

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Infeksi merupakan penyakit yang sering terjadi di daerah tropis seperti Indonesia karena keadaan udara yang banyak berdebu, temperatur yang hangat dan lembab sehingga mikroba dapat tumbuh subur. Keadaan tersebut didukung dengan kemudahan transportasi dan keadaan sanitasi yang buruk lebih memudahkan penyakit infeksi semakin berkembang (Wattimena dkk., 1991).

Pengobatan infeksi yang paling umum dilakukan adalah dengan terapi antibiotik. Antibiotik adalah suatu substansi kimia yang diperoleh atau dibentuk dan dihasilkan oleh mikroorganisme. Zat atau substansi tersebut dalam jumlah yang sedikit pun masih mempunyai daya hambat terhadap kegiatan mikroorganisme lainnya (Waluyo, 2004). *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dan *Escherichia coli* (*E. coli*) adalah contoh bakteri yang dapat menyebabkan infeksi.

S. aureus merupakan patogen penyebab penyakit seperti bisul dan beberapa infeksi lainnya (radang paru-paru, radang kelenjar dada, radang urat darah, meningitis, saluran kencing osteomyelitis, dan endocarditis). Infeksi *S. aureus* menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu peradangan, nekrosis, dan pembentukan abses. Sedangkan *E. coli* dapat menyebabkan infeksi primer pada usus (Warsa, 1994).

Penggunaan antibiotik secara besar-besaran untuk terapi profilaksis adalah faktor utama terjadinya resistensi. Banyak strain dari *Pneumococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, dan *Tuberculosis* telah resisten terhadap beberapa

antibiotik, termasuk *Klebsiella* dan *Pseudomonas aeruginosa* juga telah bersifat multiresisten. Dengan berkembangnya populasi bakteri yang resisten, maka antibiotik yang pernah efektif untuk mengobati penyakit tertentu kehilangan nilai kemoterapeutiknya. Sejalan dengan hal tersebut, jelas bahwa ada kebutuhan yang terus-menerus untuk mengembangkan obat-obat baru dan berbeda untuk menggantikan obat-obat yang sudah tidak efektif (Pelczar dan Chan, 1988). Beberapa usaha untuk mengembangkan obat-obat baru salah satunya dengan pemanfaatan tanaman di sekitar kita maupun melalui daur ulang suatu limbah sehingga menjadi produk yang bermanfaat.

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Kulit buah jeruk biasanya hanya dibuang sebagai sampah, yang saat ini menjadi salah satu masalah di kota-kota besar. Untuk mengatasi masalah sampah, salah satu upaya yang biasa dilakukan adalah mengolah atau mendaur-ulang sampah menjadi produk atau bahan yang berguna, seperti sampah organik menjadi pupuk kompos serta sampah plastik menjadi peralatan rumah tangga. Dari proses pengolahan jeruk ini dihasilkan limbah kulit jeruk yang biasanya dibuang begitu saja. Padahal limbah kulit jeruk ini dapat diolah untuk menghasilkan produk bernilai tinggi untuk keperluan kesehatan dan lainnya. Kulit jeruk banyak mengandung zat-zat seperti fenol, flavonoid, dan pektin. Pektin bermanfaat bagi kesehatan tubuh karena dapat menurunkan kolesterol dan gula darah. Flavonoid dalam jeruk juga bermanfaat sebagai antioksidan. Bahan aktif yang berperan terutama senyawa limonen yang dikandung dalam minyak atsiri kulit jeruk. Limonen berfungsi melancarkan

peredaran darah, meredakan radang tenggorokan dan batuk, dan bahkan bisa menghambat pertumbuhan sel kanker (Anonim, 2008^a).

Berbagai penelitian menyatakan bahwa tanaman jeruk memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. Berdasarkan penelitian Tao *et al.* (2009) minyak atsiri kulit jeruk manis memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Penicillium chrysogenum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Saccharomyces cerevisiae* dengan zona hambat berkisar antara 14,57 mm - 23,37 mm dan MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) berkisar antara 4,66 μLmL^{-1} – 18,75 μLmL^{-1} . Selain itu pada penelitian Ghasemi *et al.* (2009) pada ekstrak metanol dari 13 spesies kulit jeruk dengan menggunakan metode DPPH menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} antara 0,6-3,8 mg/mL. Berdasarkan penelitian tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi antibakteri dari *Citrus sinensis* (L.) Osbeck dengan menggunakan ekstrak etanol kulit jeruk manis.

Selain itu untuk lebih mengetahui potensi lain dari ekstrak tersebut dilakukan uji toksisitas. Metode uji toksisitas ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BST). Metode BST dapat dilakukan dengan tepat, cepat, dan murah. Metode ini menggunakan hewan uji *Artemia salina* Leach. Lebih dari itu, uji larva udang ini juga dapat digunakan untuk skrining awal terhadap senyawa-senyawa yang diduga berkhasiat sebagai anti tumor. Dengan kata lain, uji ini seringkali mempunyai korelasi yang positif dengan potensinya sebagai anti tumor (Anderson dkk., 1991). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*

(L.) Osbeck) untuk membuktikan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* multiresisten dan *Staphylococcus aureus* multiresisten dan uji toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach serta mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalamnya.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut:

1. Berapa Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol kulit buah jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* multiresisten?
2. Senyawa apa yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit buah jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) yang memiliki aktivitas antibakteri?
3. Berapa nilai LC₅₀ ekstrak etanol kulit buah jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) terhadap *Artemia salina* Leach?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah di atas maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum ekstrak etanol kulit buah jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* multiresisten.
2. Untuk mengetahui komponen yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit buah jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* multiresisten.

3. Untuk mengetahui nilai LC_{50} ekstrak etanol kulit buah jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) terhadap *Artemia salina* Leach.

D. Tinjauan Pustaka

1. Jeruk manis

a. Sistematika

Tanaman jeruk manis dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Sapindales
Famili	: Rutaceae
Genus	: Citrus
Spesies	: <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck (Anonim, 2008 ^b)

b. Deskripsi

Tanaman jeruk manis merupakan pohon kecil, perdu atau semak besar, ketinggian 2-15 m, dengan batang atau ranting berduri panjang tetapi tidak rapat. Daun hijau abadi dengan tepi rata, tunggal, permukaan biasanya licin dan agak berminyak. Bunga tunggal atau dalam kelompok, lima mahkota bunga (kadang-kadang empat) berwarna putih atau kuning pucat, stamen banyak, seringkali

sangat harum. Buah bertipe semacam buah buni, membulat atau seperti tabung, ukuran bervariasi dengan diameter 2-30cm tergantung jenisnya; kulit buah biasanya berdaging dengan minyak atsiri yang banyak (Anonim, 2010^a).

c. Kandungan dan manfaatnya

Jeruk manis mengandung vitamin C yang mampu menambah daya tahan tubuh. Kulit jeruknya mengandung minyak atsiri salah satunya yaitu limonen yang dapat meningkatkan peredaran darah, meringankan rasa sakit akibat radang tenggorokan dan batuk, serta dapat menghalangi berkembang biaknya sel kanker dalam tubuh. Selain limonen, kulit jeruk juga mengandung linalol, linalil dan terpinol yang berkhasiat sebagai penenang. Kandungan sitronela dalam kulit jeruk berguna sebagai anti nyamuk (Anonim, 2010^b).

Berdasarkan Tao *et al.* (2009) komposisi kimia minyak atsiri yang diperoleh dari kulit jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) dianalisis dengan kromatografi gas dan kromatografi gas/spektrometer massa (GC / MS), dua puluh tujuh komponen telah teridentifikasi. Sembilan puluh enam koma nol tiga persen w/w terdiri dari monoterpen dan seskuiterpen hidrokarbon yang terdiri dari limonen (77,49%), mirsin (6,27%), α -farnesen (3,64%), γ -terpinen (3,34%), α -pinen (1,49%), sabinen (1,29%). Uji aktivitas antibakteri secara difusi cakram menunjukkan bahwa minyak atsiri jeruk manis memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Penicillium chrysogenum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Saccharomyces cerevisiae*, dengan zona hambatan berkisar antara 14,57 mm - 23,37 mm dan MIC berkisar antara 4,66 μLmL^{-1} - 18,75 μLmL^{-1} .

Selain itu, pada penelitian Bryan *et al.* (2008) menyebutkan bahwa minyak atsiri dari 7 spesies jeruk memiliki aktivitas anti mikroba terhadap *Salmonella* spp. dengan MIC 1%. Analisis komposisi minyak atsiri secara kromatografi gas – spektrometri gas (GC/MS) terdiri dari d-limonen 94% dan myrcene 3%. Ekstrak air dan ekstrak etanol daun jeruk manis (*Citrus sinensis*) dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri (Ekwenye *et al.*, 2010). Berdasarkan metode difusi disk agar, ekstrak air daun jeruk manis terhadap *E. coli* pada diameter 7 mm, sedangkan pada *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Staphylococcus aureus* terdapat zona hambat antara 0-3 mm, sedangkan pada ekstrak etanol menunjukkan adanya zona hambat yang kecil antara 1-3 mm pada semua bakteri.

Berdasarkan penelitian Ghasemi *et al.* (2009) pada ekstrak metanol dari 13 spesies kulit jeruk dengan menggunakan metode DPPH menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} antara 0,6-3,8 mg/mL. Kandungan fenol (berdasarkan metode Folin Ciocalteu) bervariasi dari 66,5-396,8 mg setara asam galat/g ekstrak dan kandungan flavonoid (berdasarkan metode $AlCl_3$ kolorimetri) antara 0,3-31,1 setara kuersetin mg/g ekstrak. Fraksi etil asetat kulit jeruk manis dengan metode DPPH, *Luminol Induced Chemiluminescence* methods dan *Folin Ciocalteu* method menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dengan kadar fenolik dan flavonoid total yang tinggi (Anagnostopoulou *et al.*, 2004).

Selain memiliki aktivitas antibakteri, berbagai penelitian tentang jeruk menyebutkan bahwa jeruk dapat untuk menghambat pertumbuhan sel kanker. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Stahl dan Sies (1995) menyebutkan bahwa kandungan senyawa dalam jeruk memiliki kemampuan untuk menghambat

oksidasi pada tahap progresi dalam karsinogenesis. Selain itu, Levy *et al.* (1995) menyatakan bahwa senyawa dalam jeruk bali mampu menghambat pertumbuhan dari sel kanker prostat, endometrial dan otak. Salah satu senyawa dalam jeruk yang diduga berperan dalam pengobatan tersebut adalah likopen (Bohm *et al.*, 1995). Selain jeruk bali, jeruk purut (*Citrus hystrix*) telah diteliti memiliki *antipromoting activity* pada aktivasi virus Epstein-Barr (EBV) terinduksi *tumor promoting agent* (Tiwawech *et al.*, 2000), juga dapat mengurangi viabilitas sel secara *in vitro* pada pemaparan cahaya 9.6 J/cm^2 (Ong *et al.*, 2009). Kandungan gliseroglikolipidnya terbukti sebagai inhibitor aktivitas *tumor promoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* pada kulit tikus yang poten (Murakami *et al.*, 1999).

2. Metode penyarian

Ekstrak adalah sediaan yang dapat berupa kering, kental, dan cair, dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang sesuai, di luar pengaruh cahaya matahari secara langsung. Penyarian adalah kegiatan penarikan zat yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Penyarian disamping memperhatikan sifat fisik simplisia dan sifat zat aktifnya, juga harus memperhatikan zat-zat yang terdapat dalam simplisia seperti protein, karbohidrat, dan lemak. Ada beberapa metode ekstraksi untuk penyarian diantaranya adalah maserasi, perkolasi, sokhletasi, dan infundasi (Anonim, 1986). Pada penelitian ini digunakan metode maserasi.

Maserasi merupakan proses penyarian yang paling sederhana dan banyak digunakan untuk menyari bahan obat yang berupa serbuk simplisia yang halus.

Simplisia ini direndam dalam penyari sampai meresap dan melemahkan susunan sel sehingga zat-zat akan terlarut. Serbuk simplisia yang akan disari ditempatkan dalam wadah atau bejana bermulut besar, ditutup rapat kemudian dikocok berulang-ulang sehingga memungkinkan pelarut masuk ke seluruh permukaan serbuk simplisia. Maserasi biasanya dilakukan pada temperatur 15⁰-20⁰C dalam waktu selama 3 hari sampai bahan-bahan yang larut, melarut (Ansel, 1989).

Maserasi dapat pula dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok ke dalam bejana, lalu dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil berulang-ulang diaduk, sari kemudian diserkai, ampas diperas, kemudian dicuci dengan cairan penyari secukupnya sehingga diperoleh 100 bagian. Keuntungan dari cara ini adalah pekerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugian dari cara ini adalah dibutuhkan waktu yang lama (Voigt, 1995).

Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap, dan tidak mudah terbakar, selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, tidak mempengaruhi zat berkhasiat dan diperbolehkan oleh peraturan (Anonim, 1986).

3. *Staphylococcus aureus*

Sistematika dari *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut :

Divisi : Protophyta

Kelas : Schizomycetes

Bangsa : Eubacteriales
Suku : Micrococcaceae
Marga : Staphylococcus
Jenis : *Staphylococcus aureus* (Salle, 1961).

Staphylococcus aureus mudah tumbuh pada kebanyakan pembenihan bakteriologi dalam keadaan aerobik atau mikroaerobik, tumbuh paling cepat pada suhu kamar 37⁰C, paling baik membentuk pigmen pada suhu kamar (20⁰C) dan pada media dengan pH 7,2-7,4 koloni pada pembenihan padat berbentuk bulat, halus menonjol dan berkilau-kilau membentuk pigmen (Jawetz *et al.*, 1991). *Staphylococcus aureus* berbentuk sferis, bila menggerombol dalam susunannya agak rata karena tertekan. Diameter kuman antara 0,8-1,0 mikron. Susunan gerombolan tidak teratur ditemukan pada sediaan yang dibuat dari pembenihan padat, sedangkan dari pembenihan kaldu biasanya ditemukan tersendiri atau tersusun sebagai rantai pendek (Karsinah dkk., 1994).

Setiap jaringan atau alat tubuh dapat diinfeksi oleh bakteri *Staphylococcus aureus* dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda khas, yaitu peradangan dan pembentukan abses (Karsinah dkk., 1994). *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan pneumonia, meningitis, endokarditis, dan infeksi kulit (Jawetz *et al.*, 2001).

4. *Escherichia coli*

Sistematika dari *Escherichia coli* adalah sebagai berikut :

Divisio : Protophyta
Subdivisio : Schizomycetea

Kelas : Schizomycetes
Ordo : Eubacteriales
Familia : Enterobacteriaceae
Genus : Escherichia
Spesies : *Escherichia coli* (Salle, 1961).

Escherichia coli berbentuk batang, Gram negatif, fakultatif aerob tumbuh baik pada media sederhana. *Escherichia coli* dapat melakukan fermentasi laktosa dan glukosa, serta menghasilkan gas. Bakteri ini merupakan flora normal, hidup di dalam kolon manusia dan diduga membantu pembuatan vitamin K yang penting untuk pembekuan darah, serta dapat digunakan untuk menilai tentang baik tidaknya persediaan air untuk keperluan rumah tangga. Biakan *Escherichia coli* berupa koloni berwarna merah pada agar Mac Conkey yang menunjukkan bahwa basil memfermentasi laktosa dan bersifat non patogen di dalam usus (Gibson, 1996).

Escherichia coli banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal, tetapi bila kesehatan menurun, bakteri ini dapat bersifat patogen terutama akibat toksin yang dihasilkan. *E. coli* umumnya tidak menyebabkan penyakit bila masih berada dalam usus, tetapi dapat menyebabkan penyakit pada saluran kencing, paru, saluran empedu, dan saluran otak (Jawetz *et al.*, 2001). *E. coli* dapat menyebabkan penyakit seperti diare, infeksi saluran kemih, pneumonia, meningitis pada bayi yang baru lahir dan infeksi luka (Anonim, 1994).

5. Antibakteri

Antibakteri adalah obat pembasmi bakteri khususnya bakteri yang merugikan manusia. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada bakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri dan ada yang bersifat membunuh bakteri. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat menjadi bakterisida bila kadar antibakterinya ditingkatkan melebihi KHM (Setiabudy dan Gan, 1995).

Mekanisme kerja antibakteri adalah sebagai berikut :

a. Kerusakan pada dinding sel

Bakteri memiliki lapisan luar yang disebut dinding sel yang dapat mempertahankan bentuk bakteri dan melindungi membran protoplasma di bawahnya.

b. Perubahan permeabilitas sel

Beberapa antibiotik mampu merusak atau memperlemah fungsi ini yaitu memelihara integritas komponen-komponen seluler.

c. Perubahan molekul protein dan asam nukleat

Suatu antibakteri dapat mengubah keadaan ini dengan mendenaturasikan protein dan asam-asam nukleat sehingga merusak sel tanpa dapat diperbaiki lagi.

d. Penghambatan kerja enzim

Setiap enzim yang ada di dalam sel merupakan sasaran potensial bagi bekerjanya suatu penghambat. Penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel (Pelczar dan Chan, 1988).

6. Resistensi bakteri

Resistensi bakteri terhadap antibiotik membuat masalah yang dapat menggagalkan terapi dengan antibiotik. Resistensi dapat merupakan masalah individual epidemiologi. Resistensi adalah ketahanan mikroba terhadap antibiotik tertentu yang dapat berupa resistensi alamiah, resistensi karena adanya mutasi spontan (resistensi kromosomal) dan resistensi karena adanya faktor R pada sitoplasma (resistensi ekstrakromosomal) atau resistensi karena pemindahan gen yang resisten atau faktor R atau plasmid (resistensi silang) (Wattimena, 1991).

Penyebab terjadi resistensi mikroba adalah penggunaan antibiotik yang tidak tepat, misalnya penggunaan dengan dosis yang tidak memadai, pemakaian yang tidak teratur atau tidak kontinyu, demikian juga waktu pengobatan yang tidak cukup lama. Maka untuk mencegah atau memperlambat timbulnya resistensi mikroba, harus diperhatikan cara-cara penggunaan antibiotik yang tepat (Wattimena, 1991).

a. Resistensi alamiah

Beberapa mikroba secara alamiah tidak peka terhadap antibiotik tertentu. Hal ini disebabkan oleh tidak adanya reseptor yang cocok atau dinding sel mikroba tidak dapat ditembus oleh antibiotik. Oleh sebab itu antibiotik tersebut mempunyai kekosongan dalam spektrum kerjanya.

b. Resistensi kromosomal

Resistensi kromosom terjadi karena mutasi spontan pada gen kromosom. Kromosom yang telah termutasi ini dapat dipindahkan sehingga terjadi populasi yang resisten. Pemindahan kromosom ini mengakibatkan terjadi resistensi silang. Pada mutasi spontan terjadi seleksi oleh antibiotik dimana bibit yang peka akan musnah dan bibit yang resisten akan tetap dan berkembang biak.

c. Resistensi ekstrakromosomal

Dalam resistensi ekstrakromosomal, yang berperan adalah faktor R yaitu kelompok plasmid yang membawa gen resistensi terhadap satu atau beberapa obat antimikroba. Faktor R dipindahkan dari bakteri yang satu ke bakteri yang lain sehingga terjadi resistensi silang. Dengan cara ini bakteri dapat memperoleh sekaligus gen yang resisten terhadap enam sampai tujuh antibiotik. Perpindahan resistensi dapat terjadi dengan cara transformasi, transduksi, dan konjugasi (Wattimena, 1991).

7. Aktivitas antibakteri

Penentuan kepekaan bakteri patogen terhadap antimikroba dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode pokok yakni dilusi atau difusi. Penting sekali untuk menggunakan metode standar untuk mengendalikan semua faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba (Jawetz *et al.*, 2005).

a) Metode dilusi

Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Kemudian media diinokulasi bakteri uji dan dieramkan. Tahap akhir metode ini, antimikroba dilarutkan dengan kadar

yang menghambat atau mematikan. Uji kepekaan cara dilusi agar memakan waktu dan penggunaannya dibatasi pada keadaan tertentu saja. Uji kepekaan cara dilusi cair dengan menggunakan tabung reaksi, tidak praktis dan jarang dipakai, namun kini ada cara yang lebih sederhana dan banyak dipakai, yakni menggunakan *microdilution plate* (Jawetz *et al.*, 2005).

b) Metode difusi

Metode yang paling sering digunakan adalah metode difusi agar. Cakram kertas saring berisi sejumlah tertentu obat ditempatkan pada medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Setelah diinkubasi, diameter zona hambat sekitar cakram untuk dipergunakan mengukur kekuatan hambatan obat terhadap organisme uji. Metode ini dipengaruhi beberapa faktor fisik dan kimia, selain faktor antara obat dan organisme (misalnya sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular dan stabilitas obat). Meskipun demikian, standarisasi faktor-faktor tersebut memungkinkan melakukan uji kepekaan dengan baik (Jawetz *et al.*, 2005).

8. Kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan fisika kimia. Lapisan yang memisahkan terdiri atas butir-butir (fase diam) yang ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam atau lapisan lain yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan, ditotolkan berupa bercak. Lempong KLT yang ditotoli bercak atau lapisan diletakkan dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang sesuai (fase gerak) selama

perambatan. Selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan (Stahl, 1985).

a. Fase diam

Fase diam dalam KLT merupakan suatu lapisan dibuat dari bahan berbutir halus yang ditempatkan pada suatu lempengan. Sifat yang penting dari fase diam adalah besar partikel dan homogenitas. Besar partikel yang umum digunakan adalah 1-25 mikron. Partikel yang butirannya kasar tidak akan memberikan hasil yang memuaskan (Sastrohamidjojo, 2002).

Silika gel yang digunakan kebanyakan diberi pengikat yang dimaksudkan untuk memberikan kekuatan pada lapisan, dan menambah adesi pada gelas penyokong. Pengikat yang digunakan kebanyakan kalsium sulfat. Biasanya dalam perdagangan, silika gel telah diberi pengikat sehingga tidak perlu mencampur sendiri (Sastrohamidjojo, 2002).

b. Fase gerak

Fase gerak adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Fase gerak bergerak di dalam fase diam karena adanya gaya kapiler. Pelarut yang digunakan adalah yang bermutu analitik dan bila diperlukan sistem pelarut multikomponen maka harus berupa campuran sesederhana mungkin yang terdiri dari atas maksimal tiga komponen (Stahl, 1985).

Pemilihan fase gerak sebaiknya menggunakan campuran pelarut organik yang mempunyai polaritas serendah mungkin. Salah satu alasannya adalah untuk mengurangi serapan setiap komponen dari campuran pelarut. Jika komponen mempunyai sifat polar tinggi (terutama air) dalam campuran akan merubah sistem

menjadi sistem partisi. Campuran yang baik akan memberikan fase gerak yang mempunyai kekuatan bergerak sedang, tetapi sebaiknya dicegah sejauh mungkin mencampur lebih dua komponen, terutama karena campuran yang lebih kompleks cepat mengalami perubahan fase terhadap perubahan suhu (Sastrohamidjojo, 2002).

Hasil yang diperoleh diidentifikasi di bawah lampu UV (254 dan 366 nm), ditandai dengan ada atau tidaknya fluoresensi. Jika tidak tampak dengan cara di atas, maka dilakukan secara kimia yaitu penyemprotan dengan pereaksi yang sesuai (Auterhoff dan Kovar, 1987). Jarak pengembangan dengan kromatogram biasanya dinyatakan dengan angka Rf atau hRf, diperoleh dengan membandingkan jarak bercak dari titik awal penotolan dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak dan hRf diperoleh dengan mengalikan angka Rf dengan 100 (h) (Stahl, 1985).

Rf dapat dirumuskan dengan:

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak pengembangan senyawa dari titik awal}}{\text{Jarak yang digerakkan pelarut dari titik awal}} \quad (1)$$

Angka Rf berjangka antara 0,00 sampai 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal. hRf adalah angka Rf dikalikan faktor 100 (h), menghasilkan nilai yang berjangka 0 sampai 100. Jika dipilih 10 cm sebagai jarak pengembangan, maka jarak rambat suatu senyawa (titik awal-pusat bercak dalam cm) \times 10 menghasilkan angka hRf. Tetapi karena angka Rf merupakan fungsi sejumlah faktor, angka ini harus dianggap petunjuk saja (Stahl, 1985).

Harga Rf dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya :

- a. Stuktur kimia senyawa, sifat penyerap dan derajat aktivitasnya

- b. Tebal tipisnya penyerap
- c. Sifat fase gerak
- d. Derajat kejenuhan bejana
- e. Jumlah cuplikan yang ditotolkan
- f. Suhu yang dapat mempengaruhi perubahan komposisi pelarut
- g. Keseimbangan dalam bejana

9. Toksisitas

Toksisitas didefinisikan sebagai kemampuan suatu zat untuk menimbulkan keracunan. Toksisitas merupakan suatu sifat relatif dari zat kimia baik menyangkut diri manusia secara langsung atau tidak langsung. Uji toksisitas dibagi menjadi 2 yaitu uji toksisitas tak khas (akut, subkronis dan kronis) dan uji toksisitas khas yang meliputi potensi teratogenik, mutagenik, dan karsinogenik (Donatus, 1990)

Uji toksisitas akut dengan hewan uji *Artemia salina* Leach dapat digunakan sebagai uji pendahuluan pada penelitian yang mengarah ke uji sitotoksik, karena ada kaitan antara uji toksisitas akut dengan uji sitotoksik jika harga LC_{50} dari toksisitas akut $< 1000 \mu\text{g/mL}$ (Meyer *et al.*, 1982.)

Pada hewan percobaan untuk harga LC_{50} dibedakan menjadi:

- a. Toksik ($LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$)
- b. Tidak toksik ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$)

(Meyer *et al.*, 1982).

Toksistas terhadap *Artemia salina* Leach merupakan toksisitas akut. Parameter yang digunakan untuk menunjukkan adanya aktivitas biologi suatu

senyawa terhadap *Artemia salina* Leach adalah kematian. Senyawa-senyawa yang menunjukkan ketoksikan yang tinggi dalam BST sering dikaitkan dengan potensinya sebagai antikanker (Meyer *et al.*, 1982).

10. Brine Shrimp Lethality Test

Brine Shrimp Lethality Test merupakan salah satu metode penelitian pendahuluan terhadap adanya senyawa sitotoksik dalam ekstrak tanaman aktif (Meyer *et al.*, 1982). Metode uji ketoksikan dengan BST dikenal sebagai metode yang sederhana karena kecepatannya, *reliable*, murah dan mudah serta dapat dikerjakan di rumah. Metode BST telah digunakan untuk berbagai keperluan misalnya menentukan adanya residu bahan beracun, menentukan potensi anestetika, *bioassay* senyawa bioaktif dan mencari senyawa berpotensi antikanker dari bahan alami (Meyer *et al.*, 1982).

Metode ini telah banyak dikembangkan sebagai salah satu cara penentuan bioaktivitas ekstrak tanaman maupun senyawa murni. Penggunaan yang luas metode ini pada mulanya adalah untuk mengetahui tingkat toksisitas suatu sediaan (Mudjiman, 1985).

a. *Artemia salina* Leach

Artemia merupakan bangsa udang-udangan yang diklasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : Animal

Sub Kingdom : Metazoa

Phylum : Arthropoda

Sub Phylum : Mandibulata

Classis : Crustacea

Sub classis : Branciopoda
Ordo : Anostraca
Familia : Artemiidae
Genus : Artemia
Spesies : *Artemia salina* Leach

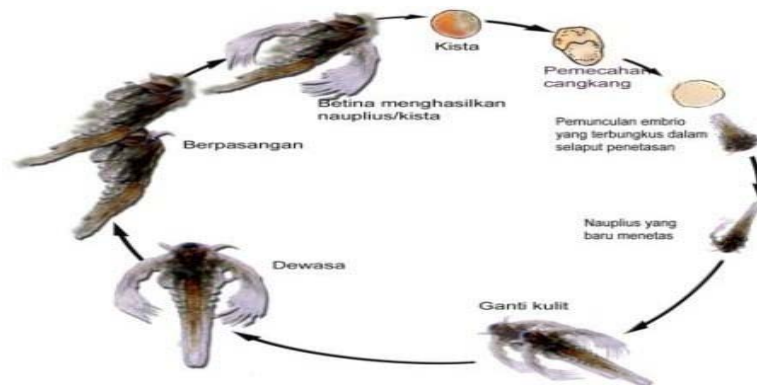
(Mudjiman, 1985)

b. Lingkungan hidup

Keasaman air (pH) juga mempengaruhi kehidupan *Artemia*, seperti halnya hewan-hewan yang hidup di air laut. *Artemia* juga membutuhkan pH air yang sedikit bersifat basa untuk kehidupannya. Agar tumbuh dengan baik maka pH air yang digunakan untuk budidaya berkisar antara 7,5-8,5 (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

c. Morfologi

Ada beberapa tahapan proses penetasan *Artemia salina* Leach ini yaitu tahap hidrasi, tahap pecah cangkang, dan tahap payung atau tahap pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga kista yang diawetkan dalam bentuk kering tersebut akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Tahap selanjutnya adalah tahap pecah cangkang dan disusul dengan tahap payung yang terjadi beberapa saat sebelum nauplius keluar dari cangkang. Untuk mengetahui tahap penetasan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tahap Penetasan *Artemia salina*

Artemia yang baru menetas disebut dengan nauplius. Nauplius berwarna orange, berbentuk bulat lonjong dengan panjang sekitar 400 mikron, lebar 170 mikron, dan berat 0,002 mg. Nauplius mempunyai sepasang antenulla dan sepasang antenna. Selain itu, di antara antenulla terdapat bintik mata yang disebut dengan *ocellus*. Sepasang mandibula rudimeter terdapat di belakang antena. Sedangkan labrum (semacam mulut) terdapat di bagian ventral.

d. Perkembangan dan siklus hidup

Berdasarkan cara perkembangbiakannya ada dua golongan *Artemia* yaitu jenis biseksual dan jenis partenogenetik. Baik perkembangbiakan biseksual maupun parthenogenesis, keduanya dapat terjadi ovovivipar atau ovipar. Pada ovovivipar yang keluar dari induknya sudah berupa anak atau beranak yang dinamakan nauplius. Sedangkan pada cara ovipar, yang keluar dari induknya berupa telur yang bercangkang tebal, yang dinamakan siste.

Ovoviviparitas biasanya terjadi apabila keadaan lingkungannya cukup baik, dengan kadar garam kurang dari 150 per mil dan kandungan oksigennya cukup. Sedangkan oviparitas akan terjadi apabila keadaan lingkungannya memburuk, dengan kadar garam lebih dari 150 per mil dan kandungan oksigennya

rendah. Telur yang bercangkang tebal itu memang disiapkan untuk menghadapi keadaan lingkungan yang buruk, bahkan juga kekeringan. Sementara itu, embrio yang berada di dalam cangkang telurnya beristirahat. Apabila keadaan lingkungannya sudah baik kembali, maka telur-telur itu akan menetas menjadi burayak, yang selanjutnya hidup normal seperti biasanya (Mudjiman, 1985).

E. Landasan Teori

Tao *et al.* (2009) melaporkan bahwa minyak atsiri kulit jeruk manis memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Penicillium chrysogenum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Saccharomyces cerevisiae*, dengan zona hambatan berkisar antara 14,57 mm - 23,37 mm dan MIC berkisar antara 4,66 - 18,75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Tao *et al.*, 2009). Selain itu kandungan flavonoid dalam jeruk memiliki aktivitas antioksidan penangkal radikal bebas (Ghasemi *et al.*, 2009). Ekstrak air daun jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) berdasarkan metode difusi disk agar, memiliki aktivitas terhadap *E. coli* pada diameter 7 mm, sedangkan pada *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Staphylococcus aureus* terdapat zona hambat antara 0-3 mm, sedangkan pada ekstrak etanol menunjukkan adanya zona hambat yang kecil antara 1-3 mm pada semua bakteri (Ekwenye *et al.*, 2010).

Selain sebagai antibakteri, diketahui beberapa spesies jeruk seperti jeruk bali dan jeruk purut memiliki aktivitas antikanker. Kandungan senyawa dalam jeruk memiliki kemampuan untuk menghambat oksidasi pada tahap progresi dalam karsinogenesis (Stahl dan Sies, 1995). Jeruk purut (*Citrus hystrix*) telah diteliti

memiliki *antipromoting activity* pada aktivasi virus Epstein-Barr (EBV) terinduksi *tumor promoting agent* (Tiawech *et al.*, 2000), juga dapat mengurangi viabilitas sel secara *in vitro* pada pemaparan cahaya 9.6 J/cm^2 (Ong *et al.*, 2009). Kandungan gliseroglikolipidnya terbukti sebagai inhibitor aktivitas *tumor promoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* pada kulit tikus yang poten (Murakami *et al.*, 1999).

Maka dilakukan penelitian pada genus dan spesies yang sama yaitu jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) terhadap aktivitas antibakteri *S. aureus* dan *E. coli* multiresisten antibiotik serta uji toksisitasnya.

F. Hipotesis

Ekstrak etanol kulit jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* multiresisten antibiotik serta memiliki efek toksik terhadap *Artemia salina* Leach.