

AKTIVITAS ANTIBAKTERI *Shigella dysenteriae* DARI DAUN JERUK BALI (*Citrus maxima*) BERDASARKAN PERBEDAAN METODE EKSTRAKSI**Novi Fajar Utami¹⁾, Oom Komala²⁾, Eki Andaresta³⁾**^{1,3)}Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA – Universitas Pakuan²⁾Program Studi Biologi, Fakultas MIPA – Universitas Pakuan
Bogor, Jawa Barat

Naskah diterima tanggal 26 Desember 2019

ABSTRACT

Pomelo leaves (Citrus maxima) contain secondary metabolites i.e. flavonoids and saponins. Based on several studies, flavonoids and saponins can act as antibacterial. Based on these indications, it is important to do research on the antibacterial potential of pomelo leaf extract (Citrus maxima) against Shigella dysenteriae bacteria. This study aims to determine the antibacterial activity of 96% ethanol extract of pomelo leaves as a result of maceration and reflux methods to Shigella dysenteriae and determine the total flavonoid content of 96% ethanol extract of pomelo leaves as a result of maceration and reflux methods. This study was an experimental study by determining the total flavonoid content of pomelo leaf extract and testing the antibacterial activity of pomelo leaf extract resulting from maceration and reflux as measured by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Zone of Inhibition (ZOI) against Shigella dysenteriae bacteria. The results of the study it was obtained 89.9 g of reflux extract with a yield of 17.98±0.39% and maceration yield of 95.45 g with a yield of 19.09±0.49%. Flavonoid content of pomelo leaf extract from reflux was 1.49±0.01% while maceration yield was 2.28±0.10%. Pomelo leaf extract from reflux and maceration did not provide inhibition at concentrations of 5% to 30%, the results showed that MIC from both extraction methods was at a concentration of 35%. The highest ZOI was found in the 45% which was 10.92±0.08 mm on the results of the reflux method and 9.15±0.03 mm on the results of the maceration method. The conclusion of this study is that the extract from reflux results in greater ZOI and biggest of flavonoids content.

Keywords: *Citrus maxima, flavonoids, maceration, reflux, Shigella dysenteriae***ABSTRAK**

Daun jeruk bali (*Citrus maxima*) mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid dan saponin. Berdasarkan beberapa penelitian, flavonoid dan saponin dapat berperan sebagai antibakteri. Berdasarkan indikasi tersebut, maka penting dilakukan penelitian tentang potensi antibakteri ekstrak daun jeruk bali (*Citrus maxima*) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun jeruk bali hasil metode maserasi dan refluks terhadap *Shigella dysenteriae* serta menentukan kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% daun jeruk bali hasil metode maserasi dan refluks. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menentukan kadar flavonoid total ekstrak daun jeruk bali serta menguji aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk bali hasil maserasi dan refluks yang diukur dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Diameter Daerah Hambat (DDH) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*. Dari hasil penelitian didapatkan ekstrak hasil refluks sebanyak 89,9 g dengan rendemen sebesar 17,98±0,39% serta hasil maserasi sebanyak 95,45 g dengan rendemen sebesar 19,09±0,49%. Kandungan flavonoid ekstrak daun jeruk bali hasil refluks sebesar 1,49±0,01% sedangkan hasil maserasi sebesar 2,28±0,10%. Ekstrak daun jeruk bali hasil refluks dan maserasi tidak memberikan daya hambat pada konsentrasi 5% sampai 30%, KHM kedua metode ekstraksi berada pada konsentrasi 35%. DDH kedua metode ekstraksi terbesar terdapat pada konsentrasi 45% yaitu sebesar 10,92±0,08 mm pada hasil metode refluks dan 9,15±0,03 mm pada hasil metode maserasi. Kesimpulan penelitian ini yaitu ekstrak hasil refluks memberikan DDH yang lebih besar serta kadar flavonoid yang lebih tinggi.

Kata Kunci : *Citrus maxima, flavonoid, maserasi, refluks, Shigella dysenteriae*

PENDAHULUAN

Bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan penyebab disentri. Disentri merupakan salah satu jenis penyakit diare akut yang disertai dengan tinja cair yang bercampur dengan darah dan lendir yang disebabkan oleh bakteri (Munfaati dkk., 2015). Salah satu tanaman yang dapat bermanfaat sebagai antibakteri yaitu daun jeruk bali (*Citrus maxima*). Daun jeruk bali mengandung metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, fenol, steroid, triterpenoid dan saponin (Azizah dkk., 2015). Senyawa flavonoid dan saponin dapat berguna sebagai antibakteri. Flavonoid memiliki mekanisme kerja mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi sedangkan saponin akan merusak membran sitoplasma dan membunuh sel (Aiello, 2012).

Ekstraksi merupakan kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain (Depkes RI, 2000). Maserasi memiliki kelebihan yaitu proses pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana serta mudah didapat sedangkan refluks memiliki kelebihan yaitu dapat digunakan untuk mengekstraksi sampel yang mempunyai tekstur kasar dan tahan pemanasan langsung. (DepKes RI, 1986).

Pelarut yang digunakan yaitu etanol 96% yang dapat menarik zat aktif pada daun jeruk bali yang bersifat polar. Etanol dapat melarutkan hampir semua metabolit sekunder, khususnya untuk senyawa-senyawa yang banyak mengandung gugus hidroksil (-OH) dan yang bersifat polar (Manaari dkk., 2014).

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang bersifat koagulator protein (Dwidjoseputro, 1998), senyawa flavonoid dalam merusak membran sel bakteri yaitu membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler sehingga membran sel bakteri rusak dan diikuti dengan masuknya air yang tidak terkontrol ke dalam sel bakteri, hal ini menyebabkan pembengkakan dan akhirnya membran sel bakteri pecah (Black dan Jacobs, 1993).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan Maret 2019 bertempat di Laboratorium Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan, Bogor.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan meliputi: alat gelas (Pyrex®), autoklaf (All American®), alat

refluks, botol maserasi, bunsen, cawan uap, cawan petri (Pyrex®), grinder (Airlux®), inkubator (Mettler®), kertas cakram (whatmann nomor 40), krus, mikropipet (Proline plus®), neraca digital (Lab pro®), vacuum dryer (OSK 6513®), oven (Mettler®), ayakan mesh 40, tanur (Vulcan A-550®), spektrofotometer UV-Vis (V-730®), lemari pendingin (LG).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini: daun jeruk bali (*Citrus maxima*), etanol 96%, etanol pro analis (p.a.), akuades steril, nutrient agar, akuades, *Shigella dysenteriae*, kloramfenikol, quersetin, $AlCl_3$, HCl, Na asetat, spirtus, NaCl 0,9%.

Pembuatan Simplisia

Daun jeruk bali dipisahkan dari bagian lainnya, kemudian dilakukan pencucian dengan air mengalir yang bersih dan dikeringkan menggunakan oven hingga kering. Setelah kering bahan tersebut dipisahkan dari pengotor lalu dihaluskan hingga berupa serbuk dan diayak menggunakan mesh 40.

Pembuatan Ekstrak Etanol

a. Maserasi

Metode maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia daun jeruk bali sebanyak 500 g dalam 5.000 mL pelarut etanol 96% (1:10), kemudian dilakukan pengocokan setiap 6 jam sekali dalam waktu 24 jam, lalu disaring untuk memisahkan ampas dan filtrat, kemudian ampas tersebut dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96%, proses maserasi dilakukan selama 4 hari, kemudian hasil masing-masing filtrat disatukan dan dievaporasi menggunakan *Vacuum dryer* pada suhu 45°C hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1986).

b. Refluks

Metode refluks dilakukan dengan cara memasukkan 500 g simplisia daun jeruk bali ke dalam labu dasar bulat, kemudian ditambahkan 5.000 mL etanol 96%. Labu dasar bulat kemudian diset alat refluks dan serbuk simplisia direfluks selama 6 jam pada suhu 70°C. Hasil refluks disaring sehingga diperoleh ekstrak daun jeruk bali. Ekstrak daun jeruk bali hasil refluks kemudian dievaporasi menggunakan *Vacuum dryer* pada suhu 45°C hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1986).

UJI FITOKIMIA

a. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 g sampel ditambahkan 1 mL HCl 2 N dan 9 mL akuades, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit didinginkan dan disaring. Kemudian di uji dengan 3 pereaksi alkohol yaitu pereaksi bouchardat, dragendrof dan pereaksi mayer. Hasil uji positif diperoleh bila terbentuk endapan coklat merah dengan

bouchardat, endapan merah hingga jingga dengan dragendrof dan endapan putih kekuningan dengan pereaksi mayer (Hanani, 2015).

b. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 g sampel dilarutkan dalam 5 mL etanol 96%. Larutan sampel diambil 2 mL, ditambahkan sedikit 0,1 g serbuk Mg, dan ditambahkan 10 tetes HCl pekat dari sisi tabung serta dikocok perlahan. Warna merah atau jingga terbentuk menunjukkan adanya flavonoid, jika terjadi warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, khalkol, dan auron. (Hanani, 2015).

c. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan, dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya buih hingga stabil selama tidak kurang dari 1 menit (Hanani, 2015).

d. Uji Tanin

Sebanyak 0,2 g sampel dilarutkan dalam 2 mL akuades di dalam sebuah tabung uji. Dua atau tiga tetes larutan FeCl_3 1% ditambahkan ke dalam larutan ekstrak tersebut. Jika terbentuk warna biru-hijau maka ekstrak tersebut mengandung tanin (*Cathecin tanin*). Sedangkan jika terbentuk biru hitam maka ekstrak tersebut mengandung tanin (*Galic tanin*) (Hanani, 2015).

PENETAPAN KADAR FLAVONOID

Penetapan kadar flavonoid dilakukan sesuai metode *Chang et al.*, 2002. Berikut merupakan tahapannya:

a. Pembuatan Larutan Pereaksi

Pembuatan larutan pereaksi, meliputi:

1. Pembuatan Natrium Asetat 1 M ditimbang dengan seksama 8,2 gram natrium asetat, kemudian dilarutkan dengan air suling sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL, lalu diaduk hingga homogen.
2. Pembuatan Aluminium Klorida 10%
Ditimbang dengan seksama 10 gram aluminium klorida, kemudian dilarutkan dengan natrium asetat hingga larut, lalu ditambahkan akuades sampai tanda batas pada labu ukur 100mL.
3. Pembuatan Larutan Blanko
Ke dalam labu ukur 25 mL dipipet 2,5 mL aluminium klorida 10%, kemudian ditambahkan 2,5 mL natrium asetat 1 M dan ditambahkan 15 mL etanol p.a. lalu ditambahkan akuades sampai tanda batas.
4. Pembuatan Standar Induk Quersetin 100 ppm
Dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL quersetin 100 mg yang sudah ditimbang seksama lalu dilarutkan dengan etanol p.a. sampai tanda batas kemudian dihomogenkan (1000 ppm). Untuk mendapatkan larutan standar

quersetin 100 ppm, dilakukan dengan cara dipipet 10 mL larutan standar 1000 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian dilarutkan dengan etanol p.a. sampai tanda batas (100 ppm).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebanyak 5 mL larutan standar quersetin dalam etanol konsentrasi 100 ppm dimasukkan dalam labu ukur 50 mL, ditambahkan 15 mL etanol p.a., lalu ditambahkan 1 mL aluminium klorida 10%, 1 mL natrium asetat 1 M dan air suling sampai batas. Dikocok homogen lalu didiamkan selama 30 menit, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-450 nm menggunakan spektrofotometer.

c. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Sebanyak 5 mL larutan standar quersetin 100 ppm dimasukkan dalam labu ukur 50 mL, ditambahkan 15 mL etanol p.a., lalu ditambahkan 1 mL aluminium klorida 10%, 1 mL natrium asetat 1 M dan akuades sampai batas. Kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu kamar. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum pada 5, 10, 15, 20, 25, 30 menit dan 35 menit, sehingga didapat waktu optimum yang stabil.

d. Penentuan Kurva Standar

Deret standar quersetin 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm dibuat dari larutan 100 ppm, sebanyak 1, 2, 3, 4, 5 mL larutan standar 100 ppm dipipet ke dalam labu ukur 50 mL. Kemudian ditambahkan etanol p.a. 15 mL, lalu ditambahkan 1 mL aluminium klorida 10%, 1 mL natrium asetat 1 M dan diencerkan dengan akuades sampai batas. Dikocok homogen lalu dibiarkan selama waktu optimum, diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

Pengukuran absorbansi tersebut dibuat kurva antara konsentrasi larutan standar quersetin dengan nilai absorbansi yang diperoleh dan akan dihasilkan persamaan regresi linier ($y = bx + a$). Persamaan regresi ini untuk menghitung kadar ekstrak (ppm) dengan memasukkan absorbansi ekstrak sebagai nilai y ke dalam persamaan.

e. Penetapan Kadar Flavonoid

Sebanyak 50 mg ekstrak kental etanol 96% daun jeruk bali ditimbang lalu dilarutkan dengan etanol p.a. sampai 50 mL. Dipipet sebanyak 10 mL dari larutan ekstrak ke dalam labu ukur 50 mL lalu ditambahkan etanol p.a. sebanyak 15 mL, ditambahkan 1 mL aluminium klorida 10%, 1 mL natrium asetat 1 M dan akuades sampai batas. Dikocok homogen lalu didiamkan selama waktu optimum, lalu serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Chang *etal.*, 2002). Absorbansi yang dihasilkan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dari

kurva standar quersetin (Saifudin dkk., 2011).

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI

1. Penyiapan Inokulum

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk pengujian disterilkan dengan cara dibungkus kertas polos terlebih dahulu, dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian alat-alat dimasukkan ke dalam oven untuk dikeringkan pada suhu 100°C selama 30 menit.

b. Pembuatan Media Bakteri

Media bakteri yang digunakan yaitu nutrient agar. Dalam 1 L akuades dicampurkan dengan 28 g medium agar lalu suspensikan. Diaduk agar homogen, sterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C, kemudian dituang sebanyak 20 mL ke dalam cawan petri di dekat api bunsen, di simpan plate media nutrient agar pada inkubator dengan suhu 30°C (perlakuan uji sterilisasimedia).

c. Penyiapan Isolat Bakteri

Penyiapan isolat bakteri, meliputi:

1. Peremajaan Bakteri

Secara aseptis diambil isolat bakteri ke dalam nutrient agar lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. (Disimpan biakan yang sudah tumbuh pada suhu 4°C di lemari pendingin sebagai stok).

2. Pengenceran Bakteri

Pengenceran bakteri untuk pengujian antibakteri digunakan bakteri dengan konsentrasi 10⁶, perlakuan ini harus selalu dekat dengan api bunsen. Cara pengenceran bakteri, yaitu:

a. Dibuat 1 mL suspensi bakteri dengan kekeruhan yang sama dengan 1 McFarland.

b. Dilakukan pengenceran bakteri, menggunakan enam (6) tabung reaksi yang berisi 9 mL larutan fisiologis (NaCl 0,9%).

c. Pada tabung pertama, dimasukkan 1 mL suspensi bakteri, kemudian diencerkan menggunakan 9 mL larutan fisiologis, diaduk hingga homogen, didapat bakteri dengan konsentrasi 10¹.

d. Pada tabung kedua, dimasukkan 1 mL suspensi bakteri dari tabung pertama, kemudian diencerkan menggunakan 9 mL larutan fisiologis, diaduk hingga homogen, didapat bakteri dengan konsentrasi 10².

e. Pada tabung ketiga, dimasukkan 1 mL suspensi bakteri dari tabung kedua, kemudian diencerkan menggunakan 9 mL larutan fisiologis, diaduk hingga homogen, didapat bakteri dengan konsentrasi 10³.

f. Pada tabung keempat, dimasukkan 1 mL suspensi bakteri dari tabung ketiga, kemudian diencerkan menggunakan 9 mL larutan fisiologis, diaduk hingga homogen, didapat bakteri dengan konsentrasi 10⁴.

g. Pada tabung kelima, dimasukkan 1 mL suspensi bakteri dari tabung keempat, kemudian diencerkan menggunakan 9 mL larutan fisiologis, diaduk hingga homogen, didapat bakteri dengan konsentrasi 10⁵.

h. Pada tabung keenam, dimasukkan 1 mL suspensi bakteri dari tabung kelima, kemudian diencerkan menggunakan 9 mL larutan fisiologis, diaduk hingga homogen, didapat bakteri dengan konsentrasi 10⁶.

i. Media biakan nutrient agar diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah bakteri tumbuh, biakan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C sebagai stok.

2. Pembuatan Larutan Uji dan Pembeding

a. Larutan Uji

Dibuat bermacam-macam konsentrasi ekstrak daun jeruk bali yaitu 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% dan 45% menggunakan pelarut DMSO 10% 1 mL lalu ditambahkan akuades hingga tanda batas labu ukur 10 mL.

b. Larutan Pembeding

Kloramfenikol 10 ppm digunakan sebagai kontrol positif untuk bakteri *Shigella dysenteriae* serta DMSO dan akuades sebagai kontrol negatif. Kloramfenikol 10 ppm diperoleh dengan cara melarutkan 100 mg kloramfenikol dalam akuades sampai 100 mL pada labu ukur. Kemudian dipipet 1 mL dari larutan tersebut dan diencerkan kembali dalam 100 mL akuades, didapat konsentrasi 10 ppm.

3. Uji Antimikroba

a. Pembuatan Kertas Cakram

Kertas saring whatman no. 40 dipotong menjadi kertas cakram dengan diameter 6 mm, disimpan pada cawan petri lalu disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Direndam kertas cakram dalam ekstrak, kontrol positif dan kontrol negatif selama 24 jam, lalu dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C. Ditetesi 20 µL ekstrak lalu dikeringkan menggunakan oven.

b. Uji Diameter Daerah Hambat

Digunakan metode difusi Kirby Bauer untuk uji sensitivitas. Pada metode ini dilihat daerah atau zona bening yang dihasilkan di sekitar kertas cakram. Pada media nutrient agar hangat ditambahkan 0,2 mL bakteri, aduk hingga homogen dan didiamkan agar memadat, lalu kertas cakram yang sudah bercampur dengan ekstrak pada konsentrasi 35%, 40% dan 45% diletakkan pada permukaan agar kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, diukur dengan jangka sorong zona bening di sekitar cakram.

c. Uji Konsentrasi Hambat Minimum

Pada 20 mL media nutrient agar dimasukan bakteri *Shigella dysenteriae* sebanyak 0,2 mL, lalu ditambahkan 1 mL ekstrak pada konsentrasi uji, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator, diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri setelah inkubasi. Menurut Hadioetomo (1985) konsentrasi terendah dari ekstrak yang tidak menyebabkan pertumbuhan bakteri pada cawan petri merupakan konsentrasi hambat minimum (KHM).

PARAMETER YANG DIAMATI

1. Menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak daun jeruk bali berdasarkan perbedaan metode ekstraksi (maserasi dan refluks) sebagai antibakteri.
2. Menentukan Diameter Daerah Hambat (DDH) dari ekstrak daun jeruk bali sebagai antibakteri.
3. Menentukan kadar senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun jeruk bali.

ANALISIS DATA

Analisis data digunakan untuk mengetahui pengaruh metode ekstraksi terhadap diameter daerah hambat serta menyimpulkan hasil penelitian. Pada penelitian ini digunakan metode eksperimen Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 2 metode ekstraksi (maserasi dan refluks), 5 perlakuan (35%,

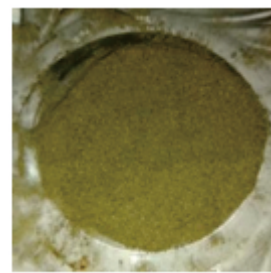
40%, 45%, kontrol positif dan kontrol negatif) dan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Kemudian dilakukan uji lanjut Duncan untuk mengetahui adanya pengaruh antar perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

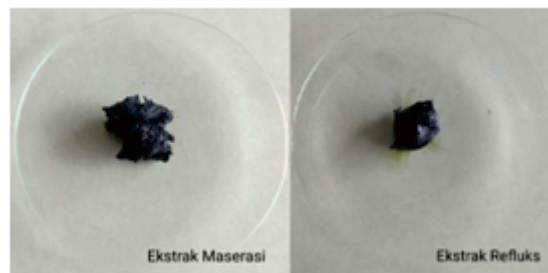
Pada penelitian ini digunakan 5.500 g daun jeruk bali segar, lalu diperoleh simplisia serbuk daun jeruk bali sebanyak 2.200 g dengan rendemen sebesar 40%. Simplisia serbuk daun jeruk bali kemudian diekstraksi menggunakan etanol 96% dengan metode maserasi dan refluks. Ekstrak hasil maserasi didapat sebanyak 89,9 g dengan rendemen sebesar 17,98±0,39% serta hasil maserasi sebanyak 95,45 g dengan rendemen sebesar 19,09±0,49%. Simplisia serbuk daun jeruk bali dapat dilihat pada Gambar 1. dan ekstrak etanol daun jeruk bali dapat dilihat pada Gambar 2.

UJI FITOKIMIA

Penentuan uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam simplisia dan ekstrak daun jeruk bali. Berdasarkan hasil uji fitokimia, simplisia dan ekstrak etanol 96% daun jeruk bali mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid dan



Gambar 1. Simplisia Daun Jeruk Bali



Gambar 2. Ekstrak Etanol Daun Jeruk Bali

saponin.

PENETAPAN KADAR FLAVONOID

Pada penetapan kadar flavonoid, digunakan senyawa quersetin sebagai standar karena merupakan flavonoid golongan flavonol. Pengukuran serapan panjang gelombang maksimum dilakukan pada rentang 400-450 nm (Chang *et al.*, 2002). Pada penelitian ini panjang gelombang maksimum yang didapat yaitu 430 nm, digunakan untuk mendapatkan nilai absorbansi yang memberikan sensitivitas pengukuran tertinggi. Nilai absorbansi yang stabil dari hasil pencampuran larutan quersetin dengan pereaksi aluminium klorida terjadi pada menit ke 30. Hasil ini menunjukkan bahwa waktu inkubasi optimum terdapat pada menit ke 30.

Panjang gelombang maksimum dan waktu inkubasi optimum tersebut digunakan untuk mengukur serapan kurva kalibrasi dan sampel ekstrak etanol 96% hasil metode maserasi dan refluks. Menurut penelitian Permadi (2018) panjang gelombang maksimum pada penetapan kadar flavonoid yaitu 430 nm, waktu inkubasi optimum pada menit ke 30 (Haeria, 2018). Dari kurva kalibrasi didapat persamaan regresi linier yaitu $y = 0,0933x + (-0,0103)$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,999. Nilai r yang mendekati 1 menunjukkan kurva kalibrasi linier berhubungan dengan konsentrasi larutan quersetin dengan nilai serapan. Hasil penetapan kadar flavonoid dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan data di atas kadar flavonoid ekstrak etanol 96% daun jeruk bali hasil metode refluks lebih banyak dibandingkan hasil metode maserasi. Hal ini dikarenakan, mekanisme kerja

Tabel 1. Hasil Penetapan Kadar Flavonoid

| Sampel Ekstrak | Kadar Flavonoid (%) | Rata-rata (%) |
|----------------|---------------------|---------------|
| Maserasi I | 1,48 | |
| Maserasi II | 1,50 | 1,49±0,01 |
| Refluks I | 2,36 | |
| RefluksII | 2,2 | 2,28±0,10 |

dari ekstraksi refluks yaitu melibatkan gerakan sampel dan pelarut berputar melewati pendingin balik karena proses konveksi yang dipengaruhi oleh suhu sedangkan pada ekstraksi maserasi hanya melibatkan kepolaran pelarut untuk menarik komponen yang diinginkan dengan cara perendaman sampel pada suhukamar.

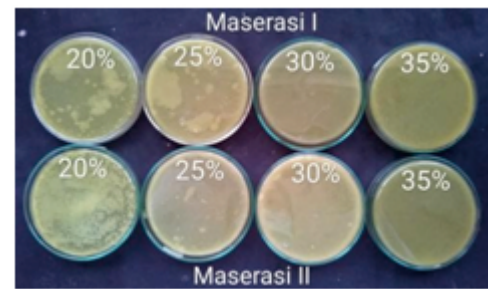
UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI

a. Konsentrasi Hambat Minimum

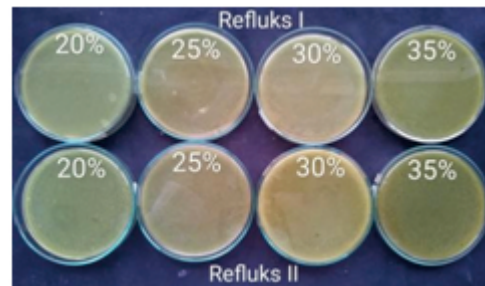
Berdasarkan hasil pengamatan pengujian konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak etanol 96% daun jeruk bali hasil metode maserasi dan refluks, pada konsentrasi 20% hasil metode refluks sudah menunjukkan adanya daya hambat yang ditandai dengan pertumbuhan koloni bakteri yang sedikit pada media nutrient agar, semakin meningkat konsentrasi ekstrak maka semakin sedikit pertumbuhan koloni bakteri tersebut. Koloni bakteri tidak tumbuh pada konsentrasi 35%, hasil ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut merupakan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol 96% daun jeruk bali hasil metode refluks terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*. Sedangkan pada konsentrasi 20% hasil metode maserasi terdapat banyak pertumbuhan koloni bakteri, tetapi semakin meningkat konsentrasi ekstrak maka semakin sedikit pertumbuhan koloni bakteri tersebut. Pada konsentrasi 35% menunjukkan adanya daya hambat terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri. Oleh karena itu KHM hasil metode maserasi berada pada konsentrasi 35%. Hasil Uji KHM dapat dilihat pada Gambar 3. dan Gambar 4.

a. Diameter Daerah Hambat

Pengujian Diameter Daerah Hambat (DDH) ditandai dengan adanya zona bening di sekitar kertas cakram. Aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengukur diameter daerah hambat dengan dua metode ekstraksi yaitu maserasi dan refluks menggunakan konsentrasi hasil uji KHM yaitu 35%, 40% dan 45%, serta digunakan kloramfenikol 10 ppm sebagai kontrol positif dan campuran DMSO dan akuades sebagai kontrol negatif. Terbentuknya zona bening pada masing-masing konsentrasi di sekitar kertas cakram menunjukkan adanya



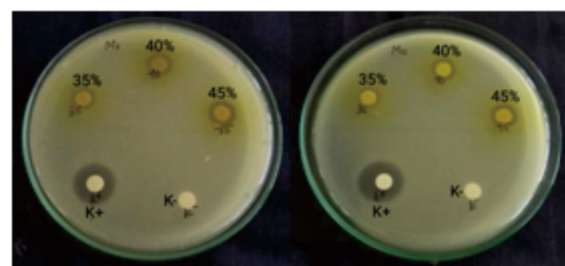
Gambar 3. Hasil Uji Konsentrasi Hambat Minimum Hasil Metode Maserasi



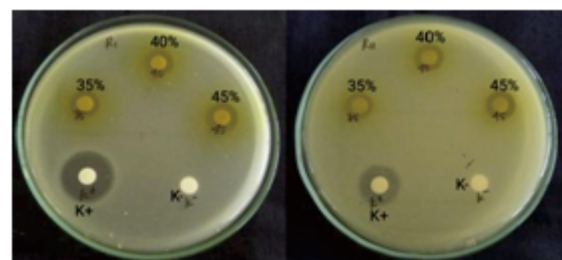
Gambar 4. Hasil Uji Konsentrasi Hambat Minimum Hasil Metode Refluks

aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri tersebut disebabkan oleh kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etanol 96% daun jeruk bali seperti flavonoid dan saponin. Gambar Diameter Daerah Hambat (DDH) dapat dilihat pada Gambar 5 dan Gambar 6. Hasil pengujian diameter daerah hambat (DDH) dapat dilihat pada Tabel 2.

Pada Tabel 2 menunjukkan pengujian



Gambar 5. Hasil Uji Diameter Daerah Hambat Hasil Metode Maserasi



Gambar 6. Hasil Uji Diameter Daerah Hambat Hasil Metode Refluks

Tabel 2. Diameter Daerah Hambat

| Metode | Konsentrasi | Rata-rata (mm) |
|-------------|-----------------|----------------|
| Maserasi I | 35% | 8,08±0,03 |
| | 40% | 8,41±0,02 |
| | 45% | 9,08±0,06 |
| | Kontrol Positif | 13,66±0,57 |
| | Kontrol Negatif | 0 |
| Maserasi II | 35% | 8,10±0,03 |
| | 40% | 8,47±0,04 |
| | 45% | 9,15±0,03 |
| | Kontrol Positif | 15 |
| | Kontrol Negatif | 0 |
| Refluks I | 35% | 9,44±0,04 |
| | 40% | 9,96±0,15 |
| | 45% | 10,92±0,08 |
| | Kontrol Positif | 15,66±1,15 |
| | Kontrol Negatif | 0 |
| Refluks II | 35% | 9,35±0,02 |
| | 40% | 9,92±0,08 |
| | 45% | 10,90±0,05 |
| | Kontrol Positif | 14,66±0,57 |
| | Kontrol Negatif | 0 |

Keterangan :

Kontrol Positif = Kloramfenikol 10 ppm

Kontrol Negatif = Akuades dan DMSO

diameter daerah hambat (DDH) ekstrak etanol 96% daun jeruk bali hasil metode maserasi dan refluks terhadap bakteri gram negatif *Shigella dysenteriae*. Data diatas menunjukkan diameter daya hambat ekstrak etanol 96% daun jeruk bali hasil metode refluks lebih baik dibandingkan dengan hasil metode maserasi, dapat dilihat dengan diameter daya hambat yang lebih besar. Hal ini disebabkan karena adanya pengaruh suhu ekstraksi, pada metode refluks digunakan suhu 70°C sehingga dapat mempercepat proses ekstraksi dibandingkan pada metode maserasi dengan suhu ruang (Suhardiman, 2018).

Pada penelitian ini digunakan kontrol positif kloramfenikol 10 ppm didapat diameter daya hambat sebesar 15mm±0,47 mm. Kontrol negatif yang digunakan adalah campuran DMSO dan akuades dengan diameter daya hambat sebesar 0 mm. Pelarut DMSO 10% merupakan pelarut organik dan tidak bersifat bakterisidal (Reynolds, 1996). Selain itu, *dimethylsulfoxide* (DMSO) dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar dan biasa digunakan sebagai pengencer ekstrak untuk memperoleh ekstrak dengan kadar konsentrasi tertentu (Assidqi, 2012).

Ekstrak daun jeruk bali mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid

dan saponin. Flavonoid merupakan senyawa yang bersifat polar sehingga lebih mudah menembus lapisan peptidoglikan yang bersifat polar daripada lapisan lipid yang nonpolar (Dewi, 2010), Dinding sel bakteri *Shigella dysenteriae* yang mengandung lapisan peptidoglikan dapat ditembus oleh senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid. Senyawa flavonoid dapat menembus dinding sel bakteri dengan mudah sehingga pertumbuhan bakteri menjadi menurun dalam jumlah yang banyak. Dinding bakteri yang terkena flavonoid akan kehilangan permeabilitas sel (Nurul, 2015).

Saponin sebagai antibakteri dan antifungi menyebabkan kerusakan protein dan enzim di dalam sel. Saponin dapat berdifusi melalui membran luar dan dinding sel bakteri yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan sel. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel bakteri (Taufiq dkk., 2015). Saponin bersifat sebagai surfaktan yang berbentuk polar akan menurunkan tegangan permukaan membran sterol dari dinding sel *Shigella dysenteriae*, sehingga menyebabkan gangguan permeabilitas membran yang berakibat pemasukan bahan atau zat-zat yang diperlukan dapat terganggu akhirnya sel membengkak dan pecah (Fitriani dkk., 2013).

Hasil analisis statistik dengan uji sidik ragam Anova pada perbedaan metode ekstraksi diperoleh Sig. sebesar 0,000 dan nilai α sebesar 0,05 membuktikan bahwa terdapat pengaruh perbedaan metode ekstraksi yang nyata (signifikan) terhadap diameter daerah hambat. Selanjutnya pada perbedaan konsentrasi uji menunjukkan Sig. sebesar 0,000 dan nilai α sebesar 0,05 membuktikan bahwa terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi uji yang nyata (signifikan) terhadap diameter daerah hambat. Kemudian dilakukan uji lanjut Duncan untuk mengetahui adanya pengaruh antar perlakuan.

Pada perbedaan metode ekstaksi, hasil perlakuan maserasi ulangan I dan II memberikan pengaruh yang sama terhadap diameter daerah hambat karena berada dalam subset yang sama, begitu pula dengan hasil perlakuan refluks ulangan I dan II memberikan pengaruh yang sama terhadap diameter daerah hambat karena berada dalam subset yang sama. Tetapi hasil perlakuan maserasi I dan II memberikan pengaruh diameter daerah hambat yang berbeda dibandingkan hasil perlakuan refluks I dan refluks II karena berada dalam subset yang berbeda.

Pada perbedaan konsentrasi larutan uji yaitu 35%, 40% dan 45%, masing-masing konsentrasi tersebut memberikan pengaruh diameter daerah hambat yang berbeda karena berada dalam subset yang berbeda.

KESIMPULAN DAN SARAN**a. Kesimpulan**

Aktivitas antibakteri *Shigella dysenteriae* dari ekstrak etanol 96% daun jeruk bali hasil metode refluks lebih baik dengan KHM pada konsentrasi 35% dan DDH sebesar 10,92±0,08 mm pada konsentrasi 45% dibandingkan hasil metode maserasi dengan KHM pada konsentrasi 35% dan DDH sebesar 9,15±0,03 mm pada konsentrasi 45% terhadap *Shigella dysenteriae*.

Kadar flavonoid ekstrak etanol 96% daun jeruk bali hasil metode refluks lebih besar yaitu 2,28±0,10% dibandingkan hasil maserasi sebesar 1,49±0,01%.

b. Saran

Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan metode ekstraksi bertingkat dari daun jeruk bali yang berpotensi sebagai antibakteri.

Perlunya dilakukan penetapan kadar saponin dari ekstrak daun jeruk bali yang berpotensi sebagai antibakteri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan atas dukungannya dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiello, Susan E. 2012. *The Merck Etinary Manual*. Merck Sharp & Dohme Corp. USA.
- Assidqi, Khoirunnisa, Wahyu T., dan Setyawati S. 2012. Potensi Ekstrak Daun Patikan Kebo (*Euphorbia hirta*) Sebagai Antibakteri Terhadap *Aeromonas hydrophila* Secara *In Vitro*. *Journal of Marine and Coastal Science*. Vol. 1 No. 2. Hal. 117.
- Azizah, Nur, Afghani J., dan Harlia. 2015. Aktivitas Anti Rayap Ekstrak Daun Jeruk Bali (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) Terhadap Rayap Tanah *Coptotermes* sp. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. Vol. 4. No. 3. Hal. 33-39.
- Black, Joyce M. dan Jacobs E. M. 1993. *Medical Surgical Nursing* (4th Edition). W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- Chang, Chia C., Yang Ming H., Wen Hwei M., Chern Jiing C. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. Vol. 10. Hal. 178-182.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta. Dirjen POM.
- Dwidjoseputro. 1988. *Pengantar Fisiologi Tumbuhan*. Jakarta. Erlangga.
- Hanani, Endang. 2015. *Analisis Fitokimia*. Jakarta. Buku Kedokteran EGC.
- Haeria, Nurshalati T., dan Munadiah. 2018. Penentuan Kadar Flavonoid Dan Kapasitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa oleifera* L) dengan Metode DPPH, CUPRAC Dan FRAP. *Jurnal Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UINAM*. Vol.6. No.2. Hal.90-96.
- Hadioetomo, Ratna S. 1985. *Mikrobiologi Dasar-dasar Praktik*. Gramedia. Jakarta.
- Munaari, Chaleb, Edi S., dan Julius P. 2014. Aktivitas Penangkal Radikal Hidroksil Fraksi Flavonoid dari Limbah Tongkol Jagung Pada Tikus Wistar. *Jurnal MIPAUNSRAT Online*. Vol. 3. No. 2. Hal. 136.
- Munfaati, Putri N., Ratnasari, E., dan Trimulyono, G. 2015. Aktivitas Senyawa Antibakteri Ekstrak Herba Meniran (*Phyllanthus niruri*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae* Secara *In Vitro*. *LenteraBio*. Vol. 4. No. 1. Hal. 64-65.
- Permadi, Afif, Sutanto, Sri W. 2018. Perbandingan Metode Ekstraksi Bertingkat Dan Tidak Bertingkat Terhadap Flavonoid Total Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Secara Kolorimetri. *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Farmasi*. Vol. 1. No. 1. Hal. 8.
- Reynolds, James. E. F. 1996. *Martindale, The Extra Pharmacopeia 31th Edition*. The Royal Pharmaceutical. Society Press. London.
- Saifudin, Aziz, Viesa R., dan Hilwan Y. T. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Yogyakarta. Graha Ilmu.
- Suhardiman, Ari, Dadang J., Maryzka D. 2018. Uji Antibakteri Rimpang Gandasuli (*Hedychium coronarium*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* dan *Escherichia coli* dengan Perbandingan Metode Ekstraksi. *Journal of Pharmacopolium*. Vol. 1. No. 2. Hal.62-68.