

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Resistensi antimikroba (AMR) adalah tantangan besar dalam kesehatan global, terjadi ketika mikroorganisme seperti bakteri dan virus bertahan terhadap obat yang sebelumnya efektif. Fenomena ini terutama dipicu oleh penggunaan antibiotik yang tidak rasional serta keterbatasan akses terhadap layanan kesehatan yang memadai. Tanpa intervensi, kematian akibat AMR bisa mencapai 10 juta per tahun pada 2050 (Walsh et al., 2023). Kondisi ini menegaskan perlunya pendekatan baru dalam pengendalian infeksi yang berfokus pada eksplorasi bahan alami. Bakteri Gram-negatif seperti *Pseudomonas aeruginosa* menjadi perhatian utama karena kemampuannya mengembangkan resistensi *multidrug*. *P. aeruginosa* sering menyebabkan infeksi nosokomial, terutama pada pasien dengan sistem kekebalan lemah. Salah satu mekanisme resistensinya adalah pembentukan biofilm, yang menghalangi penetrasi antibiotik dan melindungi bakteri dari sistem imun. Dengan meningkatnya strain resisten, penelitian terapi alternatif untuk mengatasi infeksi ini semakin mendesak (Hu & Chua, 2025).

Pencarian senyawa antimikroba baru yang efektif terhadap biofilm menjadi prioritas utama dalam penelitian biomedis, mengingat kemampuan biofilm dalam melindungi koloni bakteri dari penetrasi antibiotik konvensional dan sistem imun inang. Kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) muncul sebagai kandidat potensial karena kandungan senyawa bioaktif utamanya, seperti flavonoid (hesperidin, *naringin*) dan terpenoid (*limonene*), yang telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri spektrum luas. Senyawa-senyawa ini bekerja secara sinergis tidak hanya melalui kerusakan membran sel bakteri, tetapi juga dengan menghambat mekanisme *quorum sensing* dan adhesi awal bakteri pada permukaan, yang merupakan tahap krusial dalam pembentukan matriks biofilm. Eksplorasi lebih lanjut mengenai potensi ekstrak *C. sinensis* diharapkan dapat menawarkan strategi terapi baru yang lebih efektif dalam mengatasi infeksi persisten yang diperantarai oleh biofilm (Khemka et al., 2025).

Evaluasi efektivitas ekstrak kulit jeruk manis memerlukan pendekatan yang terintegrasi. Uji *Colony Forming Unit* (CFU) digunakan untuk memberikan data kuantitatif mengenai viabilitas sel bakteri *in vivo* pasca-perlakuan. Namun, penilaian keberhasilan terapi tidak cukup hanya dengan melihat kematian bakteri, melainkan juga harus meninjau dampaknya terhadap kondisi fisiologis inang (Pradita et al., 2024). Oleh karena itu, analisis ekspresi gen imun melalui *Reverse Transcription Quantitative PCR* (RT-qPCR) diperlukan untuk memverifikasi modulasi respons imun inang, khususnya pada gen *dipterizin* (*dpt*) yang merupakan penanda utama aktivasi jalur IMD akibat infeksi bakteri Gram-negatif (Rosa et al., 2021).

Drosophila melanogaster dipilih sebagai model *in vivo* karena sistem imun bawaannya memiliki kemiripan fundamental dengan mamalia, sehingga memungkinkan studi mendalam mengenai bagaimana senyawa bioaktif seperti *limonene* berinteraksi dengan sistem imun selama infeksi (Pratomo et al., 2022). Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini dirancang untuk mengevaluasi

efektivitas ekstrak kulit jeruk manis melalui analisis viabilitas bakteri (CFU) yang didukung dengan konfirmasi molekuler respons imun (RT-qPCR) pada model infeksi *P. aeruginosa*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah yang komprehensif mengenai potensi terapeutik ekstrak kulit jeruk manis dalam mengatasi infeksi bakteri secara efektif sekaligus menormalkan kondisi imun inang.

1.2 Kajian Pustaka

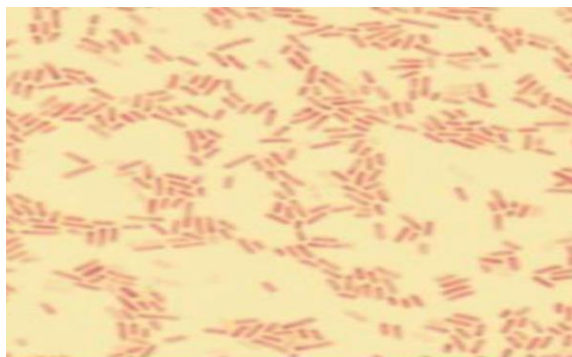
1.2.1 Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan (bakteriostatik) atau membunuh bakteri secara langsung (bakterisidal). Berdasarkan mekanisme kerjanya, senyawa antibakteri dapat bekerja dengan merusak dinding sel, mengganggu permeabilitas membran, menghambat sintesis protein, atau menginterferensi proses replikasi DNA. Gangguan pada salah satu sistem vital sel bakteri tersebut dapat menyebabkan terganggunya metabolisme, kebocoran isi sel, hingga kematian bakteri (Belay et al., 2024).

Bahan alam khususnya tanaman, diketahui mengandung berbagai senyawa aktif seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan fenol yang memiliki aktivitas antibakteri. Senyawa-senyawa ini mampu merusak struktur membran sel serta menghambat pembentukan biofilm yang berperan melindungi bakteri dari antibiotik. Oleh karena itu, penggunaan bahan alam sebagai sumber antibakteri alami menjadi alternatif yang menjanjikan untuk mengatasi resistensi antibiotik karena dianggap lebih aman, mudah diperoleh, dan ramah lingkungan (Belay et al., 2024).

1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri Gram-negatif berbentuk batang dengan ukuran panjang sekitar 1,5-3,0 μm dan lebar 0,5-0,8 μm , bersifat aerob obligat, tidak membentuk spora, namun memiliki flagela tunggal yang memungkinkannya bergerak aktif. Koloni *P. aeruginosa* biasanya berwarna kehijauan dan menghasilkan pigmen khas seperti *piocyanin* (biru-hijau) dan *pyoverdine* (kuning-hijau) yang berfluoresensi di bawah sinar ultraviolet. Bakteri ini dikenal sebagai patogen oportunistik yang mampu hidup di berbagai lingkungan lembap, termasuk air, tanah, dan peralatan medis. Selain itu, *P. aeruginosa* mampu membentuk biofilm tebal yang melindunginya dari sistem imun dan antibiotik, serta memiliki sistem pompa efluks dan enzim inaktivasi antibiotik yang menyebabkan tingkat resistensi tinggi, menjadikannya salah satu penyebab utama infeksi nosokomial yang sulit diobati (Haidar et al., 2024).



Gambar 1. Morfologi *P. aeruginosa* hasil pewarnaan Gram. Bakteri tampak berbentuk batang berwarna merah muda yang menunjukkan karakteristik Gram-negatif (Scanian dan Ningsih, 2023)

Menurut Scanian dan Ningsih (2023), morfologi dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria

Subkingdom : Negibacteria

Filum : Proteobacteria

Kelas : Gammaproteobacteria

Ordo : Pseudomonadales

Famili : Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.3 *Citrus sinensis*

Citrus sinensis atau jeruk manis merupakan salah satu jenis buah yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat karena rasanya yang segar serta kandungan gizinya yang tinggi. Seiring dengan meningkatnya konsumsi buah jeruk, baik pada tingkat rumah tangga maupun industri pengolahan pangan dan minuman, jumlah kulit jeruk yang dihasilkan juga semakin meningkat. Limbah kulit jeruk tersebut umumnya belum dimanfaatkan secara optimal dan masih banyak dibuang begitu saja, sehingga terbuang secara sia-sia dan berpotensi menimbulkan permasalahan lingkungan, seperti bau tidak sedap dan pencemaran akibat proses pembusukan. Padahal, kulit jeruk *C. sinensis* mengandung berbagai senyawa serta bioaktif lainnya yang berpotensi dimanfaatkan dalam bidang kesehatan, pangan, dan industri (Fitri et al., 2024).

Citrus sinensis (jeruk manis) adalah tanaman jeruk yang banyak dibudidayakan di Indonesia dan memiliki potensi besar sebagai sumber senyawa bioaktif alami. Selain bernilai gizi tinggi, berbagai bagian tanaman ini terutama kulit buah mengandung metabolit sekunder seperti flavonoid (*hesperidin*, *naringin*, *narirutin*), limonoid, minyak atsiri (terutama *limonene*, *citral*, dan *linalool*), serta asam askorbat, yang berkontribusi terhadap berbagai aktivitas farmakologis termasuk antibakteri. Kulit buah jeruk manis mengandung kadar fenol antara 0,67-19,62 g/100 g berat kering dan flavonoid utama seperti *hesperidin* (hingga 80,9 mg/g),

yang memiliki aktivitas antioksidan dan antimikroba kuat. Minyak atsiri *citrus* terutama *limonene*, *linalool*, dan *citral* dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan berbagai bakteri patogen (M'hiri et al., 2017).



Gambar 2. *C. sinensis* (Ananda et al., 2022)

Aktivitas antibakteri *Citrus sinensis* terhadap *P. aeruginosa* telah dibuktikan melalui penelitian *in vitro* yang menunjukkan bahwa ekstrak minyak kulit jeruk manis memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri Gram-negatif, termasuk *P. aeruginosa*. Aktivitas ini dikaitkan dengan kandungan senyawa bioaktif seperti *d-limonene*, hesperidin, naringin, dan *auraptene*, yang berperan dalam mengganggu fungsi membran sel bakteri, menghambat metabolisme energi, serta menyebabkan kebocoran isi sitoplasma. Mekanisme tersebut memperkuat dugaan bahwa senyawa fenolik dan flavonoid pada *C. sinensis* mampu merusak integritas membran luar bakteri dan menurunkan viabilitasnya, sehingga ekstrak kulit jeruk manis berpotensi dikembangkan sebagai agen antibakteri alami terhadap patogen resisten seperti *P. aeruginosa* (Kamel et al., 2022).

Menurut Ananda et al. (2022), klasifikasi *Citrus sinensis* sebagai berikut.

Divisi : Spermatophyta

Sub-divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnolioosida

Ordo : Rosidae

Famili : Sapindaberwales

Genus : *Citrus* L.

Species : *Citrus sinensis* L.

1.2.4 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster telah diakui sebagai organisme model yang sangat berharga untuk mempelajari interaksi inang patogen karena memiliki relevansi genetik yang tinggi dengan manusia, di mana sekitar 75% gen penyebab penyakit pada manusia memiliki homolog pada lalat buah ini, menjadikannya model genetik

yang representatif untuk studi patogenesis. Secara imunologis, *Drosophila* memiliki sistem imun bawaan yang sangat mirip dengan mamalia, khususnya melalui aktivasi jalur *Toll* dan *Imd* (*Immune Deficiency*) yang berfungsi serupa dengan *Toll-like receptor* (TLR) dan *TNF pathway* pada manusia. Karena tidak memiliki sistem imun adaptif, *Drosophila* memungkinkan peneliti fokus pada mekanisme pertahanan imun bawaan, pengenalan patogen, serta regulasi respon imun seluler dan humoral tanpa gangguan dari imunitas adaptif. Dalam konteks infeksi bakteri, termasuk *P. aeruginosa* lalat buah ini banyak digunakan untuk mempelajari mekanisme virulensi, efek toksin, dan efektivitas senyawa antimikroba alami sebelum dilakukan pengujian pada model vertebrata. Dengan karakteristik tersebut, *Drosophila melanogaster* menjadi model non-vertebrata yang efisien, etis, dan hemat biaya, serta sangat potensial digunakan untuk menilai respon imun inang, viabilitas bakteri, aktivitas metabolik, dan potensi terapi antibakteri dari ekstrak alami seperti *Citrus sinensis* terhadap patogen oportunistik seperti *P. aeruginosa* (Giansanti et al., 2025).



Gambar 3. Lalat Buah (*D. melanogaster*) (Mila dan Indahsari, 2023)

Menurut O'Grady & DeSalle (2018), klasifikasi ilmiah *D. melanogaster* adalah sebagai berikut:

Kingdom: Animalia

Filum : Arthropoda

Kelas : Insecta

Ordo : Diptera

Famili : Drosophilidae

Genus : *Drosophila*

Spesies: *Drosophila melanogaster*

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit jeruk manis (*C. sinensis*) terhadap viabilitas bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan uji *Colony Forming Unit* (CFU) serta untuk mengetahui efektivitas pemberian ekstrak kulit jeruk manis dalam mempengaruhi ekspresi gen dipterisin (*dpt*) pada model *Drosophila melanogaster* yang terinfeksi *P. aeruginosa*. Manfaat dari penelitian ini

diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai potensi antibakteri ekstrak kulit jeruk manis sekaligus menjadi dasar pengembangan bahan antibakteri alami yang aman dan ramah lingkungan, serta sebagai referensi penggunaan *D. melanogaster* sebagai platform pengujian aktivitas antibakteri dan respon imun inang.

BAB II

METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental pada bulan Mei-Juli 2024. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi-Toksikologi, Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

2.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimen laboratorium dengan pendekatan kuantitatif. Terdapat dua komponen utama yang saling melengkapi, yaitu uji CFU pada model *in vivo* untuk mengukur beban bakteri pascaperlakuan pada *D. melanogaster*, dan uji PCR sebagai verifikasi molekuler terhadap respons imun inang melalui ekspresi gen *dipthericin* (*dpt*). Urutan pengujian ditetapkan dimulai dengan uji CFU untuk mengetahui viabilitas bakteri secara kuantitatif, yang kemudian dilanjutkan dengan analisis PCR. Hasil kuantifikasi koloni (CFU) menjadi dasar untuk menginterpretasikan efektivitas ekstrak kulit jeruk manis dalam menekan infeksi, yang kemudian divalidasi dengan tingkat aktivasi sistem imun pada level molekuler.

2.3 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian meliputi kultur *P. aeruginosa* dan koloni *D. melanogaster* tipe *w¹¹¹⁸*. Sampel *in vivo* dibagi menjadi lima kelompok yaitu kontrol normal, kontrol infeksi, serta tiga kelompok perlakuan ekstrak kulit jeruk manis (*C. sinensis*) pada 2%, 4%, dan 8% (ukuran contoh per ulangan 10 larva). Untuk keperluan uji CFU, larva yang terinfeksi dari tiap kelompok dihomogenkan dalam 1 mL PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), kemudian dilakukan pengenceran bertingkat, dan ditanam pada *Cetrimide Agar* dan diinkubasi 37 °C selama 24 jam, koloni yang tumbuh dihitung sebagai indikator beban bakteri *in vivo*. Selanjutnya, sampel jaringan dari seluruh kelompok dikumpulkan untuk isolasi RNA dan analisis RT-qPCR guna mengukur tingkat ekspresi gen *Dipthericin* (*dpt*) sebagai penanda molekuler respons imun jalur IMD.

2.4 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan ialah mesin Real-Time PCR (RT-qPCR), blender, *cabinet dryer*, cawan petri, *colony counter*, lemari pendingin, mikropipet, *microtube*, *object glass*, ose steril, *rotary evaporator*, *round bottom plate*, seperangkat alat destilasi, vial *D. melanogaster*, dan wadah ekstrak.

Bahan yang digunakan ialah *aquadest*, bakteri *P. aeruginosa*, *corn meal*, gas CO₂, gula pasir, kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*), larva *D. melanogaster* tipe *w¹¹¹⁸*, kit isolasi RNA, kit PCR, larutan PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), *Cetrimide Agar* (CETA), dan pisang untuk media pakan.

2.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Penyiapan Ekstrak Kulit Jeruk Manis

Proses ekstraksi untuk memperoleh minyak atsiri dengan metode destilasi air dilakukan melalui beberapa tahapan. Pertama-tama, sampel segar yang telah melalui proses sortasi dimasukkan ke dalam labu destilasi dengan perbandingan 1:10 antara berat sampel dan volume air suling (*aquadest*). Selanjutnya, alat destilasi, termasuk kondensor, dirakit dengan baik sehingga tersambung dengan labu destilasi dan erlenmeyer penampung. Proses ini dilakukan agar terjadi pemisahan yang sempurna antara air dan minyak atsiri setelah proses penguapan berlangsung (Daryono et al., 2023).

2.5.2 Penyiapan Stok *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster diperoleh dari koleksi Laboratorium Farmakologi-Toksikologi, Universitas Hasanuddin. Seluruh stok *D. melanogaster* tipe *w¹¹¹⁸* yang akan digunakan dipelihara pada suhu 25°C dengan kelembaban 60% dalam siklus gelap/terang masing-masing 12 jam (Bernades et al., 2023).

2.5.3 Persiapan Sampel

Pada model infeksi *P. aeruginosa* larva diinfeksi dengan suspensi bakteri menggunakan metode *oral infection* yang dimodifikasi sebanyak 500 µL *crush banana* dan 500 µL suspensi bakteri *P. aeruginosa* dimasukkan dalam *treff tube* dan dihomogenkan. Kemudian tabung diinkubasi selama 2 jam menggunakan suhu 25°C (Touré et al., 2023). Masing-masing tipe *D. melanogaster* dilakukan pengujian dengan memasukkan *D. melanogaster* ke dalam vial yang dibagi menjadi 5 kelompok.

Tabel 1. Kelompok Perlakuan Pengujian *D. melanogaster*

Kelompok Perlakuan	Komposisi % Ekstrak Citrus sinensis
Kontrol Normal	-
Kontrol Infeksi	-
Konsentrasi Ekstrak I	2 %
Konsentrasi Ekstrak II	4 %
Konsentrasi Ekstrak III	8 %

2.5.4 Isolasi RNA

Isolasi RNA dilakukan untuk memperoleh RNA total dari jaringan larva *D. melanogaster* yang akan digunakan sebagai *template* pada tahap RT-qPCR. Proses isolasi mengikuti prinsip lisis jaringan dan pemurnian berbasis kolom silika. Larva dari masing-masing kelompok perlakuan (2%, 4%, dan 8%) dikumpulkan sebanyak ±20 ekor, kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* berisi 500 µL *lysis buffer* dan dihancurkan menggunakan homogenizer hingga terbentuk suspensi yang homogen. Suspensi diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang untuk

memastikan disrupsi jaringan serta inaktivasi RNase. Setelah itu ditambahkan etanol 70% sesuai protokol *kit* untuk memungkinkan pengikatan RNA pada membran kolom silika. Campuran kemudian dipindahkan ke kolom dan disentrifugasi, diikuti tahap pencucian menggunakan *wash buffer 1* dan *wash buffer 2* untuk menghilangkan protein, lipid, dan kontaminan seluler. RNA total dielusi menggunakan 30-50 μL *RNase-free water*, kemudian diuji kemurniannya menggunakan spektrofotometer. RNA yang memenuhi kriteria kemurnian digunakan pada proses sintesis cDNA. Prosedur ini disusun berdasarkan modifikasi protokol standar isolasi RNA dari *D. melanogaster* (Green dan Sambrook, 2020).

2.5.5 Uji Colony Forming Unit (CFU)

Analisis ini dilakukan untuk mengevaluasi beban bakteri *P. aeruginosa* pada larva *D. melanogaster* pasca pemberian perlakuan. Prosedur preparasi sampel merujuk pada Dodge dan Ludington (2023), di mana sebanyak 10 larva dari setiap kelompok dikumpulkan dan disuspensikan ke dalam 1 ml *Phosphate Buffered Saline* (PBS) steril. Larva kemudian dihancurkan secara mekanik menggunakan *micropestle* steril dan dihomogenkan menggunakan *vortex*.

Penentuan jumlah bakteri dilakukan dengan metode Angka Lempeng Total (ALT) teknik tuang (*pour plate*). Dilakukan pengenceran bertingkat (*serial dilution*) dari 10^{-1} hingga 10^{-6} . Berdasarkan optimasi, suspensi hasil pengenceran, 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} dipilih untuk ditumbuhkan pada media selektif *Cetrimide Agar* (CETA). Sebanyak 1 ml suspensi dimasukkan ke dalam cawan petri secara *duplo*, kemudian dituangkan media CETA suhu $45-50^{\circ}\text{C}$ (A'yunin et al., 2025). Setelah inkubasi 37°C selama 24 jam, koloni yang tumbuh dihitung menggunakan rumus :

$$\text{CFU/mL} = \frac{N \times D}{V}$$

Keterangan :

N = Jumlah koloni yang terhitung

V = Volume inokulum yang ditanam

D = Faktor pengenceran

2.5.6 Uji RT-qPCR (Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction)

Metode RT-qPCR bertujuan untuk menganalisis ekspresi gen imun *dipterizin* (*dpt*) yang berperan penting dalam mekanisme pertahanan *D. melanogaster* terhadap infeksi bakteri Gram-negatif. Analisis ini digunakan untuk mengevaluasi pengaruh pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*C. sinensis*) pada konsentrasi 2%, 4%, dan 8% terhadap modulasi respons imun lalat setelah terpapar *P. aeruginosa*. *Dipterizin* merupakan peptida antimikroba utama yang diinduksi melalui jalur imun IMD, sehingga tingkat ekspresinya digunakan sebagai penanda molekuler aktivasi sistem imun bawaan pada *D. melanogaster* (Nainu et al., 2020).

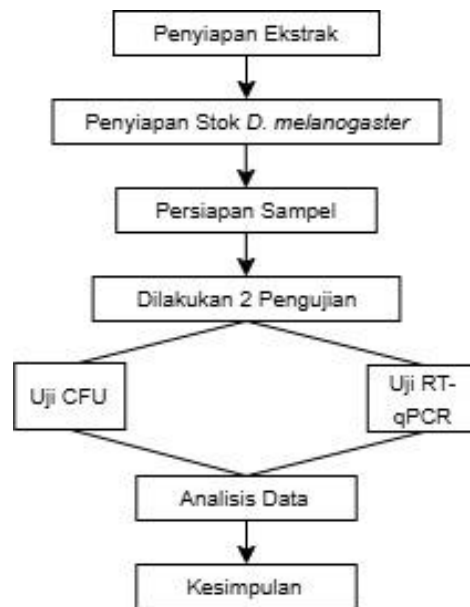
Proses analisis diawali dengan isolasi RNA total dari larva *D. melanogaster*, yang dilanjutkan dengan transkripsi balik menjadi DNA komplemen (cDNA) menggunakan enzim *Reverse Transcriptase*. Amplifikasi kuantitatif dilakukan menggunakan primer spesifik untuk gen *dpt* (Forward: 5'-ACCGCAGTACCCACTCAATC-3' dan Reverse: 5'-CCCAAGTGCTGTCCATATCCT-3') serta gen referensi *RpL32* (Forward: 5'-

GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG-3' dan Reverse: 5'-AAACGCGGTTCTGCATGAG-3') untuk normalisasi data (Yadav et al., 2018).

2.6 Teknik Pengumpulan Data dan Analisis Data

Data dianalisis menggunakan *Ordinary One-Way ANOVA* diikuti dengan uji lanjut *Tukey's multiple comparisons test* menggunakan perangkat lunak *GraphPad Prism 9.0*.

2.7 Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian