

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL KULIT  
BUAH JERUK MANIS (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) TERHADAP  
*Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli* MULTIRESISTEN  
SERTA *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST***

**MAKALAH**



Oleh :

**LANJAR WIJASTUTI  
K 100 070 099**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA  
SURAKARTA  
2011**

**PENGESAHAN MAKALAH**  
**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL KULIT**  
**BUAH JERUK MANIS (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) TERHADAP**  
***Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli* MULTIRESISTEN**  
**SERTA *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST***

Oleh :

**LANJAR WIJIASTUTI**  
**K 100 070 099**

Telah disetujui dan disahkan pada:

Hari :  
Tanggal :

**Pembimbing Pendamping**

**Peni Indrayudha, M. Biotech., Apt**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL KULIT  
BUAH JERUK MANIS (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) TERHADAP  
*Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli* MULTIRESISTEN  
SERTA *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST***

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT OF  
PEEL SWEET ORANGE (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) ON  
*Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli* MULTIRESISTENT  
AND *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST*

Lanjar Wijastuti; Muhtadi; Peni Indrayudha  
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

ABSTRAK

Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai produk antimikroba adalah tanaman jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Berdasarkan penelitian sebelumnya daun dan kulit jeruk manis aktif sebagai antibakteri, antioksidan, dan beberapa spesies jeruk lain seperti jeruk bali dan jeruk purut memiliki potensi antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit jeruk manis terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* multiresisten antibiotik serta mengetahui golongan senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri juga efek toksik terhadap *Artemia salina* Leach.

Penelitian ini diawali dengan optimasi penyari etanol 50%, 75% dan 95%. Berdasarkan pertimbangan profil KLT, besar rendemen dan uji antibakteri dipilih etanol 50%. Ekstrak etanol kulit jeruk manis diperoleh melalui ekstraksi dengan metode maserasi. Ekstrak tersebut digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* multiresisten serta menguji ketoksikannya terhadap *Artemia salina* L. (*Brine Shrimp Lethality Test*). Selanjutnya dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengetahui kandungan senyawa dari ekstrak etanol kulit jeruk manis. Bioautografi dilakukan untuk mengetahui senyawa dalam ekstrak yang bertanggung jawab terhadap kematian bakteri uji.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 50% kulit jeruk manis mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* multiresisten dengan nilai Kadar Bunuh Minimal (KBM) masing-masing 6% dan 8%. Ekstrak etanol kulit jeruk manis toksik terhadap *Artemia salina* Leach dengan nilai  $LC_{50}$  77,19  $\mu$ g/mL. Hasil KLT menunjukkan ekstrak etanol kulit jeruk manis mengandung flavonoid, polifenol dan saponin. Senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri dan efek toksik adalah golongan flavonoid.

**Kata kunci:** Jeruk manis, (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, BST

## ABSTRACT

*Infectious diseases can be caused by the bacterium E. coli and S. aureus. One of the plants can be used as an antimicrobial product is a sweet orange (Citrus sinensis (L.) Osbeck). Based on previous research, leaves, and peels of sweet orange active as antibacterial, antioxidant, and some species of orange like pomelo and small aromatic lemons have anticancer activity. This observation intend to know antibacterial activity against S. aureus and E. coli multiresistent antibiotic, determine compound that contained in and toxic effect to Artemia salina Leach.*

*This research was preceded by the optimization of ethanol solvent 50%, 70%, and 95%. From the consideration of rendemen, TLC profiles, and inhibition of bacterial test (Kirby Bauer) was chosen 50% ethanol. peel of sweet orange extracted by maceration method using 50% ethanol solvent in the destilation. The extracts were used to test the antibacterial activity to the E. coli and S. aureus as well as test it toxicity against Artemia salina L (Brine Shrimp Lethality Test). Then performed Thin Layer Chromatography (TLC) to determine the content of compounds from ethanol extract of the peel of sweet orange. Bioautografi conducted to determine the compounds in the extract which is responsible for the death of the test bacteria.*

*The results showed that 50% ethanol extract of the peel of sweet orange has antibacterial activity against S. aureus dan E. coli multiresisten with the Minimum Bacteriside Concentration (MBC) value of 6% and 8%. This extract also toxic to Artemia salina L. LC50 value of 942 ug / mL. TLC results showed that the ethanol extract of peel sweet orange containing phenolic compounds, flavonoid and saponins. Group of compounds from the ethanol extract of peel sweet orange has antibacterial activity and toxicity is probably the class of compounds of essential flavonoid.*

**Key word:** Sweet orange, (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, BST

## PENDAHULUAN

Infeksi merupakan masalah penting yang banyak dijumpai pada kehidupan sehari-hari. Penyakit infeksi yang banyak diderita masyarakat di antaranya infeksi *Enterobacteria* dari golongan *Escherichia coli* dan infeksi kulit karena *Staphylococcus aureus* (Anonim, 2004). Penggunaan antibiotik secara besar-besaran untuk terapi profilaksis adalah faktor utama terjadinya resistensi. Dengan berkembangnya populasi bakteri

yang resisten, maka antibiotik yang pernah efektif untuk mengobati penyakit tertentu kehilangan nilai kemoterapeutiknya. (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.

Berdasarkan beberapa penelitian jeruk manis memiliki

aktivitas sebagai antibakteri dan antioksidan. Tao *et al.* (2009) melaporkan minyak atsiri kulit jeruk manis memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Penicillium chrysogenum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Ghasemi *et al.* (2009) ekstrak metanol dari 13 spesies kulit jeruk mengandung kuersetin dan fenol menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> antara 0,6-3,8 mg/mL. Anagnostopoulou *et al.* (2004) juga melaporkan adanya aktivitas antioksidan dalam fraksi etil asetat kulit jeruk manis. Stahl dan Sies (1995) menyebutkan bahwa kandungan senyawa dalam jeruk memiliki kemampuan untuk menghambat oksidasi pada tahap progresi dalam karsinogenesis.

Berdasarkan penelitian tersebut, tanaman jeruk manis terbukti mempunyai senyawa bioaktif yang dapat dimanfaatkan, terutama pada bagian kulitnya. Namun sampai saat ini, kulit jeruk manis belum banyak dimanfaatkan oleh masyarakat dan hanya berakhir sebagai limbah. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap kulit jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) untuk membuktikan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* multiresisten dan uji toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach serta mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalamnya.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

**Alat:** Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserator,

*vacuum rotary evaporator* (Heidolph), inkubator (Mettler), oven (Mettler), bunsen, pipet ukur, mikropipet (Socorex), autoklaf (All American), ultrasonik<sup>TM</sup> (Cleaner), alat timbang (Precisa), *yellow tips*, *blue tips*, *spreader glass*, bejana kromatografi, lampu UV, flakon, pH universal, akuarium termodifikasi, lampu, dan alat-alat gelas lainnya (Pyrex).

**Bahan:** Bahan yang digunakan adalah serbuk kulit jeruk manis yang diperoleh dari Pasar Gede Surakarta, etanol 50% (teknis) terdestilasi, bakteri *E. coli* dan *S. aureus* multiresisten, media BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid), media MH (Mueller Hinton) (Merck), CMC Na, silika gel GF<sub>254</sub> (Merck), etanol (p.a), kloroform (p.a), metanol (p.a), pereaksi penampak bercak antara lain FeCl<sub>3</sub>, Liebermann-Burchard (LB), vanilin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dan sitroborat.

## Jalannya Penelitian

### Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman jeruk manis dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

### Penyiapan tanaman.

Kulit jeruk manis yang telah terkumpul, dibersihkan dari kotoran menggunakan air bersih yang mengalir. Kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung dengan ditutupi kain hitam. Selanjutnya kulit yang telah kering dihaluskan dengan menggunakan blender. Serbuk yang diperoleh kemudian diayak dan ditimbang.

### **Optimasi Penyari.**

Sebanyak 25 gram serbuk kulit jeruk manis ditimbang dan dimasukkan dalam erlenmeyer. Penimbangan ini dilakukan sebanyak tiga kali. Kemudian masing-masing ditambahkan penyari etanol dengan konsentrasi 50%, 70%, dan 95% sebanyak 150 mL. Maserasi ini dilakukan selama tiga hari sampai terjadi penjenuhan dilakukan remaserasi sebanyak satu kali. Hasil maserasi yang didapat kemudian diuapkan pelarutnya, dihitung rendemen, dilihat profil kromatografi lapis tipis, dan diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji dengan metode Kirby Bauer.

### **Penyarian**

Metode yang digunakan adalah maserasi. Dari hasil optimasi penyari, dipilih etanol 50% untuk menyari ekstrak kulit jeruk manis. Serbuk kulit jeruk manis sebanyak 750 mg dimaserasi dalam 3,3 L etanol 50%(teknis terdestilasi). Campuran diaduk sampai homogen, didiamkan selama 5 hari dan ditempatkan dalam tempat yang gelap. Hasil maserasi disaring menggunakan corong Buchner. Maserat yang diperoleh ditampung, kemudian diremaserasi sebanyak 1 kali. Maserat dievaporasi dengan *rotary evaporator* dan kandungan air dihilangkan menggunakan *waterbath* dengan menjaga suhunya <60°C .

### **Uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi padat**

Penyiapan sampel. Larutan stok ekstrak etanol dibuat sebesar 50 dibuat dengan melarutkan 25 gram ekstrak kulit jeruk manis dalam 50 mL CMC Na 1% Dari stok 50%

ekstrak tersebut dibuat seri konsentrasi sebesar : 20%, 30%, 40%, 45% dan 50% b/v. Selanjutnya diambil 1 mL dari tiap seri konsentrasi tersebut dan ditambah 4 mL media, sehingga konsentrasi akhir pada tabung menjadi 4%, 6%, 8%, 9% dan 10%. Masing-masing campuran dikocok hingga homogen dan dipadatkan dalam posisi miring.

Pengujian antibakteri. Suspensi bakteri sebanyak 25 µL dengan konsentrasi 10<sup>6</sup> CFU/mL diratakan pada permukaan campuran ekstrak dan media MH menggunakan ose steril, kemudian diinkubasikan selama 18-24 jam. Kontrol yang digunakan terdiri dari tiga macam yaitu kontrol media yang berisi 5 mL media MH, kontrol pelarut yang berisi 4 mL media MH + 1 mL CMC Na 1% dan kontrol bakteri yang berisi 5 mL media MH.

Penentuan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Hasil uji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol dibandingkan dengan kontrol, yaitu dilihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada masing-masing tabung. Hasil dikatakan positif (+) jika ada pertumbuhan bakteri, dan hasil negatif (-) jika tidak ada pertumbuhan bakteri. Konsentrasi minimum ekstrak yang masih mampu membunuh bakteri disebut Kadar Bunuh Minimum (KBM).

### **Uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST)**

Penyiapan sampel uji. Pembuatan seri kadar dilakukan dengan menimbang 50 mg ekstrak etanol kulit jeruk manis kemudian dilarutkan dengan 5 mL methanol

sehingga diperoleh konsentrasi 1%. Untuk pengujian BST dibuat seri konsentrasi 25, 50, 100, 200 dan 400 µg/mL.

Penetasan telur *Artemia salina* Leach. Telur udang ditetaskan selama 48 jam sebelum digunakan. Telur dimasukkan dalam wadah penetasan yang telah berisi air laut. Wadah penetasan terdiri dari dua bagian, yaitu bagian gelap dan bagian terang yang dihubungkan oleh sekat yang berlubang-lubang. Telur diletakkan pada bagian yang gelap sehingga pada saat menetas larva *Artemia salina* akan menuju ke tempat terang karena sifatnya yang tertarik pada cahaya.

Uji toksisitas. Larva udang yang berumur 48 jam dimasukkan dalam flakon sebanyak 10 ekor yang sudah bebas pelarut, kemudian ditambah air laut sebanyak 5 mL. ditambahkan 1 tetes suspensi ragi sebagai makanan. Disimpan dalam tempat yang cukup cahaya selama 24 jam, dihitung jumlah larva yang mati. Indikator kematian larva apabila larva tersebut tidak bergerak lagi walaupun telah digoyang-goyang.

#### **Identifikasi Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Dibuat larutan uji dengan konsentrasi 5%. Larutan uji ditotolkan pada fase diam silika GF<sub>254</sub> sebanyak 2 µl, setelah totolan kering, kemudian dielus dengan fase gerak kloroform : metanol (9:1) dengan jarak pengembangan 6 cm. Setelah elusi selesai, kromatogram diangkat, dikeringkan, dan dideteksi di bawah sinar UV<sub>254</sub> nm dan UV<sub>366</sub>

nm, serta beberapa pereaksi penampak bercak antara lain FeCl<sub>3</sub>, Liebermann-Burchard (LB), vanilin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dan sitroborat. Warna yang timbul diamati dan dibandingkan dengan pustaka, serta harga R<sub>f</sub> bercak dihitung.

#### **Uji Bioautografi.**

Untuk mendeteksi senyawa aktif yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri digunakan metode bioautografi dengan cara kromatogram diletakkan pada permukaan media MH dalam cawan petri yang telah diinokulasi dengan suspensi bakteri sebanyak 200 µl selama 20 menit. Kromatogram diangkat dan selanjutnya media MH tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Bila bercak-bercak pada kromatogram tersebut memiliki aktivitas antibakteri, maka dengan adanya difusi senyawa aktif akan membentuk zona jernih yang merupakan zona hambatan.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Determinasi Tanaman Jeruk Manis**

Hasil determinasi tanaman jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) adalah sebagai berikut:

1b\_2b\_3b\_4b\_12b\_13b\_14b\_17b\_18  
b\_19b\_20b\_21b\_22b\_23b\_24b\_25b\_  
26b\_27b\_28b\_29b\_30b\_31a\_32a\_33  
a\_34a\_35a\_36d\_37b\_38b\_39b\_41b\_  
42b\_44b\_45b\_46e\_50b\_51b\_53b\_54  
b\_56b\_57b\_58b\_59d\_72b\_73b\_74a\_  
75b\_76a\_77a\_78b\_103c\_104b\_106b  
\_107a\_108b\_109a\_110a\_111b\_112b  
\_114b\_\_\_\_\_ **Rutaceae**  
1b\_2a\_3a\_\_\_\_\_ **Citrus**  
1a\_2b\_3b\_\_\_\_\_ (*Citrus sinensis*  
(L.) Osbeck.

Berdasarkan data tersebut, maka dapat dipastikan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck).

### Hasil Optimasi Penyari

Uji pendahuluan pelarut dimaksudkan untuk memilih pelarut yang paling baik dalam menyari zat-zat yang terdapat dalam kulit jeruk manis tersebut. Pertimbangan pemilihan pelarut uji didasarkan atas rendemen ekstrak, profil kromatografi lapis tipis, dan uji antibakteri dengan metode Kirby Bauer. Hasil ekstraksi kulit jeruk manis dengan menggunakan tiga pelarut yaitu etanol 50%, 70% dan 95% didapat bahwa ekstrak etanol 50% memberikan rendemen yang terbesar diikuti ekstrak etanol 70% dan 95% (Tabel 1).

Pada uji kromatografi lapis tipis dengan menggunakan fase diam

silika gel GF 254 dengan berbagai fase gerak diperoleh bahwa fase gerak kloroform:metanol (9:1) memberikan pemisahan senyawa yang paling baik dibanding fase gerak lainnya, terlihat adanya bercak fluoresensi yang jelas bila dilihat di bawah UV 254 nm dan UV 366 nm (Tabel 1). Sedangkan pada uji antibakteri dengan metode Kirby Bauer terlihat pada ekstrak etanol 50% menunjukkan adanya *zona irradiikal* yaitu suatu daerah di sekitar disk menunjukkan pertumbuhan bakteri yang dihambat, tapi tidak dimatikan. Terlihat adanya pertumbuhan yang kurang subur/lebih jarang dibanding ekstrak etanol lainnya. Berdasarkan tiga pertimbangan di atas dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 50% memberikan hasil yang lebih baik dari lainnya. Oleh karena itu dipilih etanol 50% sebagai penyari.

**Tabel 1. Hasil Optimasi Penyari Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)**

Ekstrak etanol	Rendemen	Pertimbangan Optimasi Penyari		Daya hambat (Kirby bauer)
		Profil KLT UV 254 nm	Profil KLT UV 366 nm	
50%	12,6%	Pemadaman	Bercak jelas	++
70%	11,5%	Pemadaman	Bercak jelas	+
95%	5,9%	Pemadaman	Bercak jelas	+

### Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri bertujuan untuk mengetahui nilai KBM (Kadar Bunuh Minimum) pada ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) terhadap *E. coli* dan *S. aureus* multiresisten antibiotik. Uji dilakukan dengan menggunakan metode dilusi padat, karena bahan yang diuji berupa larutan keruh sehingga apabila menggunakan dilusi cair akan mengalami kesulitan dalam

pengamatan menentukan nilai KBM. Keuntungan dari metode dilusi padat adalah larutan uji dapat terdistribusi merata, sehingga kontak dengan bakteri lebih efektif. Selain itu metode ini dapat menunjukkan secara langsung nilai KBM dari larutan uji terhadap bakteri uji. Hasil KBM diperoleh dengan mengamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada pembuatan seri konsentrasi untuk membantu



melarutkan ekstrak kulit jeruk manis digunakan CMC Na 1% sebagai *suspending agent*. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit jeruk

manis terhadap *S. aureus* dan *E. coli* multiresisten dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) terhadap *E. coli* dan *S. aureus* Multiresisten Antibiotik

Konsentrasi %	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
4%	+	+	+	+	+	+
6%	+	+	+	-	-	-
8%	-	-	-	-	-	-
9%	-	-	-	-	-	-
10%	-	-	-	-	-	-
K1	-	-	-	-	-	-
K2	+	+	+	+	+	+
K3	+	+	+	+	+	+

Keterangan:

- (+) : ada pertumbuhan bakteri
- (-) : tidak terdapat pertumbuhan bakteri.
- K1 : kontrol media
- K2 : kontrol pertumbuhan
- K3 : kontrol pelarut CMC Na 1%
- R : replikasi

Berdasarkan penelitian Tao *et al.* (2009) dan Bryan *et al.* (2008) kandungan minyak atsiri dalam kulit jeruk manis memiliki aktivitas antibakteri. Kulit jeruk juga mengandung senyawa flavonoid, salah satunya adalah kuersetin (Ghasemi *et al.*, 2008). Kandungan flavonoid antara lain naringin, rutoside, dan hesperidin dalam ekstrak metanol jeruk kasturi (*Citrus mitis*) dilaporkan juga memiliki aktivitas antibakteri (Jusoh *et al.*, 2001). Selain itu Roowi (2001) menyebutkan bahwa hasil identifikasi senyawa flavonoid antara lain naringin, rutin dan kaemperol dalam kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) memiliki aktivitas antibakteri. Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri. Mekanisme yang berbeda dikemukakan oleh Di Carlo *et al.*

(1997) dan Estrela *et al.* (1995) cit Sabir (2005) yang menyatakan bahwa gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid menyebabkan perubahan komponen organik dan transpor nutrisi yang akhirnya akan mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap bakteri. Sehingga dapat diperkirakan adanya aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol kulit jeruk manis disebabkan oleh senyawa flavonoid yang memiliki gugus OH bebas. Adanya senyawa-senyawa flavonoid dalam ekstrak dapat dilihat pada hasil analisis KLT dengan pereaksi semprot sitroborat.

Sehingga berdasarkan uji aktivitas antibakteri dapat dikatakan ekstrak etanol kulit jeruk manis lebih poten terhadap bakteri Gram positif (*S. aureus*) dengan KBM 6% yang lebih kecil dari pada bakteri Gram negative (*E. coli*) yang membutuhkan KBM 8%.

### Hasil Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Analisis KLT dilakukan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit jeruk manis. KLT dilakukan dengan menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak kloroform : metanol (9:1) dengan jarak pengembangan 6 cm. Setelah plat dielusi kemudian diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat dalam bercak kromatogram digunakan pereaksi semprot seperti sitroborat, Liebermann Burchard,  $\text{FeCl}_3$  dan vanilin-asam sulfat. Hasil analisis KLT menunjukkan adanya *spot* atau bercak pada ekstrak etanol kuli jeruk manis mengandung senyawa golongan fenolik, flavonoid dan saponin.

### Hasil Bioautografi

Hasil penelitian ekstrak etanol kulit jeruk manis memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* multiresisten sehingga perlu dilakukan uji bioautografi untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri tersebut. Metode bioautografi dipilih karena metode ini cukup sederhana. Pada metode ini bahan uji yang digunakan cukup sedikit dan dengan cepat dapat mendeteksi bercak pada kromatogram yang dapat memberikan aktivitas antibakteri.

Hasil uji bioautografi ekstrak etanol 50% kulit jeruk manis terhadap *S. aureus* menunjukkan tidak terdapat zona jernih, namun menunjukkan adanya

hambatan pertumbuhan bakteri pada Rf 0,83 dimana berdasarkan analisis KLT sebelumnya diketahui bahwa senyawa pada Rf 0,83 adalah flavonoid. Hasil uji terhadap *E. coli* tidak menunjukkan adanya zona jernih disekitar kromatogram. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan senyawa yang aktif sebagai antibakteri adalah golongan flavonoid. Flavonoid merupakan golongan senyawa fenolik, diduga mekanisme kerjanya dengan mendenaturasi protein sel bakteri yaitu perubahan strukturnya sehingga sifat khasnya hilang (Tjay, 2002). Senyawa fenolik bekerja dengan mendenaturasi protein sel dan merusak membran sel bakteri (Pelczar dan Chan, 1988).

### Hasil Uji Toksisitas

Salah satu metode bioassay yang mudah dan cepat untuk menilai aktivitas suatu bahan obat adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). Uji toksisitas dengan BST dipilih karena mempunyai beberapa keuntungan diantaranya mudah, cepat, sederhana. Pada uji ini telur dan air laut yang digunakan diperoleh dari Pasar Gede Kota Surakarta. Tingkat toksisitas dari ekstrak tanaman dapat ditentukan dengan melihat harga  $\text{LC}_{50}$ . Apabila harga  $\text{LC}_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$  maka ekstrak tanaman dikatakan toksik, sebaliknya bila harga  $\text{LC}_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ , maka dikatakan tidak toksik (Meyer *et al.*, 1982).

**Tabel 3. Jumlah Larva *Artemia salina* Leach yang Mati pada Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Manis dan Kontrol Pelarutnya**

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Jumlah larva yang mati tiap flakon																			
	Replikasi 1					Replikasi 2					Replikasi 3					Kontrol				
25	2	1	2	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	0	0	0	0	0
50	4	3	4	4	4	4	3	4	4	3	4	3	4	4	4	0	0	0	0	0
100	5	4	4	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	5	5	0	0	0	0	0
200	8	8	7	9	8	9	10	9	8	8	8	9	9	8	9	0	0	0	0	0
400	10	10	9	10	9	10	10	10	10	9	10	8	9	8	10	0	0	0	0	0

Keterangan:

1. Tiap lajur menunjukkan 1 penelitian
2. Tiap angka dalam lajur menunjukkan  $\Sigma$  larva *Artemia salina* Leach yang mati dalam tiap flakon
3. Angka 0 menunjukkan tidak ada larva *Artemia salina* Leach yang mati

**Tabel 4. Data Hasil Uji BSLT Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Manis dengan Nilai Probit**

Log konsentrasi (x)	Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3		Kontrol	
	% kematian	Probit	% kematian	Probit	% kematian	Probit	% kematian	Probit
1,397	16	4,00	16	4,00	16	4,00	0	0
1,698	38	4,70	36	4,64	38	4,70	0	0
2	46	4,90	46	4,90	44	4,84	0	0
2,301	80	5,84	88	6,18	86	6,08	0	0
2,602	96	6,75	98	7,05	90	6,28	0	0

**Tabel 5. Nilai  $LC_{50}$  Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Manis**

Persamaan garis lurus	Nilai r	Nilai $LC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata nilai $LC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
$Y=2,203x+0,831$	0,980	78,05	77,19
$Y=2,535x+0,284$	0,977	72,50	
$Y=1,971x+1,238$	0,968	81,03	

Hasil percobaan diketahui bahwa ekstrak etanol 50% kulit jeruk manis merupakan ekstrak yang toksik dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 77,19  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai  $LC_{50}$  yang diperoleh jauh lebih kecil dari 1000  $\mu\text{g/mL}$ , ini menunjukkan bahwa senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak tersebut memiliki toksisitas yang tinggi, dan dapat diartikan bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak tersebut memiliki potensi sebagai sitotoksik. Penelitian yang dilakukan oleh Stahl dan Sies (1995) menyebutkan bahwa kandungan senyawa dalam jeruk memiliki kemampuan untuk menghambat oksidasi pada tahap progresi dalam karsinogenesis. Penelitian Juniarti dkk. (2009) menyebutkan bahwa senyawa yang bersifat toksik adalah senyawa yang tersari pada pelarut yang bersifat polar. Berdasarkan identifikasi senyawa dengan KLT terdapat

senyawa flavonoid, fenolik dan saponin dalam ekstrak kulit jeruk manis tersebut, tetapi senyawa kimia spesifik yang menyebabkan toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach atau yang berkhasiat sebagai antikanker belum diketahui. Berdasarkan uji aktivitas antibakteri diketahui bahwa senyawa yang aktif adalah golongan flavonoid, terutama flavonoid polar karena hasil KLT pada Rf tertinggi yaitu 0,83 merupakan senyawa polar sehingga disimpulkan senyawa yang menyebabkan toksisitas pada *Artemia salina* Leach adalah flavonoid.

## KESIMPULAN

1. Ekstrak etanol kulit jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* multiresisten dengan nilai Kadar Bunuh Minimal (KBM) sebesar 6% dan *Escherichia coli* multiresisten antibiotik dengan Kadar Bunuh minimal (KBM) sebesar 8%.
2. Senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* adalah senyawa flavonoid.
3. Ekstrak etanol 50% kulit jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) memiliki toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 77,19  $\mu\text{g/mL}$ .

## SARAN

1. Perlu dilakukan isolasi kandungan senyawa aktif terutama golongan flavonoid dari ekstrak etanol kulit jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck).
2. Perlu dilakukan uji sitotoksik lebih lanjut menggunakan sel kanker terhadap ekstrak etanol kulit jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Bapak Dr. Muhtadi, M.Si dan Bapak Peni Indrayudha, M. Biotech., Apt selaku pembimbing utama dan pembimbing pendamping yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk memberikan bimbingan dan pengarahan dalam penyusunan skripsi ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anagnostopoulou, M. A., Panagiotis, K., Vassilios, P. P., Andreana, N. A., Dimitrios, B., 2004, Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*), *J. Food Chemistry*, Januari 2006, 94 (1): 19-25.
- Anonim, 2004, Infeksi Enterobacteria, (online), ([www.medicastore.com](http://www.medicastore.com), diakses 3 Maret 2010).
- Bryan; P.G. Crandali; V.I. Chalova; S.C.Ricke, 2008, Orange Essential Oil Microbial Activities against *Salmonella* spp., *Journal of Food Science*, 73 (6), 264-267.
- Carlo, Di, Mascolo N., Izzo, A. A., Capasso, F., 1999, Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Science*, 65 (4), 53-337.

- Estrela, C., Sydney, G. B., Bammann, L. L., Felipe, O., 1995, Mechanism of action calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Brazil Dent J.*, 6, 85–90.
- Ghasemi, K., Yosef, G., Mohammad, A. E., 2009, Antioxidant Activity, Phenol And Flavonoid Contents Of 13 Citrus Species Peels And Tissue, *Pak. J.Pharm. Sci.*, 22 (3), 277-281.
- Juniarti, Delvi O., Yuhernita, 2009, Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) dan Antioksidan (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius* L.), *Journal*, (online), ([http://journal.ui.ac.id/upload/artikel/10\\_Edit1\\_JUNIARTI\\_KANDUNGAN%20SENYAWA%20KIMIA\\_Layout.pdf](http://journal.ui.ac.id/upload/artikel/10_Edit1_JUNIARTI_KANDUNGAN%20SENYAWA%20KIMIA_Layout.pdf), diakses tanggal 25 Desember 2010).
- Jusoh, A. Z., Radzali, M., Johari, R., and Mohd, A. S., 2001, Antimicrobial property of methanolic extract of *Citrus mitis* seeds, *CABI*, 102-105, (online), (<http://www.cabdirect.org> diakses 28 maret 2011).
- Meyer, B. N., Ferrigi, N. R., Putra J.G. dan Jacobsen L. B., Nicols, D. E., dan Mc Laugin, J. L., 1982, *Brine Shrimp*, A Conventoins General Bioassay for Active Plant Constituen, *Planta Medica*.
- Pelczar, M. J., Chan, E. C. S., 1988, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, diterjemahkan oleh Hadioetomo, R. S., Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Roowi, Suri, 2001, Production and antibacterial properties of flavour and flavonoid compounds from cultured tissues of *Citrus hystrix* D. C. ('Limau Purut'), *Tesis*, Universiti Putra Malaysia, (online), (<http://psasir.upm.edu.my/cgi/search> diakses 28 Maret 2011).
- Stahl W, Sies H. 1995. Uptake Of Lycopene And Its Geometrical Isomers Is Greater From Heat Processed Than From Unprocessed In Humans. *J Nutr* 122:2161–2166.
- Tao, Neng-guo; Liu, Yue-jin; Zhang, Miao-Ing, 2009, Chemical Composition and Antimicrobial Activitiesn of Essential Oil From The Peel Of Bingtang Sweet Orange (*Citrus sinensis* Osbeck), *International Journal of Science and Technology*, 4 (7), Blackwell Publishing.
- Tjay, T. H. dan Rahardja, K., 1986, *Obat-obat penting khasiat, penggunaan dan efek samping*, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.