

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak etanol kulit jeruk bali (*Citrus grandis*) sebagai antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*. Selain untuk mengetahui hubungan antara ekstrak etanol kulit jeruk bali dengan pertumbuhan *P. aeruginosa*, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol kulit jeruk bali terhadap *P. aeruginosa*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *tube dilution test* untuk mengetahui KHM dan dengan menggunakan media *Nutrient Agar Plate* (NAP) untuk menentukan KBM.

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dengan cara ekstraksi metode *macerasi* pada 200 gram kulit jeruk bali kering. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Brawijaya. Ekstrak kulit jeruk bali ini menggunakan pelarut etanol 96%, karena etanol relatif tidak merusak senyawa kimia aktif yang terdapat dalam kulit jeruk bali. Dari hasil ekstraksi diperoleh campuran zat padat dan cair yang berwarna coklat gelap. Untuk menentukan bahwa ekstrak merupakan ekstrak yang steril maka pada penelitian pendahuluan dilakukan uji terhadap bahan ekstrak. Hasil uji tersebut menunjukkan ekstrak tersebut steril.

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sebelum digunakan untuk penelitian, *P. aeruginosa* diidentifikasi terlebih dahulu dengan pewarnaan Gram dan *Microbact System test*. Hasil identifikasi bakteri dari

pewarnaan Gram, didapatkan gambaran sel bakteri yang berbentuk basil (batang) dan berwarna merah (Gram negatif). Sedangkan pada identifikasi menggunakan *microbact test* menunjukkan 87,29% positif bakteri tersebut merupakan bakteri *P. aeruginosa*

Sebelum melakukan penelitian ini, dilakukan penelitian pendahuluan terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi ekstrak yang akan digunakan dalam penelitian ini. Pada eksplorasi dosis pertama, digunakan konsentrasi serial ekstrak 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 1,56% yang kemudian ditambahkan biakkan bakteri sejumlah 1ml sehingga didapatkan konsentrasi akhir 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%. Pada eksplorasi ini didapatkan hasil masih didapatkan pertumbuhan bakteri pada semua konsentrasi, namun pada konsentrasi 1,56% sudah tampak penghambatan pertumbuhan ditandai dengan berkurangnya pertumbuhan bakteri secara signifikan antara konsentrasi 1,56% dan 0,78%. Oleh karena itu, pada eksplorasi dosis kedua digunakan konsentrasi yang berkisar di konsentrasi akhir 1,56%, yaitu 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% dan 3%. Dari eksplorasi dosis kedua tidak didapatkan penghambatan yang signifikan pada semua konsentrasi. Oleh karena tidak didapatkannya penghambatan, maka pada eksplorasi dosis ketiga, rentang konsentrasi dinaikkan menjadi 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, dan 5%. Pada eksplorasi dosis ketiga, didapatkan penghambatan pada semua konsentrasi, ditandai dengan tidak ada bakteri yang tumbuh atau mati pada setiap konsentrasi. Oleh karena eksplorasi dosis ketiga yang terlalu signifikan maka untuk eksplorasi keempat rentang dosis dikembalikan ke awal yaitu 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%.

Pada eksplorasi dosis keempat, didapatkan hasil penghambatan pada semua konsentrasi, ditandai dengan sedikitnya koloni bakteri yang tumbuh pada

setiap konsentrasi. Untuk menjaga dan melihat kestabilan ekstrak, maka pada eksplorasi kelima, rentang konsentrasi dibiarkan tetap seperti sebelumnya. Pada eksplorasi dosis kelima, didapatkan hasil dengan perbedaan koloni yang signifikan, yaitu 2291 koloni pada konsentrasi 1%, 565 koloni pada konsentrasi 1,5%, 171 koloni pada konsentrasi 2%, 1 koloni pada konsentrasi 2,5%, dan 0 koloni pada konsentrasi 3%. Oleh karena hasil eksplorasi kelima yang signifikan, maka ditentukan konsentrasi yang tepat pada penelitian ini yaitu 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%. Dalam penelitian ini menggunakan 6 macam perlakuan (konsentrasi 0%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%), sehingga pengulangan yang dibutuhkan adalah empat kali pengulangan (Solimun, 2001)

Kadar Hambat Minimum (KHM) pada penelitian ini diperoleh secara kualitatif dengan melihat kejernihan dari tabung reaksi yang berisi campuran antara kultur bakteri dan ekstrak dengan berbagai konsentrasi setelah diinkubasikan selama 24 jam. Pada penelitian ini didapatkan Kadar Hambat Minimum pada kisaran konsentrasi ekstrak 1,5%. Hal tersebut ditandai dengan warna cairan dalam tabung reaksi dengan konsentrasi 1,5% yang tampak jernih. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas hambatan pertumbuhan bakteri oleh ekstrak etanol kulit jeruk bali yang mulai muncul pada konsentrasi 1,5% dengan cara menghambat sintesis Asam Nukleat, sintesa DNA, sintesa RNA, menghambat fase replikatif bakteri, dan menghambat pertumbuhan bakteri secara umum.

Setelah menentukan KHM, dilanjutkan dengan menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) secara kuantitatif dengan penghitungan koloni *P. aeruginosa* pada NAP. Hasil dilusi tabung digoreskan pada NAP dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C. KBM ditentukan dengan melihat pertumbuhan koloni pada media NAP. Dari penanaman pada NAP, didapatkan kadar bunuh pada pene-

litian ini terdapat pada konsentrasi 3%, di mana tidak didapatkan pertumbuhan koloni sama sekali. Sebelum menentukan KBM, telah dilakukan penghitungan jumlah koloni pada masing-masing konsentrasi.

Pada konsentrasi 1% pertumbuhan koloni hampir sama dengan konsentrasi 0% (Kontrol Positif). Pada konsentrasi 1% pertumbuhan koloni masih cukup banyak, sedangkan konsentrasi 1,5% jumlah koloni menurun secara signifikan. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi 1,5% ekstrak etanol kulit jeruk bali mulai bekerja dengan baik pada sel bakteri yang mengakibatkan rusaknya sintesa asam nukleat yang berakhir pada lisisnya bakteri itu sendiri, dengan kata lain pada konsentrasi 1,5%, pertumbuhan bakteri mulai terhambat, sedangkan pada konsentrasi 3%, sudah tidak ada lagi pertumbuhan bakteri dengan ditandai tidak adanya koloni bakteri sama sekali.

Penelitian lain yang menggunakan ekstrak kulit jeruk bali (*Citrus grandis*) seperti yang dilakukan Tao,dkk (2010) menyebutkan bahwa ekstrak etanol 95% kulit jeruk bali memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* dengan metode *disk diffusion*. Zona hambat yang dihasilkan untuk menentukan KHM pada penelitian tersebut sebesar 6,20 mm pada konsentrasi 70 µg/ml untuk *Bacillus Subtilis* dan sebesar 6,30 mm pada konsentrasi 35 µg/ml untuk *Staphylococcus aureus*. Dari penelitian yang sama, didapatkan pula hasil aktivitas antibakteri ekstrak etanol 95% kulit jeruk bali pada bakteri gram negatif *Eschericia coli* dengan zona hambat sebesar 6,47 mm pada konsentrasi 18,75 µg/ml.

Pada penelitian oleh Mokbel dan Hashinaga (2005) yang meneliti pengaruh ekstrak kulit jeruk bali pada bakteri gram negatif *Eschericia coli* dan *Salmonella enteritidis* dengan pelarut ekstraksi *ethyl-acetate* dan metanol menunjukkan ba-

hwa aktivitas antibakteri pada ekstrak kulit jeruk bali dengan pelarut *ethyl-acetate* memiliki zona hambat sebesar 5 mm pada konsentrasi 350 µg/ml, sedangkan dengan metanol memiliki zona hambat sebesar 6 mm pada konsentrasi 300 µg/ml.

Dubey, dkk (2011) meneliti tentang efek antibakteri kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode *disk difussion*. Pada penelitian tersebut didapatkan zona hambat untuk bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 8 mm pada konsentrasi ekstrak 25%. Sedangkan untuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 6 mm pada konsentrasi ekstrak 50%.

Penelitian lain yang dilakukan Adedeji (2007) mengenai prevalensi paparan beberapa jenis ekstrak jeruk terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa jenis jeruk seperti lemon (*Citrus lemon*) dan lime (*Citrus aurantifolia*) memiliki aktivitas antibakteri pada konsentrasi 25%. Sedangkan pada *Citrus paradisi* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* tapi tidak terlalu signifikan.

Berdasarkan pemaparan di atas, dapat ditarik kesimpulan bahwa kulit jeruk bali dapat digunakan sebagai antibakteri terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif. Namun, dapat ditemukan perbedaan KHM dan KBM pada penelitian-penelitian yang telah disebutkan. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh faktor tanah dan iklim di mana jeruk bali itu tumbuh, serta nutrisi yang diperoleh. Hal lain yang dapat menimbulkan perbedaan KHM dan KBM adalah metode dan pelarut yang digunakan dalam membuat ekstrak kulit jeruk bali. Dapat disimpulkan juga bahwa etil asetat lebih efektif sebagai pelarut senyawa aktif yang akan digunakan sebagai antibakteri dibanding pelarut n-heksana dan

pelarut yang digunakan pada penelitian ini yaitu etanol. Hal ini mungkin disebabkan oleh perbedaan polaritas dan titik didih dari masing-masing pelarut. Etil asetat yang bersifat semi-polar dapat menarik senyawa organik untuk hasil ekstrak lebih banyak dibanding n-heksana yang bersifat non-polar. Sedangkan etanol tidak terlalu polar dibanding kedua pelarut tersebut. Sehingga semakin polar suatu pelarut, memungkinkan juga meningkatnya sifat antibakteri dari hasil ekstraksinya (Watson, 2007).

Data jumlah koloni yang diperoleh dengan 4 kali pengulangan kemudian dianalisis dengan uji statistic menggunakan software SPSS 17,0. Pada setiap pengulangan didapatkan jumlah koloni yang berbeda-beda. Hal ini mungkin saja terjadi pada saat pemindahan bakteri dari tabung ke *plate* untuk ditanam atau mungkin saja konsentrasi ekstraknya kurang tepat. Untuk menghindari atau memperkecil bias tersebut, maka dilakukan pengulangan. Uji statistik yang digunakan meliputi uji beda non-parametrik Kruskal Wallis, uji multikomparasi Mann Whitney, dan uji korelasi non-parametrik Spearman. Semua analisis dihitung berdasarkan batas kepercayaan 95%, artinya kemungkinan kesalahan hasil penelitian berkisar 5%. Berdasarkan uji Kruskal Wallis didapatkan nilai signifikansi yaitu $p = 0,000$ ($p < 0,05$), menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi ekstrak mengakibatkan perbedaan jumlah koloni bakteri.

Uji multi-komparasi Mann Whitney guna melihat apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri antara dua macam dosis yang berbeda. Hasilnya didapatkan *p-values* yang signifikan ($p < 0,05$) pada hamper semua perbandingan antar masing-masing konsentrasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah koloni yang bermakna pada semua kelompok perlakuan jika dibandingkan antar kelompok perlakuan.

Uji korelasi non-parametrik Spearman dilakukan untuk melihat korelasi antara konsentrasi antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah koloni bakteri. Hasil uji menunjukkan nilai signifikansi (*p-value*) 0,000, sehingga konsentrasi ekstrak memiliki korelasi dengan jumlah koloni bakteri ($0,000 < 0,050$). Selain menghasilkan nilai signifikansi korelasi antara kedua variabel, uji korelasi non-parametrik Spearman juga menunjukkan *Spearman correlation coefficient* (*r*) yang menunjukkan kekuatan korelasi antara dua variabel. Korelasi lemah ditunjukkan jika $r < 0,500$, korelasi sedang jika $r = 0,500-0,599$, korelasi kuat jika $r = 0,600-0,799$, dan korelasi sangat kuat jika $r > 0,799$. Pada penelitian ini didapatkan hasil uji $r = - 0,984$, hal tersebut menunjukkan terdapat korelasi sangat kuat antara kedua variabel ($0,984 > 0,799$). Tanda negatif pada *Spearman correlation coefficient* penelitian ini menunjukkan korelasi di antara kedua variabel adalah berbanding terbalik, dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin rendah jumlah koloni bakteri.

Jumlah koloni bakteri dipengaruhi oleh paparan ekstrak, selain itu dipengaruhi juga oleh faktor lain, seperti waktu penyimpanan ekstrak yang lama sehingga menurunkan daya kerjanya, resistensi bakteri terhadap ekstrak, suhu pada saat penyimpanan ekstrak, atau adanya kesalahan lain yang dilakukan saat penelitian. Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit jeruk bali dengan kandungan flavonoidnya berupa hesperidin, myricetin, dan naringinnya mempunyai efek anitibakteri terhadap bakteri, khususnya *Pseudomonas aeruginosa*, dengan hasil yang memiliki korelasi sangat kuat.

Fakta penurunan jumlah koloni *P. aeruginosa* dalam penelitian ini diduga karena efek dari senyawa-senyawa kimia aktif yang berasal dari ekstrak kulit jeruk bali. Kulit jeruk bali mengandung beberapa senyawa-senyawa kimia aktif

pada flavonoidnya seperti hesperidin, myricetin, diosmin, naringin, dan tangeretin. Senyawa-senyawa tersebut memiliki sifat antibakteri dengan mekanisme yang berbeda-beda.

Flavonoid adalah polifenol yang hanya dapat disintesis dari tanaman. Senyawa flavonoid ini memiliki manfaat sebagai antioksidan sekaligus sebagai antibakteri. Karena bermanfaat sebagai antioksidan, flavonoid dapat memperlambat maupun mencegah timbulnya penyakit, seperti penyakit-penyakit yang diinduksi oleh radikal bebas (Sellapan *and* Akoh, 2002). Senyawa flavonoid mempunyai kerja menghambat enzim topoisomerase II pada bakteri serta berikatan dengan protein bakteri. DNA gyrase termasuk salah satu dari enzim kelas topoisomerase II. DNA gyrase memilin untaian dari DNA, dengan menguraikan untaian DNA. Selain itu flavonoid dapat membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler bakteri sehingga terjadi denaturasi protein (Robinson, 1991; Cowan, 1999; Melderer, 2002).

Hesperidin adalah salah satu flavonoid yang dapat ditemukan pada kulit jeruk. Hesperidin telah dilaporkan memiliki berbagai sifat farmakologi seperti antioksidan, antiviral, dan antibakterial. Hesperidin dan Hesperitin, salah satu aglikonnya, dapat memperlihatkan aktifitas antiinfeksi dan antireplikatif pada beberapa bakteri secara *in vitro*. Mekanisme Hesperidin dalam melawan bakteri adalah dengan menghambat aktifitas pertumbuhan bakteri (Garg *et al.*, 2001)

Myricetin merupakan salah satu flavonol aktif yang terdapat pada kulit jeruk. Myricetin telah dapat menunjukkan adanya aktifitas antibakteri, tetapi efek terhadap targetnya sulit untuk ditentukan. Efeknya sulit ditentukan karena flavonoid tersebut cenderung mengagregasi, menempel pada permukaan kontainer, dan melumpuhkan enzim yang diuji menjadi inaktif dengan

mekanismenya. Namun, dengan seiringnya perkembangan dan penelitian yang teliti, telah menunjukkan Myricetin dapat menghambat variasi *DNA polymerase*, *RNA polymerase*, *reverse transcriptase*, dan *telomerase* (Griep *et al.*, 2007). Secara umum, mekanisme Myricetin dalam melawan bakteri adalah dengan menghambat sintesis asam nukleatnya. Sintesa lemak dan lipid juga dapat dihambat tetapi dalam jumlah yang kecil (Cushnie *and* Lamb, 2005).

Naringin terdapat dalam kulit jeruk, walaupun jumlahnya lebih banyak pada buahnya. Naringin telah dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan KHM antara 4-512 µg/ml. Beberapa studi telah mengatakan bahwa naringin mempunyai sifat antibakteri terutama pada bakteri gram positif, tetapi aksi dari naringin belum terlalu jelas dipelajari (Celiz *et al.*, 2012).

Berdasarkan pemaparan di atas, dapat diketahui bahwa kulit jeruk bali ternyata dapat bermanfaat sebagai zat antibakteri. Kandungan dalam flavonoidnya seperti hesperidin, naringin dan myricetin pada kulit jeruk bali berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*. Penelitian ini memiliki validitas internal yang tinggi sebab menunjukkan korelasi yang kuat antar variabel saat dilakukan uji statistik. Namun, penelitian ini memiliki kelemahan yaitu faktor eksternal yang masih rendah, oleh sebab itu masih sulit diaplikasikan secara klinis. Meskipun penelitian ekstrak kulit jeruk bali mempunyai efek terhadap *P. aeruginosa* secara *in vitro*, namun masih diperlukan uji lebih lanjut tentang farmakokinetik, farmakodinamik, toksisitas, dan efek ekstrak ini pada hewan coba lain dan *clinical trial* pada manusia. Selain itu, perbedaan geografi mempengaruhi kandungan bahan aktif pada kulit jeruk bali begitu juga metode ekstraksinya. Sehingga penelitian ini masih belum dapat diaplikasikan secara langsung dalam kasus-kasus infeksi yang disebabkan oleh bakteri *P.*

aeruginosa serta perlu diteliti lebih lanjut mengenai metode dan bahan pelarut untuk mendapatkan ekstrak yang lebih murni dan mengandung bahan aktif dalam jumlah yang lebih tinggi. Sehingga masih diperlukan penelitian yang lebih luas dari penelitian ini agar nantinya dapat diaplikasikan secara klinis pada manusia.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk bali memiliki efek antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk bali, maka semakin rendah tingkat pertumbuhan *P. aeruginosa* yang ditandai dengan jumlah koloni yang semakin sedikit. Dengan demikian, hipotesis penelitian terbukti benar.

