
AKTIVITAS ANTIBAKTERI BEBERAPA FRAKSI EKSTRAK DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia* Swingle) TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Dewi Andini Kunti Mulangri^{1*}, Riza Laksanasari¹, Rizqi Amaliyah¹, Assyifatul Fitri¹ dan Awal P. Kusumadewi²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Semarang
Jl. Menoreh Tengah X/22, Sampangan, Semarang 50236

²B2P2TO2T

Jl. Raya Lawu No 11, Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah, Indonesia
57792

*Email: andini@uwahas.ac.id

Abstrak

Pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dapat dihambat oleh daun jeruk nipis (*C. aurantifolia* Swingle) berdasarkan laporan penelitian terdahulu. Fraksinasi dapat menarik senyawa-senyawa non polar, semi polar dan polar dalam ekstrak etanol 70% daun jeruk nipis. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kemampuan antibakteri ketiga jenis fraksi ekstrak daun jeruk nipis terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Ekstrak daun jeruk nipis diperoleh dengan metode perkolasi menggunakan penyari etanol 70% dan difraksinasi bertingkat secara partisi cair-cair dengan penyarin-heksan, etil asetat dan air. Konsentrasi sampel uji yang digunakan adalah fraksi n-heksan dan fraksi air menggunakan konsentrasi yang sama yaitu 2000, 2500, 3000, 3500 dan 4000 µg/disk sedangkan fraksi etil asetat menggunakan konsentrasi 200, 400, 600, 800 dan 1000 µg/disk. Metode pengujian aktivitas antibakteri menggunakan difusi agar. Kontrol positif dan kontrol negatif yang digunakan berturut-turut adalah kloramfenikol 30 µg/disk dan DMSO 20%. Pengamatan dilakukan berupa zona hambat yang nampak, diukur menggunakan jangka sorong dan data yang diperoleh diinterpretasikan secara deskriptif. Hasil penelitian yang diperolehnya fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 70% daun jeruk nipis yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* pada semua konsentrasi uji dengan daya antibakteri sedang sampai kuat. Sedangkan fraksi n-Heksan dan fraksi air ekstrak etanol 70% daun jeruk nipis tidak memiliki aktivitas antibakteri.

Kata kunci : fraksi, daun jeruk nipis, antibakteri, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

1. PENDAHULUAN

Bakteri penyebab diare akut dan infeksi kulit salah satunya oleh bakteri *E. coli* dan *S. aureus* (Jawetz *et al.*, 2005). Sejak dahulu masyarakat Indonesia telah menggunakan tanaman obat untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Hal ini dikarenakan tanaman obat lebih mudah didapat dan efek sampingnya relatif lebih kecil dibandingkan obat kimia. Tanaman jeruk nipis menjadi bagian dalam tanaman obat keluarga (toga) yang telah digunakan oleh masyarakat, karena mengandung senyawa kimia yang bermanfaat seperti minyak atsiri, hesperidin, limonen, linalin asetat, geraniol asetat, felandren, sitral dan asam sitrat (Agromedia, 2008).

Penelitian Frisennia (2010), melaporkan ekstrak metanol daun jeruk nipis (*C. aurantifolia*) memberikan aktivitas terhadap bakteri *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *Salmonella typhi* dan fungi *Candida albicans*. Penelitian Akinnibosun dan Edionwe (2005) melaporkan terhambatnya pertumbuhan beberapa jenis bakteri karena pengaruh dari ekstrak etanol daun jeruk nipis (*C. aurantifolia* Swingle). Ekstrak etanolnya juga mengandung senyawa saponin, flavonoid, alkaloid, tanin, glikosida jantung dan gula reduksi.

Penelitian ini merupakan lanjutan penelitian Akinnibosun dan Edionwe (2005) dengan memfraksinasi ekstrak etanol secara bertingkat dengan partisi cair-cair. Fraksinasi menggunakan

dua pelarut yang tidak saling campur dapat diperoleh komponen kimia yang terkandung pada pelarut masing-masing, metode yang diterapkan ini adalah partisi cair-cair. Profil kandungan kimia pada masing-masing fraksi dipengaruhi adanya partisi bertingkat (non polar, semi polar dan polar) sehingga juga akan berpengaruh terhadap aktivitasnya (Gu, 2000).

2. METODE PENELITIAN

a. Bahan

Daun jeruk nipis (*C. aurantifolia* Swingle) yang didapat dari Dusun Saren RT 01/04 Kelurahan Bejen Kecamatan Bejen Kabupaten Temanggung. Daun yang diambil adalah daun muda yang sehat dan tidak berjamur. Pelarut yang digunakan etanol 70% (teknis), n-heksan, etil asetat, aquadest steril, bakteri *E. coli* ATCC 25992 dan *S. aureus* ATCC 25923, *Blank disc*, media nutrisi agar (NA), *nutrient broth* (NB), dimetilsulfoksida (DMSO), larutan fisiologis, larutan standar McFarland 10^8 CFU/mL, *paperdisc* kloramfenikol 30 µg/disk (Oxoid),

b. Alat

Tampah, oven, alat penyerbuk simplisia, perkolator, *Rotary evaporator* (RE), wadah penyimpanan ekstrak, alat timbang simplisia dan analitik, *moisture content balance*, corong pisah, *glassware*, kapas, kawat ose, lampu spiritus, cawan petri, *Laminar Air flow*, *incubator*, micropipet, *blankdisc* 6 mm, jangka sorong, *autoclave* dan aluminium foil

c. Pembuatan Serbuk Simplisia

Daun jeruk nipis yang dipanen yaitu daun yang sehat, tidak berjamur dan berwarna hijau. Air bersih yang mengalir digunakan untuk mencuci daun supaya kotoran yang menempel dapat hilang. Hasil pencucian ditiriskan dan dilanjutkan untuk dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C. Simplisia daun jeruk nipis diserbuk dengan alat penyerbuk simplisia. Persyaratan kadar air pada simplisia yaitu kurang dari 10%. Serbuk simplisia daun jeruk nipis yang diperoleh disimpan ditempat kering, tidak terkena sinar matahari untuk menghindari terjadinya dekomposisi kandungan senyawa (Depkes, 1986).

d. Ekstraksi daun jeruk nipis

Pembuatan ekstrak daun jeruk nipis dibuat dengan metode perkolasi. Serbuk simplisia daun jeruk nipis sebanyak 200 gram dimasukkan ke dalam tabung perkolator, lalu dibasahi dengan penyari etanol 70% dan dijenuhkan, perkolator ditutup rapat dan diletakkan terhindar dari cahaya matahari langsung, tahap penjenuhan ini dilakukan selama 24 jam. Kemudian simplisia dialiri penyari etanol 70% hingga warna simplisia memucat atau hingga warna tetesan perkolat lebih jernih dari tetesan sebelumnya. Perkolat yang didapatkan kemudian diuapkan pelarutnya dengan alat RE pada suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental daun jeruk nipis. Rendemen ekstrak dihitung ketika ekstrak yang telah kental diperoleh dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat serbuk simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

e. Fraksinasi ekstrak daun jeruk nipis

Ekstrak kental daun jeruk nipis sebanyak 80 gram dilarutkan dalam 800 mL aquades. Selanjutnya dipartisi dengan corong pisah menggunakan 800 mL pelarut n-heksan perbandingan 1:1 (v/v) lalu digojog kuat-kuat, didiamkan selama 24 jam. Hasilnya diperoleh tiga lapisan, yakni lapisan atas berupa fraksi n-heksan, lapisan tengah berupa emulsi berwarna kuning kecoklatan dan lapisan bawah berupa fraksi air. Lapisan tengah dan lapisan bawah dipisahkan dari fraksi n-heksan dan proses ini dilakukan sampai fraksi n-heksan jernih. Fraksinasi berikutnya adalah campuran emulsi dan fraksi air ditambahkan 400 mL pelarut etil asetat lalu digojog kuat-kuat, proses ini dilakukan sampai fraksi etil asetat jernih. Lapisan atas dan lapisan bawah berturut-turut adalah fraksi etil asetat dan fraksi air, kemudian dipisahkan. Fraksi n-heksan, etil asetat dan air yang masih cair tersebut kemudian dikentalkan dengan alat penguap berputar pada suhu 50°C.

$$\text{rendemen fraksi} = \frac{\text{berat fraksi kental}}{\text{berat ekstrak}} \times 100\% \quad (2)$$

f. Pembuatan larutan uji fraksi ekstrak daun jeruk nipis

Ketiga fraksi dari ekstrak daun jeruk nipis dilarutkan dengan DMSO 20%. Seri konsentrasi fraksi n-heksan ekstrak daun jeruk nipis (FHEDJN) dan fraksi air ekstrak daun jeruk nipis (FAEDJN) yang digunakan sama yaitu 4000, 3500, 3000, 2500, dan 2000 µg/µL, sedangkan fraksi etil asetat ekstrak daun jeruk nipis (FEEDJN) yang digunakan adalah; 200, 400, 600, 800 dan 1000 µg/µL.

g. Uji aktivitas antibakteri

1) Pembuatan Media

Media nutrisi agar dan *nutrient broth* dibuat sebanyak masing-masing 100 mL dan 1 L dengan pelarut aquades dalam erlenmeyer. Kedua jenis media tersebut dipanaskan hingga mendidih, dilanjutkan proses penyeterilan menggunakan autoklaf pada suhu. Media didinginkan sampai suhu 45-50°C, setelah agak dingin media tersebut disimpan dalam lemari pendingin hingga waktu digunakan (Dwidjoseputro, 2005).

2) Pembuatan suspensi bakteri *E. coli* dan *S. aureus*

Bakteri *E. coli* dan *S. aureus* hasil peremajaan dibiakkan dengan cara diambil satu ose koloni bakteri dari NA ditanam dalam media NB. Media disimpan pada suhu inkubator 37°C selama 24 jam (Dwidjoseputro, 2005).

3) Uji aktivitas antibakteri

Metode difusi agar yang digunakan dalam pengujian ini. Satu cawan petri yang berisi media mengandung satu jenis bakteri uji dan digunakan untuk menguji satu macam fraksi. Enam buah *blankdisc* diperlakukan sebagai berikut lima *blankdisc* diteteskan 10 µL fraksi uji dan satu cakram lagi diteteskan 10 µL DMSO 20%. Satu cawan petri hanya untuk satu jenis fraksi uji. Satu buah *paperdisc* yang mengandung kloramfenikol 30 µg/disk langsung diaplikasikan pada media diletakkan di bagian tengah. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan mengamati zona hambat yang terbentuk di sekitar *paperdisc*. Zona hambat tersebut yang menunjukkan daerah hambatan pertumbuhan bakteri.

h. Analisis data

Pengamatan dari uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengamati zona hambat di sekitar *blankdisc*, kemudian mengukur diameter daerah hambat (DDH) menggunakan jangka sorong. Hasil pengukuran DDH tersebut dianalisis secara deskriptif. Bila fraksi uji menghasilkan nilai DDH ≥ 20mm, 10-20mm, 5-10mm dan ≤ 5mm memiliki aktivitas antibakteri secara berturut-turut sangat kuat, kuat, sedang dan lemah (Davis dan Stout, 1971).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak kental daun jeruk nipis yang diperoleh sebanyak 800 gram dengan rendemen 17,51% berwarna coklat kehitaman dan berbau khas. Ekstrak kental yang digunakan untuk fraksinasi sebanyak 80 gram. Rendemen dari ketiga fraksi kental ekstrak daun jeruk nipis disajikan pada Tabel I.

Tabel I. Rendemen fraksi kental dari ekstrak daun jeruk nipis

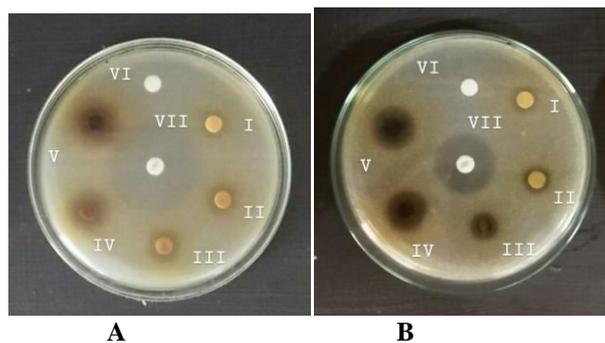
Fraksi kental	Rendemen (%)
n-Heksan	16,53
Etilasetat	54,11
Air	5,26

Rendemen fraksi yang tertinggi terdapat pada fraksi etilasetat. Rendemen yang tinggi menggambarkan kelarutan senyawa yang tinggi, hal ini terbukti pada ekstrak hidroalkoholik daun

jeruk nipis (*C. aurantifolia*) lebih tinggi rendemen ekstraknya dibandingkan ekstrak kloroform, etanol, aseton dan petroleum eter daun jeruk nipis (Pathan *et al.*, 2012). Ekstrak hidroalkoholik daun jeruk nipis (*C. aurantifolia*) terkandung senyawa karbohidrat, alkaloid, flavonoid, steroid dan tannin (Pathan *et al.*, 2012). Namun berat fraksi yang diperoleh tidak mempengaruhi besar kecilnya aktivitas antibakteri (Novita, 2016).

Ketiga fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap kedua bakteri uji tersebut hanya fraksi etil asetat, sehingga hasil yang disajikan FEEDJN. Fraksi etil asetat daun kenikir mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella boydii* ATCC 12985 dengan diameter paling besar, hal ini dikarenakan hasil uji fitokimia terbukti adanya kandungan flavonoid dan fenolik (Sari dkk, 2018). Senyawa yang diduga berperan sebagai antibakteri dalam FEEDJN adalah flavonoid dan fenolik.

Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 20% yang merupakan pelarut untuk fraksi uji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa zona hambat pada kontrol DMSO 20% tidak terbentuk, hal tersebut menggambarkan bahwa DMSO 20% tidak mempengaruhi hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi uji. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi uji ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Tampilan hasil uji aktivitas antibakteri FEEDJN, kloramfenikol dan DMSO 20% terhadap *E. coli* (A) dan *S. aureus* (B), diameter *paperdisk* 6mm

Keterangan :

- I : FEEDJN 200 µg/disk
- II : FEEDJN 400 µg/disk
- III : FEEDJN 600 µg/disk
- IV : FEEDJN 800 µg/disk
- V : FEEDJN 1000 µg/disk
- VI : Kloramfenikol 30 µg/disk
- VII : Larutan DMSO 20%

Fraksi air ekstrak daun jeruk nipis (FAEDJN) pada hasil orientasi hingga konsentrasi 1000µg/disk tidak ada aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. Konsentrasi ditingkatkan lagi pada kisaran 2000-4000µg/disk namun masih belum mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Maka disimpulkan bahwa FAEDJN tidak berpotensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil uji aktivitas antibakteri FAEDJN tidak mampu menghambat pertumbuhan kedua bakteri tersebut, dimungkinkan senyawa aktif yang terkandung didalam FAEDJN tidak dapat larut sempurna dalam DMSO 20% sehingga proses difusi tidak bekerja secara optimal.

Hasil uji fraksi *n*-heksan daun jeruk nipis menunjukkan tidak terbentuknya zona hambat disekitar *paperdisk* pada semua konsentrasi baik terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Hal tersebut diakibatkan karena absorpsi senyawa pada fraksi *n*-heksan kedalam media agar kurang maksimal diakibatkan pada saat pelarutan sampel oleh DMSO 20% tidak larut sempurna dan masih terdapat sampel yang menggumpal sehingga terjadi kurangnya konsentrasi sampel untuk penghambatan bakteri dalam media agar (Fadlila dkk., 2015). Tidak adanya zona hambat juga

dikarenakansenyawayang berpotensi antibakteri dari sampel uji tidak mampu berdifusi (Dani dkk., 2011). Nilai DDH hasil pengukuran daerah hambat disajikan pada tabel II dan III.

Tabel II. Nilai rata-rata diameter daerah hambat beserta kategorinya dari beberapa bahan uji terhadap *Escherichia coli*, diameter kertas cakram 6 mm.

Konsentrasi fraksi uji	Rata-rata DDH (mm)±SD			Kategori
	FN	FE	FA	
200 µg/disk		7,7 ±0,090		Sedang
400 µg/disk		8,46±0,298		Sedang
600 µg/disk		9,51±1,043		Sedang
800 µg/disk		10,86±0,119		Kuat
1000 µg/disk		11,23±0,508		Kuat
2000 µg/disk	-		-	-
2500 µg/disk	-		-	-
3000 µg/disk	-		-	-
3500 µg/disk	-		-	-
4000 µg/disk	-		-	-
Kloramfenikol 30µg/disk	31,06±1,18	26,80±1,359	18,5±0,66	Sangat kuat
DMSO 20%	-	-	-	-

Keterangan :

FN = Fraksi n-heksan ekstrak daun jeruk nipis

FE = Fraksi etilasetat ekstrak daun jeruk nipis

FA = Fraksi Air ekstrak daun jeruk nipis

- = tidak ada aktivitas antibakteri

Fraksi etilasetat ekstrak daun jeruk nipis terhadap *S. aureus* dan *E. coli* memberikan daya antibakteri yang kuat mulai konsentrasi masing- masing 600µg/disk dan 800µg/disk. Kedua bakteri uji memiliki kepekaan yang berbeda terhadap FEEDJN hal ini menggambarkan *S. aureus* lebih mudah dihambat pertumbuhannya dibandingkan *E. coli*. Perbedaan kepekaan bakteri terhadap FEEDJN kemungkinan dikarenakan adanya perbedaan penyusun dinding sel misalnya ketebalan peptidoglikan dan adanya lipid, antara tipe bakteri Gram positif untuk *S. aureus* dan Gram negatif untuk *E. coli*. Kepekaan bakteri terhadap antibiotik tergantung pada perbedaan susunan dinding selnya misalnya (Jawetz dkk., 2005).

Tabel II. Nilai rata-rata diameter daerah hambat beserta kategorinya dari beberapa sampel uji terhadap *Staphylococcus aureus*, diameter kertas cakram 6 mm.

Konsentrasi fraksi uji	Rata-rata DDH (mm)±SD			Kategori
	FN	FE	FA	
200 µg/disk		8,57 ± 0,486		Sedang
400 µg/disk		9,38 ± 0,814		Sedang
600 µg/disk		10,42±0,586		Kuat
800 µg/disk		11,30±0,740		Kuat
1000 µg/disk		12,21±0,226		Kuat
2000 µg/disk	-		-	-
2500 µg/disk	-		-	-
3000 µg/disk	-		-	-
3500 µg/disk	-		-	-
4000 µg/disk	-		-	-
Kloramfenikol 30µg/disk	20,6±0,87	20,15±0,568	28,16±2,75	Sangat kuat
DMSO 20%	-	-	-	-

Keterangan :

FN = Fraksi n-heksan ekstrak daun jeruk nipis

FE = Fraksi etilasetat ekstrak daun jeruk nipis

- FA = Fraksi Air ekstrak daun jeruk nipis
- = tidak ada aktivitas antibakteri

4. KESIMPULAN

Aktivitas antibakteri dari ketiga fraksi ekstrak etanol 70% daun jeruk nipis hanya fraksi etilasetat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dengan kisaran kategori sedang sampai kuat.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Agromedia, R., 2008, *Buku Pintar Tanaman Obat 431 Jenis Tanaman Penggempur Aneka Penyakit*, PT Agromedia Pustaka, Jakarta, 101.
- Akinnibosun, F.I. dan Edionwe, O., 2015, Evaluation of the Phytochemical and Antimicrobial potensial of the Leaf Extracts of *Bryophyllum pinnatum* L. and *Citrus aurantifolia* Sw. And their Synergy, *Appl. Sci. Environ, Manage*, **19(4)**, 611-619.
- Dani, I.W., Nurtjahja, K., dan Zuhra, C.F., 2011, Penghambatan Pertumbuhan *Aspergillus flavus* dan *Fusarium moniliforme* oleh Ekstrak Salam (*Eugenia polyantha*) dan Kunyit (*Curcuma domestica*), *Jurnal*, Departemen Biologi Universitas Sumatera Utara.
- Davis, W.W., dan Stout, T.R., 1971, Disc Plate Methods of Mikrobiological Antibiotic Assay, *Microbiology*, **22(4)**, 659-665.
- Depkes R1, 1986, Sediaan Galenik, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Dwidjoseputro, 2005, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Djambatan, Malang, 118-142.
- Fadlila, W.N., Yuliawati, K.M., dan Syafnir, L., 2015, Identifikasi Senyawa Aktif Antibakteri dengan Metode Bioautografi KLT terhadap Ekstrak Etanol Tangkai Daun Talas (*Colocasia esculentia* (L.) Schott), *Jurnal Farmasi Gelombang*, **2**, 2460-6472.
- Frisennia, N., 2010, Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Metanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap Beberapa Mikroba Patogen Dengan Metode KLT-Bioautografi, *Skripsi*, Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar, Makassar.
- Gu, T., 2000, Liquid-Liquid Partitioning Methods for Bioseparations, Editor Ahuja S, *Handbook of Bioseparations*, 2nd Edition, Academi Press, San Diego, California, 239-364.
- Jawetz, Melnick and Adelberg's., 2005, *Mikrobiologi kedokteran*, Edisi I, diterjemahkan Bagian Mikrobiologi Fakultas kedokteran Universitas Airlangga, Salemba Medika, Jakarta, 58, 235, 277, 280.
- Novita, W., 2016, Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* Secara *In Vitro*, *JMJ*, **4(2)**: 144
- Pathan, R.K., Gali, P.R., Pathan, P., Gowtham T. and Pasupuleti S., 2012, In Vitro Antimicrobial Activity of *Citrus aurantifolia* and its Phytochemical Screening, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **S329**
- Sari, E.R, Lely, N. dan Septimarleti, D., 2018, Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Etanol dan Beberapa Fraksi Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) Terhadap Bakteri Penyebab Disentri *Shigella sp*, *Jurnal Penelitian Sains*, **20(1)**: 20103-18.