

Daya Hambat Ekstrak Limbah Jeruk (*Citrus Sinensis*) Dengan Pelarut N-Heksana Sebagai Antibiotik Pada Ayam Broiler The Inhibitory Of Orange (*Citrus sinensis*) Waste Extracted With N-Hexana Solution As Antibiotic In Broiler

Ucop Haroen

Departement of Nutrition and Animal Feed Science Technology,
Faculty of Animal Science, Jambi University
Jln. Jambi-Ma Bulian Km 15 Mendalo Darat, Jambi 36361-Indonesia

Intisari

Tujuan penelitian ini ialah mengkaji efektifitas antibakteri ekstrak limbah jeruk menggunakan pelarut n-heksana dalam menekan perkembangan bakteri patogen (*E. coli* dan *S. enteritidis*) pada ayam broiler. Pada penelitian ini menggunakan ekstrak limbah jeruk dengan pelarut n-heksana dan bakteri *E.coli* dan *S.enteritidis*. Penelitian dilakukan dengan metode uji Disc (melihat zona bening sekitar Disc) dan uji MIC (*minimum inhibitory concentration*) menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) 5 perlakuan dan 5 ulangan untuk masing-masing perlakuan. Perlakuan P0 terdiri dari pemberian antibiotik sintetis sebagai kontrol, ekstrak limbah jeruk pelarut n-heksana dengan konsentrasi 250 ppm (P1), 500 ppm (P2), 750 ppm (P3) dan 1000 ppm (P4). Hasil pengukuran zona hambat, daya hambat serata indek aktivitas antibakteri dari lima perlakuan terhadap *E.coli* dan *S. enteritidis* berkisar 8,21-18,8; 11,94% - 22,87% dan 1,3-2,75. Hasil analisis ragam menunjukkan perlakuan pemberian ekstrak limbah jeruk n-heksana nyata ($P<0.05$) berpengaruh terhadap zona hambat, daya hambat serta indek aktivitas bakteri *E.coli* maupun *S.enteritidis*. Berdasarkan uji lanjut zona hambat, daya hambat maupun indek aktivitas antibakteri ekstrak limbah jeruk n-heksana pada konsentrasi 1000 ppm nyata ($P<0.05$) lebih tinggi dibandingkan perlakuan 750 ppm, 500 ppm dan 250 ppm. Sementara itu perlakuan antibiotik sintetis menghasilkan zona hambat, daya hambat dan indek aktivitas lebih tinggi ($P<0.05$) dibandingkan dengan semua perlakuan.

Key words : Limbah jeruk, bakteri patogen, MIC dan Disc, n-heksana

Abstract

The experiment was designed to study the uses of orange waste extracts with solution of n-hexana in inhibiting the pathogen bacteria on broilers. Orange waste extracts with solution n-hexana, *E.coli* and *S.enteritidis* bacteria, were assigned into the zone of inhibition (Disc) and minimum inhibitory concentration (MIC). Completely randomized design was used in the present study, were randomly allocated to five treatments groups given varying in concentrations of orange waste extracts. P0 = antibiotic, P1 = 250 ppm orange waste extracts, P2 = 500 ppm orange waste extracts, P3 = 750 ppm orange waste extracts and P4 = 1000 ppm orange waste extracts. Supplemented with an antibiotic only was used as a control. The concentrations 1000 ppm of MIC were test showed inhibition of orange waste extracts higher with a percentage minimum 22,87 % for the bacterium *E. coli* and 18,99 % for the *S. enteritidis* than index activity 2,50 for the bacterium *E. coli* and 2,75 for the *S. enteritidis*.

Key Words: Orange waste extract, n-hexana, pathogen bacteria , Disc and MIC

Pendahuluan

Penggunaan antibiotik sintetis sudah sangat umum digunakan untuk mengendalikan bakteri penyebab penyakit pada ayam broiler dalam industri peternakan modern.

Antibiotik sintetis merupakan *feed additive* yang biasa dicampur ke dalam ransum ayam broiler yang dapat meningkatkan kesehatan ternak. Pemberian antibiotik sintetis ini bertujuan untuk meningkatkan kesehatan ternak, memacu pertumbuhan sekaligus meningkatkan produktivitas ternak, khususnya ayam broiler. *Feed additive* yang ada pada saat ini pada umumnya berupa antibiotik, enzim, probiotik, senyawa aktif tanaman. Pemberian antibiotik sintetis diharapkan dapat mengurangi populasi mikroorganisme pengganggu (patogen) dalam saluran pencernaan, sehingga ternak lebih sehat dan dapat memanfaatkan zat-zat makanan lebih baik untuk pertumbuhan dan produksi (Walton., 1997). Penggunaan antibiotik sintetis secara terus menerus dapat menimbulkan dampak negatif terhadap ternak dan konsumen yang mengkonsumsi produk ternak tersebut.

Salah satu alternatif yang cukup potensial digunakan untuk menghindari dampak negatif penggunaan antibiotik sintetis adalah dengan penggunaan *feed additive* alami yang terdapat dalam ekstrak limbah jeruk. Ekstrak limbah jeruk merupakan ekstrak yang didapat dari proses maserasi, ekstraksi dengan menggunakan pelarut organik yang bahan aktifnya terdiri limonoid, alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, saponin dan kumarin (Haroen *et al.*, 2013). Senyawa aktif yang berasal dari tanaman merupakan senyawa aktif yang lebih spesifik dan residunya mudah terurai (Soehardjan., 1994). Salah satu antibiotik alami yang mampu dan telah terbukti dapat menghambat

perkembangan bakteri patogen adalah ekstrak limbah jeruk menggunakan pelarut etilasetat (Haroen *et al.*, 2013). Ekstrak limbah jeruk menggunakan pelarut etilasetat memiliki daya hambat yang sangat baik dibandingkan dengan ekstrak limbah jeruk dengan menggunakan pelarut metanol (Haroen., 2014). Ekstrak limbah jeruk menggunakan pelarut etilasetat pada konsentrasi 750 ppm mampu menekan perkembangan bakteri patogen (*E. coli* dan *S. enteritidis*). Kemampuan ekstrak limbah jeruk menggunakan pelarut etilasetat dalam menekan perkembangan bakteri patogen pada ayam broiler yaitu 67% (Haroen., 2014).

Berdasarkan potensi yang dimiliki ekstrak limbah jeruk dengan menggunakan pelarut organik diharapkan dapat mengurangi populasi mikroorganisme pengganggu (patogen) di dalam saluran pencernaan ayam broiler, sehingga ayam lebih sehat dan dapat memanfaatkan gizi pakan lebih baik untuk pertumbuhan dan produksi.

Materi dan Metode

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei sampai Juli 2016 di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan yang diulang masing-masing sebanyak 5 kali. Perlakuan merupakan konsentrasi ekstrak limbah jeruk dengan pelarut n-heksana pada konsentrasi 250 ppm (P1), 500 ppm (P2), 750 ppm (P3), 1000 ppm (P4) dan antibiotik sintetis sebagai kontrol (P0). Koleksi isolat bakteri *E. coli* dan *S. enteritidis* diperoleh dari Laboratorium

Mikrobiologi Universitas Andalas. Data yang diukur adalah: Diameter zona hambat yaitu dengan mengukur zona bening yang terbentuk pada perlakuan ekstrak limbah jeruk dengan pelarut n-heksana, diukur lebarnya dari sisi sebelah kiri sampai sisi sebelah kanan dan dari sisi sebelah bawah sampai sisi sebelah atas (mm). Konsentrasi hambat minimum dari ekstrak yang mempunyai aktivitas antibakteri yang terbesar. Konsentrasi terkecil yang masih bisa menghambat pertumbuhan mikroba merupakan konsentrasi hambat minimum (%).

A. Cara kerja penelitian :

1. Persiapan media agar Sterilisasi alat dan bahan : Alat-alat gelas yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan dan akan dibungkus dengan kertas perkamen. Kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Jarum ose akan disterilkan dengan cara membakar pada lampu spritus.
2. Pembuatan media: Pembuatan media pembenihan dan media Mueller Hinton Broth (MHB): media pembenihan yang akan digunakan untuk uji antimikroba ini adalah Nutrient Agar (NA) yang terdiri dari 5 g peptone, 3 g beef extract dan 12 g agar. Dua puluh gram serbuk NA dilarutkan dalam 1 liter air suling, dipanaskan di atas penangas air sampai mendidih, angkat dan diamkan sebentar lalu didistribusikan kedalam tabung reaksi dan kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Media MHB dibuat dengan cara sebanyak 21 gram bubuk MHB dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer kapasitas 1000 ml dan ditambahkan aquades sampai volume mencapai 1000 ml. Panaskan sampai mendidih, angkat dan diamkan sebentar lalu didistribusikan ke dalam tabung reaksi dan kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
3. Peremajaan bakteri: Jarum ose disterilkan di atas nyala Bunsen dengan cara dipijarkan dan dibiarkan beberapa saat supaya dingin. Diambil sebanyak 1 ose biakan murni bakteri. Kemudian diinokulasi biakan murni tersebut kedalam media NA miring secara aseptik, diinkubasi selama 24 jam pada temperature 37°C.
4. Pembuatan suspensi mikroba uji: Bakteri yang akan diujikan yaitu *S. enteritidis*, *E. coli*. Masing-masing bakteri yang ada pada stok kultur akan diambil dengan jarum ose dan masing-masing disuspensikan dalam larutan NaCl fisiologis (0,85% NaCl) dan dihitung jumlah sel per ml sehingga mencapai lebih kurang 10^7 sel per ml dengan menggunakan kurva standard.
5. Pelaksanaan uji antibakteri: Uji antibakteri melalui penentuan zona hambat dengan metoda difusi cakram. Ke dalam media pembenihan dicelupkan masing-masing dua kertas cakram pada tiap-tiap konsentrasi ekstrak limbah jeruk pelarut n-heksana yaitu antibiotik sintetis (kontrol) (P0), ekstrak limbah jeruk n-heksana 250 ppm (P1), 500 ppm (P2), 750 dan ppm (P3), 1000 ppm (P4). Letakkan kertas cakram pada permukaan cakram yang berisi suspensi bakteri uji. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 37° C dan ukur zona hambatnya. Jika zona hambat yang

terbentuk lebih besar dari zona hambat kontrol maka dikatakan aktif antibakteri.

B. Pengukuran peubah :

1. **Uji Disc dan Indek Aktifitas** : Uji dengan metode Disc juga dilakukan untuk melihat zona bening pada bagian disekitar Disc. metode Long *et al.* (2003). dan Vust dan Vandamme (1994). Prosedur pengujian adalah sebagai berikut: 1 ml larutan *E. coli* atau *S. enteritidis* dimasukan ke dalam cawan petri yang berisi MPA dan dibiarkan selama 10 menit hingga mengering, sisa yang tertinggal diambil dengan pipet. Pada bagian bawah cawan petri digambar dengan membagi menjadi 4 bagian. Disc/cakram yang terbuat dari kertas sebanyak 4 buah direndam dalam larutan dan dimasukan ke dalam atau ditempel pada permukaan cawan petri pada bagian tengah keempat bagian cawan petri tersebut. Cawan petri yang berisi biakan kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C, amati zona bening disekitar Disc.

2. **Uji MIC (Minimum Inhibitory Concentration)** : Pengujian dengan metode MIC adalah digunakan pada konsentrasi larutan tertentu dari spesies bakteri *E. coli* atau *S. enteritidis*, mulai menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* atau *S. enteritidis*. Prosedur pengujian adalah sebagai berikut: Tabung kemudian diisi dengan larutan *E. coli* atau *S. enteritidis* dengan konsentrasi 10^6 cfu/ml dalam larutan Muller Hinton Broth (MHB) sesuai standard McFarland dengan menggunakan Spektrometer. Masing-masing tabung diisi

berturut-turut mulai pertama sampai tabung kelima adalah sebanyak 4.5 ml, 4.0 ml, 3.5 ml, 3.0 ml, dan 2.5 ml. Tabung kemudian diisi lagi dengan supernatant/larutan masing-masing berturut-turut mulai dari pertama sampai kelima adalah 0.5 ml, 1.0 ml, 1.5 ml, 2.0 ml dan 2.5 ml, sehingga konsentrasi supernatant dalam tabung adalah 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%. Tabung kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Amati kekeruhan pada tabung, bila keruh bakteri *E. coli* atau *S. enteritidis* tumbuh bila bening bakteri *E. coli* atau *S. enteritidis* tidak tumbuh.

Hasil dan Pembahasan

Pengaruh pemberian ekstrak limbah jeruk n-heksana terhadap zona hambat bakteri *E. coli* dan *S. enteritidis*. Hasil pengukuran zona hambat dari ekstrak limbah jeruk n-heksana terhadap bakteri *E. coli* dan *S. enteritidis* tercantum pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 di atas terlihat bahwa zona hambat dari ekstrak limbah jeruk n-heksana pada konsentrasi 1000 ppm lebih tinggi dari pada perlakuan yang lainnya terhadap bakteri *E. coli* dan *S. enteritidis*. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak limbah jeruk dengan pelarut n-heksana nyata ($P < 0.05$) berpengaruh terhadap zona hambat bakteri *E. coli* dan *S. enteritidis*. Dari uji Duncan menunjukkan zona hambat terhadap *E. coli* maupun *S. enteritidis* yang mendapat perlakuan P0 (antibiotik) nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibandingkan perlakuan

Tabel 1. Hasil Uji Disc dan indeks aktivitas ekstrak limbah jeruk n-heksana terhadap *E. coli* dan *S. enteritidis*

Perlakuan Limbah jeruk n- heksana (ppm)	Zona hambat (mm)		Indek Aktivitas	
	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>
P0	20,15 ^a	18,10 ^a	3,42 ^a	3,01 ^a
P1	8,21 ^b	8,51 ^b	1,33 ^b	1,56 ^b
P2	9,50 ^b	9,10 ^b	1,37 ^b	1,96 ^b
P3	12,90 ^d	12,54 ^d	1,45 ^b	2,28 ^c
P4	18,81 ^e	17,89 ^a	2,50 ^c	2,75 ^c

Keterangan : Konsentrasi Disc 30 mg/ml.

Huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0.05)

perlakuan P1 dan P2 tidak nyata lainnya. Sementara itu antara berbeda (P<0.05) dalam menghambat perkembangan bakteri *E. coli* dan *S. enteritidis*. Tetapi antara perlakuan P3 dan P4 nyata (P<0.05) lebih tinggi dari perlakuan P1 dan P2. Hasil ini menunjukkan bahwa makin tinggi konsentrasi ekstrak limbah jeruk n-heksana ternyata lebih efektif dalam menghambat perkembangan bakteri *E. coli* dan *S. enteritidis*. Zona hambat yang terbentuk dari perlakuan pemberian ekstrak limbah jeruk n-heksana pada konsentrasi 1000 ppm terhadap bakteri *E. coli* dan *S. enteritidis* sebesar 18,81 mm dan 17,89 mm. Hasil ini lebih tinggi dari yang dilaporkan Ekwenye dan Edeha (2010), dimana zona hambat pada penggunaan dari ekstrak kulit jeruk dengan pelarut etanol terhadap zona hambat bakteri *E. coli* dan *S. enteritidis* sebesar 13 mm dan 17 mm. Sementara Kirbaslar *et al.* (2009) memperoleh zona hambat pada penggunaan ekstrak kulit jeruk lemon dengan menggunakan pelarut etilasetat dan ekstrak kulit jeruk senensis dengan pelarut etilasetat dan ekstrak kulit jeruk sinensis dengan pelarut etilasetat terhadap zona hambat

bakteri *E. coli* sebesar 14 mm dan 13 mm. Adanya variasi zona hambat bakteri yang diperoleh kemungkinan disebabkan karena adanya perbedaan komposisi fitokimia dari masing-masing ekstrak yang dihasilkan. Sedangkan komposisi kandungan fitokimia dari masing-masing ekstrak tanaman dipengaruhi oleh profil tanah, waktu panen, metode ekstraksi, konsentrasi, waktu, suhu dan sifat pelarut yang digunakan (Lia *et al.*, 2006 ; Garau *et al.*, 2007). Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan P0 nyata (P<0.05) berpengaruh terhadap zona hambat dan indeks aktivitas pada bakteri *E. coli* dan *S. enteritidis*. Dari uji Duncan menunjukkan zona hambat dan indeks aktivitas ekstrak limbah jeruk n-heksana 1000 ppm (P4) lebih tinggi (P<0.05) dibanding konsentrasi 250 ppm (P1), 500 ppm (P2) dan 750 ppm (P3). Sementara itu antibiotik sintetis (P0) mengasilkan daya hambat dan indeks aktifitas lebih tinggi (P<0.05) dibandingkan dengan semua perlakuan yang diberikan. Ada kecenderungan yang terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak limbah jeruk n-heksana maka semakin tinggi zona hambat dan indeks

aktivitas anti bakteri yang dihasilkan. Hal ini kemungkinan disebabkan karena ekstrak limbah jeruk n-heksana pada perlakuan P4 (1000 ppm) mengandung komponen fitokimia yang lain dengan konsentrasi yang lebih tinggi yang juga memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

Hasil pengukuran daya hambat dari ekstrak limbah jeruk n-heksana terhadap bakteri *E. coli* dan *S. enteriditis* tercantum pada Tabel 2.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak limbah jeruk n-heksana nyata ($P < 0.05$) berpengaruh terhadap daya hambat minimum (MIC) pada bakteri *E. coli* dan *S. enteriditis*. Hasil uji MIC terhadap bakteri *E. coli* dan *S. enteriditis* yang diperoleh dalam penelitian ini berkisar 18,64% -22,87% dan 11,94% - 18,99%. Dari uji MIC terlihat bahwa ekstrak limbah jeruk n-heksana ternyata lebih efektif dalam menghambat perkembangan bakteri *E. coli* dari pada bakteri *S. enteriditis*.

Dari uji Duncan hasil uji MIC dari perlakuan 1000 ppm (P4) berbeda nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Sementara itu uji MIC antara perlakuan P0 (antibiotik sintetis) dan perlakuan P1(1000 ppm) nyata

($P < 0.05$) lebih tinggi terhadap daya hambat *E. coli* dan *S. enteriditis*. Lebih efektifnya perlakuan P0 (antibiotik sintetis) dibandingkan perlakuan ekstrak limbah jeruk n-heksana dalam menghasilkan nilai MIC kemungkinan disebabkan karena sifat pelarut yang digunakan pada penelitian ini ekstraksi dan maserasi dilakukan dengan pelarut non polar dimana komponen yang dapat diekstraknya hanya komponen yang bersifat non polar. Senyawa-senyawa aktif yang terkandung didalam limbah jeruk sebagian besar bersifat semi polar dan polar Haroen (2014). Fu *et al.*, (2005) mengatakan hasil ekstraksi, maserasi dari berbagai ekstrak tanaman ditentukan dari sifat pelarut yang digunakan, metode ekstraksi dan waktu serta suhu yang digunakan.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa ada potensi penggunaan senyawa aktif dalam ekstrak limbah jeruk dengan pelarut n-heksana yang digunakan sebagai antibiotik alami untuk menekan perkembangan bakteri patogen pada ayam broiler terutama *E. coli* dan *S. enteriditis*

Tabel 2. Pengaruh pemberian ekstrak limbah jeruk n-heksana terhadap daya hambat bakteri *E. coli* dan *S. enteriditis*.

Perlakuan Limbah jeruk n-heksana (ppm)	Daya hambat (%)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. enteriditis</i>
P0	26,70 ^a	26,70 ^a
P1	19,36 ^b	10,95 ^b
P2	18,64 ^b	11,94 ^b
P3	21,66 ^c	13,46 ^c
P4	22,87 ^c	18,99 ^d

Keterangan : Konsentrasi Disc 30 mg/ml.

Huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0.05$)

Daftar Pustaka

- Ekwenye U. N. and V. E. Oghenerobo. 2010. The antibacterial activity of crude leaf extract of *Citrus sinensis* (sweet orange). J. Pharma and Bio Sci. 1(4) : 742-750.
- Fu S.H, M.H. Yang, H.M. Wen, J.C. Chern. 2005. Analysis of flavonoids in propolis by capillary electrophoresis. J. Food drug anal 13: 43-50.
- Garau MC, S. Simal, C. Rosselló, A. Femenia. 2007. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium v. Canoneta*) by-products. J. Food Chem 104: 1014-1024.
- Haroen U (2014). Kajian ekstrak limbah jus jeruk sebagai *Feed Additive* dan pengaruhnya terhadap performan ayam broiler. Disertasi Pascasarjana Universitas Andalas Padang.
- Haroen U, Y. Marlida, Mirzah and A. Budiansyah. 2013. Extraction and isolation phytochemical and antimicrobial activity of limonoid compounds from orange waste juice. Pak. J. Nutr.12(8) : 730-735.
- Kirbaslar. F.G, A. Tavman, B. Dulger And G. Turker. 2009. Antimicrobial activity of turkish citrus peel oils. Pak. J. Bio. 41 (6) : 3207-3212.
- Lia BB, B. Smith, M. Hossain. 2006. Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. Sep Purific Tech 48: 182-188.
- Long H.H, N. Furuya, D. Kurose, M. and Y. Takanami .2003. Isolation Of endophytic bacteria from salanum sp. and their antibacterial activity against plant pathogenic bacatria. J. Fac. Agr. Kejushu. 48 (12): 21-28.
- Soehardjan, M. 1994. Konsepsi dan Strategi Penelitian dan Pengembangan Pestisida Nabati. Prosiding Seminar Hasil Penelitian dalam Rangka Pemanfaatan Pestisida Nabati. 1-2 Desember 1993. Balitro. Bogor. pp. 11-18.
- Vust L.D and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. InL. D Vust and E.J. Vandamme. Baktericcins of lactic Acid bacteria microbiology genetic and aplication balckie academic & professional London.
- Walton, J.R. 1977. A Mechanism of growth promotion: Non-lethal feed antibiotic induced cell wall lesions inenteric bacteria. In: Antibiotics and Antibiosis. Woodbine, M. (Ed). Butterworths, London. pp. 259-264.

