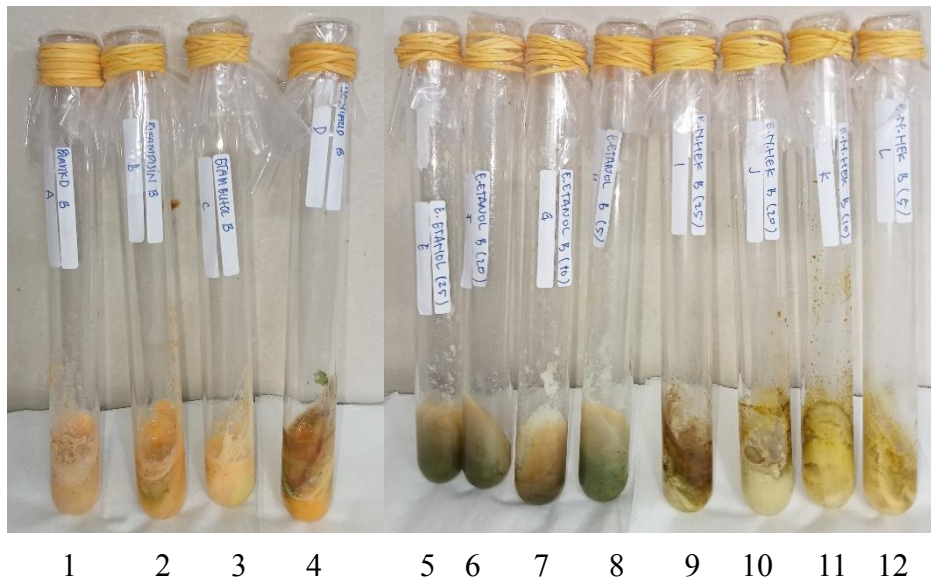
10: Media kontrol ENJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +4

11: Media kontrol ENJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +4

12: Media kontrol ENJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +4

Hasil pengamatan spesimen B pada minggu ke-3 *in vitro* dalam media LJ terhadap

*Mycobacterium tuberculosis*



Keterangan: RFP : Rifampisin

ETB : Etambutol

INH : Isoniazid

EEJN : Ekstrak etanol daun jeruk nipis

ENJN : Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis

1: Media kontrol/blanko pertumbuhan +4

2: Media kontrol RFP konsentrasi 40 µg/ml pertumbuhan +4

3: Media kontrol ETB konsentrasi 10 µg/ml pertumbuhan +4

4: Media kontrol INH konsentrasi 0,2 µg/ml pertumbuhan +4

5: Media kontrol EEJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +3

6: Media kontrol EEJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +3

7: Media kontrol EEJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +3

8: Media kontrol EEJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +3

9: Media kontrol ENJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +4

10: Media kontrol ENJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +4

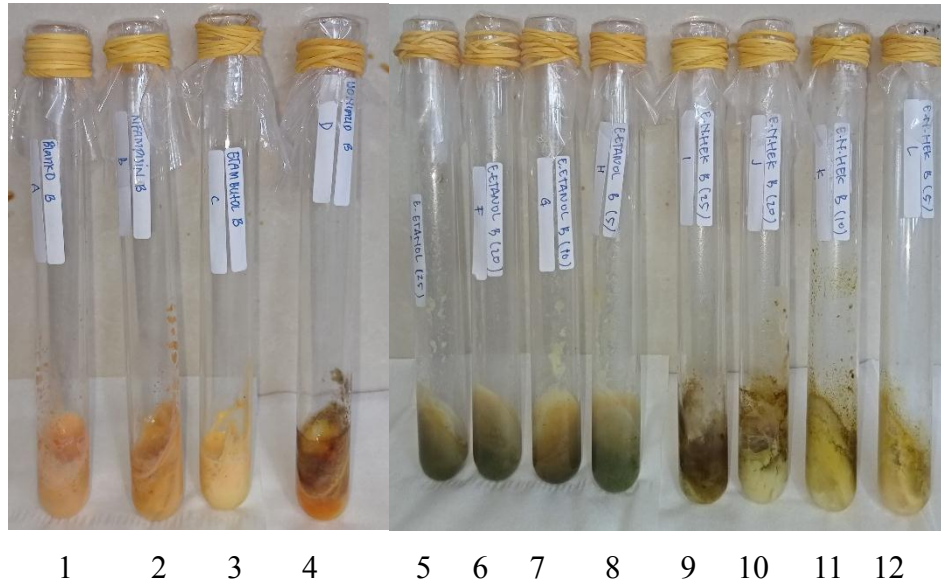
11: Media kontrol ENJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +4

12: Media kontrol ENJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +4



Hasil pengamatan spesimen B pada minggu ke-4 *in vitro* dalam media LJ terhadap

*Mycobacterium tuberculosis*



Keterangan:RFP : Rifampisin

ETB : Etambutol

INH : Isoniazid

EEJN : Ekstrak etanol daun jeruk nipis

ENJN : Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis

1: Media kontrol/blanko pertumbuhan +4

2: Media kontrol RFP konsentrasi 40 µg/ml pertumbuhan +4

3: Media kontrol ETB konsentrasi 10 µg/ml pertumbuhan +4

4: Media kontrol INH konsentrasi 0,2 µg/ml pertumbuhan +4

5: Media kontrol EEJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +3

6: Media kontrol EEJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +3

7: Media kontrol EEJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +3

8: Media kontrol EEJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +3

9: Media kontrol ENJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +4

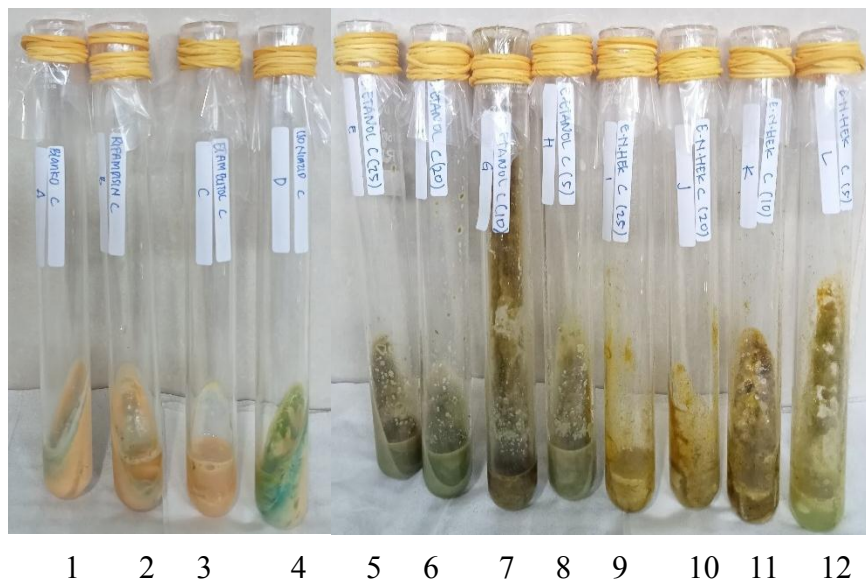
10: Media kontrol ENJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +4

11: Media kontrol ENJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +4

## 12: Media kontrol ENJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +4

Hasil pengamatan spesimen C pada minggu ke-1 *in vitro* dalam media LJ terhadap

*Mycobacterium tuberculosis*



Keterangan:RFP : Rifampisin

ETB : Etambutol

INH : Isoniazid

EEJN : Ekstrak etanol daun jeruk nipis

ENJN : Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis

1: Media kontrol/blanko pertumbuhan +4

2: Media kontrol RFP konsentrasi 40  $\mu\text{g/ml}$  pertumbuhan +1

3: Media kontrol ETB konsentrasi 10  $\mu\text{g/ml}$  pertumbuhan +1

4: Media kontrol INH konsentrasi 0,2  $\mu\text{g/ml}$  pertumbuhan +1

5: Media kontrol EEJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan (-)

6: Media kontrol EEJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan (-)

7: Media kontrol EEJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan (-)

8: Media kontrol EEJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan (-)

9: Media kontrol ENJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +3

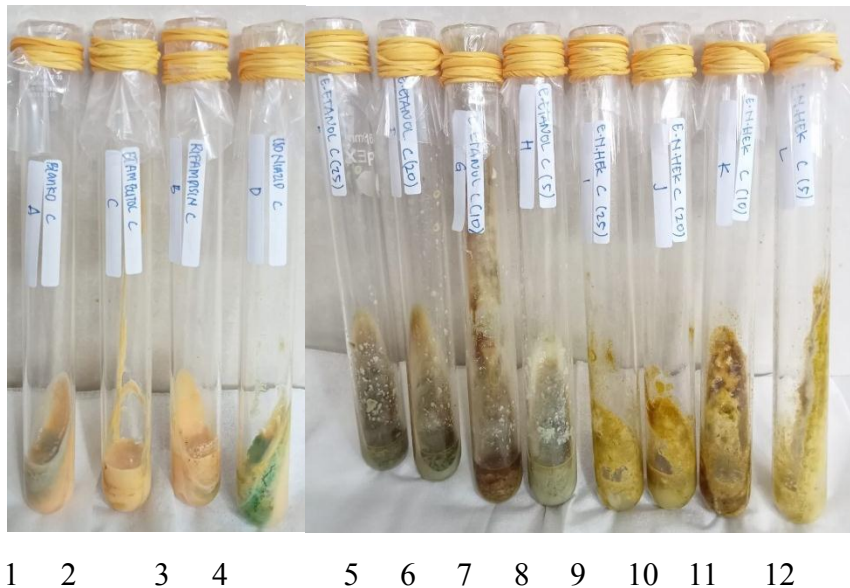
10: Media kontrol ENJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +3

11: Media kontrol ENJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +3

### 12: Media kontrol ENJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +3

Hasil pengamatan spesimen C pada minggu ke-2 *in vitro* dalam media LJ terhadap

*Mycobacterium tuberculosis*



Keterangan: RFP : Rifampisin

ETB : Etambutol

INH : Isoniazid

EEJN : Ekstrak etanol daun jeruk nipis

ENJN : Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis

1: Media kontrol/blanko pertumbuhan +4

2: Media kontrol RFP konsentrasi 40 µg/ml pertumbuhan +3

3: Media kontrol ETB konsentrasi 10 µg/ml pertumbuhan +3

4: Media kontrol INH konsentrasi 0,2 µg/ml pertumbuhan +3

5: Media kontrol EEJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +2

6: Media kontrol EEJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +2

7: Media kontrol EEJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +2

8: Media kontrol EEJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +2

9: Media kontrol ENJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +4

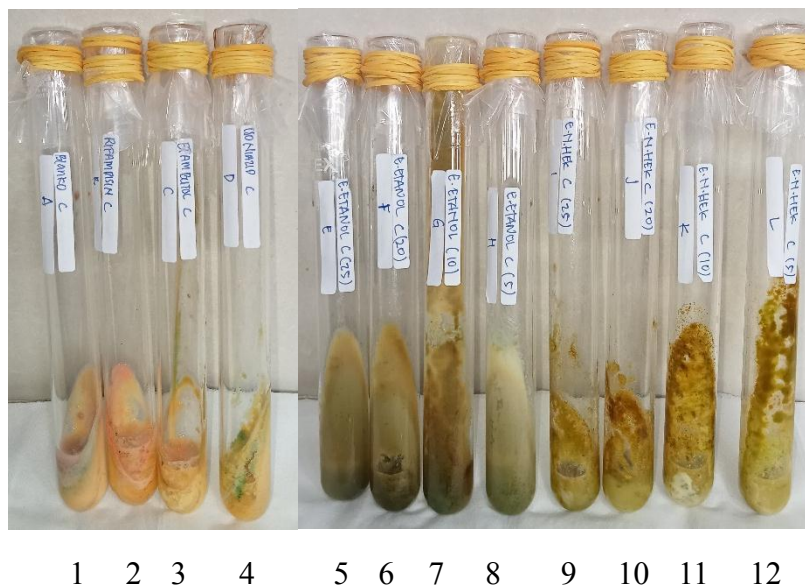
10: Media kontrol ENJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +4

11: Media kontrol ENJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +4

12: Media kontrol ENJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +4



Hasil pengamatan spesimen C pada minggu ke-3 *in vitro* dalam media LJ terhadap *Mycobacterium tuberculosis*



Keterangan: RFP : Rifampisin

ETB : Etambutol

INH : Isoniazid

EEJN : Ekstrak etanol daun jeruk nipis

ENJN : Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis

1: Media kontrol/blanko pertumbuhan +4

2: Media kontrol RFP konsentrasi 40 µg/ml pertumbuhan +4

3: Media kontrol ETB konsentrasi 10 µg/ml pertumbuhan +4

4: Media kontrol INH konsentrasi 0,2 µg/ml pertumbuhan +4

5: Media kontrol EEJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +3

6: Media kontrol EEJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +3

7: Media kontrol EEJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +3

8: Media kontrol EEJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +3

9: Media kontrol ENJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +4

10: Media kontrol ENJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +4

11: Media kontrol ENJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +4

12: Media kontrol ENJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +4

Hasil pengamatan spesimen C pada minggu ke-4 *in vitro* dalam media LJ terhadap *Mycobacterium tuberculosis*



Keterangan: RFP : Rifampisin

ETB : Etambutol

INH : Isoniazid

EEJN : Ekstrak etanol daun jeruk nipis

ENJN : Ekstrak n-heksan daun jeruk nipis

1: Media kontrol/blanko pertumbuhan +4

2: Media kontrol RFP konsentrasi 40 µg/ml pertumbuhan +4

3: Media kontrol ETB konsentrasi 10 µg/ml pertumbuhan +4

4: Media kontrol INH konsentrasi 0,2 µg/ml pertumbuhan +4

5: Media kontrol EEJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +3

6: Media kontrol EEJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +3

7: Media kontrol EEJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +3

8: Media kontrol EEJN konsentrasi 5 mg/ml pertumbuhan +3

9: Media kontrol ENJN konsentrasi 25 mg/ml pertumbuhan +4

10: Media kontrol ENJN konsentrasi 20 mg/ml pertumbuhan +4

11: Media kontrol ENJN konsentrasi 10 mg/ml pertumbuhan +4

12: Media kontrol ENJN konsentrasi 5 mg/m